



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD DE
LAS MAPK'S INDUCIDA POR ÁCIDO LIPOTEICOICO (LTA)
EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS (HGF).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

OSCAR ALONSO LUNA

TUTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

Proyecto financiado por PAPIIT IN218609-3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.)

Máxima casa de estudios de México; porque fue y seguirá siendo un gran privilegio ser su alumno, con mucho orgullo la llevaré siempre a donde quiera que vaya en mi corazón.

A la Facultad de Odontología

Por la formación profesional que adquirí durante éstos 5 años y por haberme enseñado en sus aulas a amar a mi carrera.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Tutora, amiga y guía; por recibirme con los brazos abiertos y haber puesto su confianza en mí, sin dejar atrás sus enseñanzas, consejos y todo lo que ha hecho por mí para poder ser cada vez mejor persona y profesional.

DEDICATORIAS

A Dios.....

Por el gran don de la vida y la felicidad que me da cada día con todas las personas que me rodean y me aprecian, en verdad, gracias por nunca dejarme del todo solo.

A mi mami:

Por el valor de aceptarme como hijo suyo ante todas las adversidades.

Por todo el gran esfuerzo que ha realizado desde el día en que fui parte de su vida para poderme sacar adelante. ¡Lo logramos!

Por nunca dejarme caer, enseñándome a perseverar para alcanzar todas mis metas.

Por el ejemplo de superación que siempre me has sido en mi vida, y que en verdad, espero poder al menos igualarlo.

Pero sobre todo porque eres la única persona en este mundo que siempre estará conmigo de forma incondicional, tu fuerza y tu amor me han guiado, y me han dado alas para volar!!!!!!!

Por todo y más... Gracias!!!!

A mi abuelita:

El gran momento que tu añorabas y pedías tanto a Dios te diera el don de la vida para poder compartirlo y celebrarlo conmigo ¡Al fin llego y tu eres testiga!! Gran parte de todo el esfuerzo que ponía cada día para poder conseguirlo fue pensando en ti abuelita.

Porque con todas las platicas tan largas que hemos tenido y no cualquiera tiene el privilegio, me han enseñado admirar la gran fortaleza que tu posees, a comprender y no juzgar la dureza de tu carácter, y sobre todo, a gozar de todo el cariño que me demuestras cada día que estoy a tu lado... ¡Te quiero mucho!

Por todas las buenas cosas que me has enseñado y me han sido armas para triunfar hasta este momento de mi vida, por los mejores manjares preparados con tus propias manos y por acogerme como tu nieto consentido....

..... ¡Gracias abuelita!

A Horte y Lety:

Mis tías favoritas ante todo, por haber hecho de mi niñez una etapa llena de felicidad, privilegios y cariños.

Por sus cuidados y atenciones que nunca han dejado de brindarme y por que durante sus momentos de estudio nació mi amor hacia el área médica.

A Luis López:

Porque más que un tío es un amigo que me ha dado su apoyo incondicional, confianza, consejos y todas aquellas buenas acciones hacia mi persona.

A todos mis tías y tíos que también han participado en el desarrollo de mi vida, por sus consejos, apoyo y todos aquellos momentos que como familia hemos vivido.

A todos mis primos, en especial a Sandra, Vero, Brígido y Fernando, con los que he crecido y he pasado momentos de felicidad, enojo, juego y diversión. Los quiero mucho.

A Anabel, Martha, Verisho, Vero mala, Giselle, Mariana, Jessy, Paco, Luca, Juan Antonio, Omar, etc. por ser mis amigos, compartir todos aquellos momentos de tensión, tristeza, felicidad. En verdad, gracias por su apoyo y su amistad.

A mis pacientes que nunca dudaron de mis capacidades y pusieron su confianza para que yo pudiera ser todo lo que ahora soy, en particular a Erika Patricia y Luis López. Su ayuda fue esencial para poder concluir con mi carrera.

ÍNDICE

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción.....	2
3.	Antecedentes	3
3.1	Enfermedad periodontal	3
3.1.1.	Definición	3
3.1.2.	Etiología	3
3.1.3.	Clasificación	3
3.1.4.	Patogenia	5
3.1.4.1	Placa dentobacteriana (PBD)	5
3.1.4.1	Propiedades	6
3.1.4.1	Comunicación	6
3.1.4.1	Transferencia de genes	6
3.1.4.1	Resistencia antimicrobiana	6
3.1.5.	Microorganismos periodontopatógenos	7
3.1.5.1	Factores de virulencia	7
3.1.5.2	Microorganismos específicos asociados con salud y enfermedad periodontal	9
3.1.6.	Rol de la susceptibilidad del huésped	10
3.1.7.	Toxinas bacterianas	11
3.1.7.1	Ácidos teicoicos	11
3.2	Ácido lipoteicoico (LTA)	12
3.2.1.	Funciones	12
3.2.2.	Efectos	12
3.3	Inmunidad innata	14
3.3.1.	Receptores toll (TLR)	15
3.3.2.	Mecanismos de traducción del LTA	17
3.4	Flavonoides	19
3.4.1.	Estructura química	20
3.4.2.	Biogénesis	20
3.4.3.	Absorción y metabolismo	20
3.4.4.	Propiedades	21
4.	Objetivo general	22
5.	Objetivo específico	22
6.	Hipótesis	23
7.	Tipo de estudio	24
8.	Materiales	25
9.	Métodos	27
9.1	Cultivo celular	27
9.2	Análisis de Western Blot	27
9.3	Inmunocitoquímica	27
9.4	RT-PCR	28

9.5	Análisis de datos	28
11.	Población de estudio.....	29
11.	Selección y tamaño de la muestra	29
12.	Criterios de inclusión	29
13.	Criterios de exclusión	29
14.	Criterios de eliminación	29
15.	Resultados	30
16.	Discusión	37
17.	Conclusiones	39
18.	Bibliografía	40

1.- RESUMEN

Dentro de las enfermedades de mayor prevalencia en México y a nivel mundial se encuentran las enfermedades bucales. La caries y la enfermedad periodontal son las de más alta incidencia, seguidas por las maloclusiones y el cáncer bucal. La caries es una enfermedad bacteriana, irreversible, multifactorial que afecta los tejidos que conforman al diente. Por otra parte, la enfermedad periodontal afecta los tejidos de soporte del diente (encía, ligamento periodontal, hueso y cemento), produciendo de forma progresiva su destrucción, y por último, el diente pierde su soporte llegando a la exfoliación.

La enfermedad periodontal inicia con la gingivitis, que es la inflamación de la encía asociada principalmente a una mala higiene bucal entre otros factores. Sigue su curso a enfermedad periodontal cuando hay pérdida del epitelio de unión, formando así bolsas gingivales que sirven como reservorios para múltiples microorganismos y finalmente se presenta una resorción ósea progresiva. Las terapias encaminadas para combatir ésta enfermedad son la adecuada higiene bucal como única forma preventiva y como terapia correctiva, el raspado radicular y las terapias quirúrgicas.

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad periodontal principalmente está relacionada a microorganismos aunque también influyen enfermedades sistémicas y factores genéticos. Dentro de los microorganismos, las bacterias ocupan el primer lugar como factor etiológico y de éstas se encuentran principalmente relacionadas las Gram- por contener lipopolisacárido (LPS), toxina que posee gran capacidad antigénica. Las bacterias Gram+ han provocado controversia, ya que por mucho tiempo no se le confirió al ácido lipoteicoico (LTA) capacidad antigénica. Sin embargo, nuestros experimentos comprobaron que el LTA obtenido de *Streptococcus sanguis*, activó los sistemas de señalización intracelular de las MAPKs, Akt, I κ B-NF- κ B y la expresión de COX-2 a 15-30 minutos en fibroblastos gingivales humanos.

Los flavonoides son sustancias polifenólicas producto del metabolismo secundario de las plantas que han ganado a últimas fechas gran atención porque han demostrado múltiples beneficios en el cuerpo humano entre los que se encuentran propiedades antiinflamatorias, cardioprotectoras, antioxidantes, antioncogénicas, etc.

La alta prevalencia de la enfermedad periodontal y sus escasas medidas preventivas nos llevaron a analizar los efectos de 4 flavonoides: luteolina, fisetina, morina y miricetina en los fibroblastos gingivales humanos inducidos por ácido lipoteicoico. Los resultados obtenidos de dichos experimentos demostraron que 2 flavonoides, luteolina y miricetina inhibieron la expresión de COX-2, así como también la fosforilación de las MAPKs, Akt y la traslocación nuclear de NF- κ B. Sin embargo, es necesario caracterizar más profundamente los efectos de luteolina y miricetina en los fibroblastos gingivales humanos.

2.- INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades bucales de mayor prevalencia en México y el mundo se encuentran en primer lugar la caries y la enfermedad periodontal.¹ Su alta incidencia a lo largo de la historia ha dado pauta a investigar su etiología, y se ha concluido que su origen, entre varios factores, están involucrados principalmente microorganismos residentes de la placa dentobacteriana. La caries dental es una enfermedad multifactorial, irreversible que causa la desmineralización de los órganos dentarios, promovida por los ácidos producto del metabolismo de bacterias presentes en la placa dentobacteriana, como estreptococos y lactobacilos.

La enfermedad periodontal a su vez, es la enfermedad inflamatoria que causa destrucción de los tejidos de soporte del diente (periodonto), el cual está integrado por: encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular; dando como resultado la pérdida progresiva de los órganos dentarios. Los estudios clínicos han identificado solo 10 de 15 especies bacterianas que se consideran como posibles patógenos periodontales en los adultos y, tres bacterias han sido designadas oficialmente como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella Forsythia* entre otros.²⁻³ Por lo tanto, se trata de una infección bacteriana localizada, donde se desencadenan reacciones inflamatorias caracterizadas por la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de las células del hospedero, en presencia de algunos componentes de la pared celular de dichos microorganismos.

Por mucho tiempo se le confirió una mayor relación al lipopolisacárido (LPS), componente de la pared celular de las bacterias Gram-, con las infecciones bacterianas; aunque actualmente se sabe que el LPS por sí solo no puede causar dichos trastornos, ya que requiere de la participación de bacterias Gram+, las cuales poseen ácido lipoteicoico (LTA).⁴

Los flavonoides son compuestos polifenólicos productos del metabolismo secundario de los vegetales constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. En principio fueron considerados sin valor nutricional, aunque últimamente se han demostrado efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antialérgicos, antivirales, protectores ante enfermedades cardiovasculares y cáncer.⁵⁻⁸

Por lo tanto, los efectos terapéuticos de los flavonoides son inciertos si se piensa como opción terapéutica para enfermedades que afectan los tejidos de la cavidad bucal, por lo que este trabajo ofrece una propuesta innovadora para discernir los efectos que puedan tener frente a los tejidos y microorganismos previamente designados como factores etiológicos de la enfermedad periodontal.

3.- ANTECEDENTES

3.1. ENFERMEDAD PERIODONTAL

3.1.1. Definición

El término enfermedad periodontal, se refiere a un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan a los tejidos de soporte del diente, encía, hueso, cemento y ligamento periodontal. Se considera el resultado del desequilibrio entre la interacción inmunológica del huésped y la flora de la placa dentobacteriana marginal que coloniza el surco gingival.⁹

3.1.2. Etiología

Durante mucho tiempo los textos odontológicos recomendaban el cepillado dental como medida de prevención contra las enfermedades bucales. Tanto la gingivitis como periodontitis son procesos inflamatorios debido a una infección. El equivocado rol de la placa dentobacteriana en el desarrollo de estas enfermedades fue establecido al menos 40 años atrás. La gingivitis es una reacción inflamatoria reversible debido a la acumulación de placa dentobacteriana en el margen gingival, mientras que, la periodontitis es una inflamación irreversible y destructiva por lo que, hay una pérdida del tejido conectivo de soporte (hueso y ligamento periodontal) y desencadenando la pérdida de los órganos dentarios. Existen evidencias de que la periodontitis precede de una gingivitis.^{10,11,12}

Cabe mencionar que la acumulación de placa dentobacteriana es necesaria, aunque por sí sola no es capaz de desarrollar enfermedad, y, por lo tanto, es necesaria la susceptibilidad del hospedero.¹⁰⁻¹³

3.1.3. Clasificación

En una reunión internacional llevada a cabo del 30 de Octubre al 2 de Noviembre de 1999, fue aprobada y publicada una nueva clasificación de las enfermedades periodontales y condiciones. Un comité de expertos clínicos e investigadores científicos, convocados por la Academia Americana de Periodontología desarrollaron un sistema de clasificación para ordenar las diversas entidades clínicas y patológicas en torno a la expresión genérica de enfermedad periodontal. En esta nueva clasificación resaltan cambios importantes por adiciones de algunos términos y el reemplazo de otros.¹⁴

En esta nueva enmienda se contempla una amplia y detallada clasificación de lesiones y enfermedades que se desarrollan en la encía y que no solo confinan a las que tradicionalmente se han asociado a la presencia de placa dentobacteriana. Esta clasificación abarca tanto enfermedades gingivales y periodontales, sin embargo, éste

trabajo de investigación está dirigido hacia los procesos bioquímicos presentes en la periodontitis, por lo que solo incumbe la clasificación de periodontopatías.¹⁵ (Tabla 1)

Tabla 1.

PERIODONTOPATIAS	
<p>Periodontitis; crónica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Localizada • Generalizada 	<p>Enfermedades periodontales necrotizantes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gingivitis ulceronecrosante (PUN) • Periodontitis necrosante (GUN)
<p>Periodontitis; agresiva</p> <ul style="list-style-type: none"> • Localizada • Generalizada 	<p>Abscesos en el periodonto</p> <ul style="list-style-type: none"> • Absceso periodontal • Absceso pericoronar
<p>Periodontitis; con manifestaciones de enfermedades sistémicas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Asociada a enfermedades hematológicas</u> <ol style="list-style-type: none"> a. Neutropenia adquirida b. Leucemias c. Otras 2. <u>Asociada a enfermedades genéticas</u> <ol style="list-style-type: none"> a. Neutropenia cíclica y familiar b. Síndrome de Down c. Síndrome de deficiencia de adherencia de leucocitos d. Síndrome de Papillion-Lefevre e. Síndrome de Chediak-Higashi f. Síndrome de histiocitosis g. Enfermedad de almacenamiento de glucógeno h. Agranulocitosis genética infantil i. Síndrome de Cohen j. Síndrome de Ehlers-Danlos (tipo IV y VII) k. Hipofosfatasia l. Otras 3. <u>No específica</u> <p>Periodontitis; asociadas con lesiones endodónticas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lesión endo-perio 	<p>Deformidades y condiciones del desarrollo adquiridas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Factores localizados al diente que predisponen la acumulación de placa</u> <ol style="list-style-type: none"> a. Factores de la anatomía dentaria b. Resorción radicular cervical y fisuras cementarias c. Restauraciones y aparatos dentales d. Fracturas radiculares 2. <u>Deformidades mucogingivales y condiciones alrededor del diente</u> <ol style="list-style-type: none"> a. Recesión gingival y de tejidos blandos <ul style="list-style-type: none"> • Superficies vestibulares y linguales • Interproximal o papilar b. Falta de encía queratinizada c. Vestíbulo poco profundo d. Posición aberrante de frenillo / muscular e. Excesos gingivales <ul style="list-style-type: none"> • Interproximal o papilar • Margen gingival inconsistente • Despliegue gingival excesivo • Agrandamientos gingivales f. Coloración anormal 3. <u>Deformidades mucogingivales y condiciones de procesos edéntulos</u> <ol style="list-style-type: none"> a. Deficiencia horizontal / vertical del proceso b. Falta de tejido gingival queratinizado c. Agrandamiento de tejidos blandos/gingivales d. Posición aberrante de frenillo /muscular 4. <u>Trauma oclusal</u> <ul style="list-style-type: none"> • Trauma oclusal primario • Trauma oclusal secundario

3.1.4 Patogenia

3.1.4.1 Placa dentobacteriana (PDB)

La cavidad oral es un ambiente húmedo, el cual tiene una temperatura relativamente constante (34 a 36°C) y aunado a un pH neutro, favorece el crecimiento de muchas colonias bacterianas que la sinergia, pueden llegar a tornarse una flora patógena.¹⁶ Con un pH hacia la neutralidad en la mayoría de sus superficies, es ideal el crecimiento de una gran variedad de especies.¹⁶

Se le nombra placa dentobacteriana a la acumulación heterogénea de una comunidad de bacterias a nivel de la cavidad bucal, depositándose principalmente en los órganos dentarios, aunque también se puede encontrar presente en prótesis y mucosa; y se encuentra ampliamente relacionada con la aparición de las enfermedades bucales tales como caries, gingivitis y periodontitis.¹⁷ Los microorganismos que componen la placa dentobacteriana están conformados por más de 500 diferentes tipos de bacterias que se agrupan en 22 géneros. De acuerdo con su localización se ha clasificado como placa supragingival y subgingival.

La cavidad bucal es estéril en el momento del nacimiento, después de las primeras 6 a 10 horas se establece una flora microbiana compuesta principalmente por organismos aerobios, y posteriormente entre los primeros 10 días se establecen los microorganismos anaerobios. Realizando cálculos mediante microscopia se han encontrado alrededor de 43 millones a 5500 millones de microorganismos por mililitro de saliva. Y así mismo, además de bacterias, se han encontrado hongos *Candida*, *Cryptococcus* y *Saccharomyces* y protozoos como *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax*. En algunos casos, en la cavidad bucal se han encontrado algunos virus.¹⁷

Las investigaciones sobre el desarrollo de placa demostraron que las bacterias bucales pueden colonizar superficies duras y tejidos blandos. Las características físicas y morfológicas de dichas superficies crean diferentes ecosistemas o nichos con diferentes perfiles bacterianos; esos nichos, son el resultado de un equilibrio dinámico que existe entre las fuerzas de adhesión de los microorganismos, la deglución y las fuerzas de la masticación, la saliva y líquido crevicular y las medidas de higiene.¹⁸

La formación de la placa dentobacteriana inicia con la adsorción en la superficie del diente de una película formada por el depósito de glicoproteínas salivales que se forma inmediatamente después de la erupción del diente y del cepillado dental (Película Adquirida), y es seguida por el transporte pasivo de bacterias mediada por fuerzas de atracción débiles, pero los puentes de hidrogeno y enlaces covalentes forman una unión fuerte, iniciando así, un ataque irreversible.^{19,20} Los primeros colonizadores forman una biopelícula por autoagregación y coagregación, desarrollando entonces, un microambiente que parte en su parte más externa de aerobios capnófilos, anaerobios facultativos y posteriormente culmina su organización con anaerobios estrictos. Es en este nivel de organización, donde se considera patógena a la PDB.²¹

3.1.4.1.1 Propiedades de la placa dentobacteriana

3.1.4.1.1.1 Comunicación célula-célula.

Importante característica observada únicamente en las bacterias de la placa dentobacteriana es la detección del quórum o densidad celular mediada por genes. Es mediada por 2 componentes conocidos como autoinductor 1 y 2. Las bacterias Gram- y Gram+ secretan autoinductor-2, el cual, es codificado por el gen *luxS*,²² como es el caso de *Streptococcus gordonii*, que gracias a la proteína autoinductora 2 hay sobreexpresión de genes para *sspA* y *sspB* que a su vez, codifican para una proteína que proporciona un sitio de unión importante para las fimbrias de *Porphyromonas gingivalis*, y por lo tanto, *Porphyromonas gingivalis*, un colonizador secundario, es capaz de unirse preferencialmente en presencia de *S. gordonii*, un colonizador primario.^{23,26}

El proceso de comunicación célula-célula es importante ya que de ésta forma la bacteria controla la expresión génica en respuesta a la densidad celular, que es mediada a través de la síntesis, liberación y detección de moléculas de señalización pequeñas denominadas autoinductores al medio ambiente. Hasta hace algunos años la densidad celular estaba limitada a especies específicas en las que participan lactonas acilhomoserina (Gram-negativas) o oligopéptidos (Gram positivas) y que se utilizan como autoinductores tipo 1. Cada cepa bacteriana produce un único o combinación de autoinductores junto con el receptor de reconocimiento, lo que restringe la comunicación entre la misma especie bacteriana. El mecanismo alternativo de comunicación entre diferentes especies se produce a través de los autoinductores tipo 2. Por lo que *luxS* tiene funciones duales como en la detoxificación y en la producción del autoinductor tipo 2.

3.1.4.1.1.2 Transferencia de genes.

Las bacterias en la biopelícula se comunican a través de la transferencia horizontal de genes. En *S. mutans*, la detección del quórum es mediada por la estimulación competitiva peptídica. El sistema de señalización genético de competencia estimulación peptídica (*comD*, *comC*, *comE*, *comX*) es responsable de múltiples funciones, tales como la formación de placa, competencia (habilidad para aceptar DNA foráneo) y tolerancia ácida.^(27,28)

3.1.4.1.1.3 Resistencia antimicrobiana.

La placa provee un ambiente protegido contra agentes antimicrobianos, actuando como barrera de difusión debido a la presencia de enzimas neutralizantes (β -lactamasa y IgA proteasa) y a una matriz resistente a la difusión.²⁹ Las bacterias en la película pueden desarrollar resistencia a los antibióticos por la transferencia horizontal de genes y por consiguiente, mutaciones, como ocurre con la penicilina y tetraciclina, debido a la transferencia de plásmidos.^{30,31} Posteriormente, las bacterias tienen un lento ritmo de

división celular y por lo tanto, no ser tanto susceptibles a los antibióticos como la división activa de las células del plancton.

3.1.5 Microorganismos periodontopatógenos

3.1.5.1 Factores de virulencia

Los factores de virulencia pueden ser esenciales para la colonización del hospedero o pueden ser realmente antígenos capaces de causar una respuesta inmune por parte del hospedero y pueden ser expresados de manera diferente en respuesta al medio. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, por ejemplo, produce leucotoxina capaz de causar apoptosis a los leucocitos, primera línea de defensa contra la agresión bacteriana y debido a que los organismos se desarrollan óptimamente a un pH de 7.0 a 8.0, se sugiere que las cepas más virulentas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* están presentes en la superficie de la placa subgingival.³² Del mismo modo, *Porphyromonas gingivalis* muestra un crecimiento máximo y actividad proteolítica a pH de 7.0-8.0, aunado a un exceso de hemina, por lo que se sugiere que se vuelve más virulenta en un surco inflamado.³³ Algunos factores de virulencia asociados con microorganismos periodontopatógenos se muestran en la Tabla 2.

Aunque no hay pruebas convincentes de que las bacterias y sus productos representan un reto para el sistema de defensa del huésped, no son los únicos elementos que producen los cambios observados en la enfermedad periodontal. Henderson y cols. propuso que las modulinas bacterianas son las responsables de la inmunomodulación en las células del hospedero. Lo que es evidente es que los factores de virulencia de diferentes tipos bacterianos pueden causar daño tisular directo; sin embargo, la activación de las células del huésped mediante la liberación de citocinas inflamatorias y otros mediadores contribuyen a causar daño tisular de manera indirecta.³⁴

Tabla 2. FACTORES DE VIRULENCIA BACTERIANA Y EFECTOS

Factor	Productor	Efectos sobre las células del huésped
Lipopolisacárido	Bacterias Gram- como: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Incrementa citocinas derivadas de PMN's, macrófagos y fibroblastos ❖ Induce la secreción de óxido nítrico en macrófagos ❖ Incrementa la diferenciación de precursores de osteoclastos ❖ Activa osteoclastos y provee su supervivencia ❖ Estimula la proliferación de células T-helper
Proteínas de shock térmico	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Prevotella spp</i> , <i>Capnocytophaga spp</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Induce la proliferación de células epiteliales gingivales en dosis bajas • Actividad osteoclástica • Proliferación epitelial del Ligamento periodontal • Mimetismo molecular entre bacterias y proteínas de shock térmico seguido de respuesta autoinmune
Enzimas proteolíticas extracelulares	<i>Tannerella forsythia</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Degrada fibrinógeno, fibronectina, albúmina y laminina ❖ Hidroliza colágena IV, IgG e IgA
Fimbrias	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Importante en la colonización • Rol en la invasión hacia las células del huésped
Proteínas extramembranales	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Mejora la respuesta de inmunidad innata por citocinas ❖ Suprime la proliferación de linfocitos T y B ❖ Suprime la proliferación de fibroblastos, monocitos y osteoblastos
Leucotoxina	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ,	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la apoptosis de linfocitos T, NK, y PMN's • Altas concentraciones causan muerte celular por necrosis
Flagelo	<i>Treponema denticola</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Rol en la adherencia debido a la unión con fibronectina
Cápsula	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementa la resistencia a la fagocitosis por PMN's • Inhibe el ataque a los fibroblastos en superficie radicular

3.1.5.2 Microorganismos específicos asociados con salud y enfermedad periodontal

Las diferentes enfermedades periodontales tienen únicos perfiles de asociación bacteriana (tabla 3). Esta característica y el hecho de que la enfermedad se presenta en ocasiones esporádicas en la boca, fortalece la evidencia de la función de microorganismos específicos en la etiología de la enfermedad y su progresión.

Tabla 3 Microorganismos periodontales en salud y enfermedad

Condición	Microorganismos asociados
Salud periodontal	Anaerobios Gram+ <ul style="list-style-type: none"> • <i>Atopobium rimae</i> Facultativos Gram+ <ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus sanguis</i> • <i>Streptococcus mitis</i> Anaerobios Gram- <ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacteroides sp oral clone BU063</i> • <i>Veillonella spp</i> • <i>Gemella spp</i> • <i>Capnocytophaga spp</i>
Periodontitis crónica	Anaerobios Gram+ <ul style="list-style-type: none"> • <i>Peptostreptococcus micros</i> Anaerobios Gram- <ul style="list-style-type: none"> • <i>Porphyromonas gingivalis</i> • <i>Tannerella forsythia</i> • <i>Prevotella intermedia</i> • <i>Campylobacter rectus</i> • <i>Eikenella corrodens</i> • <i>Fusobacterium nucleatum</i> • <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> • <i>Treponema spp</i> • <i>Filifactor alocis</i> • <i>Megasphaera sp oral clone BB166</i> • <i>Megasphaera sp oral clone BB166</i> • <i>Deferribacteres sp oral clone BH017</i> • <i>Desulfobulbus sp oral clone R004</i> • <i>Bacteroides sp oral clone AU126</i>
Periodontitis agresiva	Anaerobios Gram- <ul style="list-style-type: none"> • <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> • <i>Porphyromonas gingivalis</i> • <i>Campylobacter rectus</i> • <i>Eikenella corrodens</i>
Absceso periodontal	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Propionibacterium acnés</i> • <i>Capnocytophaga spp</i> Anaerobios Gram+ <ul style="list-style-type: none"> • <i>Peptostreptococcus micros</i> Anaerobios Gram- <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fusobacterium nucleatum</i>

3.1.6 Rol de la susceptibilidad del huésped en el desarrollo de Enfermedad Periodontal

Como se mencionó antes, la PDB es necesaria pero no suficiente para desarrollar periodontitis, por lo que es necesaria la susceptibilidad del huésped. Amplia evidencia de dicha susceptibilidad varía considerablemente entre individuos, ya que aproximadamente el 10% de los individuos son altamente susceptibles y el 10% son altamente resistentes. Esta diferencia ha sido atribuida principalmente a factores genéticos; esto se demostró en un estudio con gemelos donde se determinó que el riesgo para periodontitis crónica es alrededor del 50 %.^{35,36} No se han demostrado actualmente los genes implicados, aunque el marcador genético específico LI-1 se ha asociado con una mayor susceptibilidad a la periodontitis en algunas poblaciones; aunque existen enfermedades en las cuales se encuentran principalmente trastornos de tipo inmunológico (Tabla 4).³⁷

Tabla 4 ENFERMEDADES GENÉTICAS ASOCIADAS A PERIODONTITIS

Enfermedad	Gen implicado	Proteína afectada
Deficiencia en la adhesión de leucocitos	ITGB2	Integrina, β -2
Síndrome de Chédiak-Higashi	LYST	Regulador de tráfico lisosomal
Síndrome de Papillon-Lefèvre	CTSC	Catepsina C
Neutropenia cíclica	ELA2	Elastasa neutrofílica
Neutropenia congénita severa	ELA2	Elastasa neutrofílica
Síndrome de Cohen	COH1	COH1

3.1.7 Toxinas bacterianas.

Las infecciones bacterianas se caracterizan por las reacciones inflamatorias del hospedero a los agentes patógenos, esto es, debido a la secreción de citocinas proinflamatorias por parte del hospedero ante componentes de la pared celular de las bacterias como el Lipopolisacárido (LPS) ó el Ácido Lipoteicoico (LTA).

3.1.7.1 Ácidos teicoicos.

Los ácidos teicoicos se detectaron en 1958 por Baddiley y cols. mientras investigaban el papel de las moléculas de difosfato-glicerol (CDP-glicerol) y citidina difosfato-robitol (CDP-robitol), presentes en las bacterias Gram+. El grupo de ácidos teicoicos se diferenció y denominó ácidos teicoicos intracelulares por que se extraían de bacterias sin pared celular. Posteriormente los ácidos teicoicos se detectaron en la membrana citoplasmática y se renombraron como ácidos teicoicos de membrana. Un tercer cambio surgió cuando se detectaron complejos de ácidos teicoicos y se describieron como compuestos anfifílicos en donde la estructura de poliglicerol-fosfato se une de forma covalente a los lípidos de la membrana por unión fosfodiéster. De ésta manera se caracterizaron a los ácidos lipoteicoicos como moléculas anfifílicas ancladas a la membrana citoplasmática por interacciones hidrofóbicas mientras que los ácidos teicoicos son moléculas que están unidas al peptidoglucano de la pared celular.⁴

Por mucho tiempo se le confirió una mayor relación al LPS como antígeno, sin embargo, se ha observado que el LTA juega un papel igual o mayormente importante en desencadenar la respuesta antigénica.

3.2. ÁCIDO LIPOTEICOICO

Muchas bacterias Gram⁺ contienen tanto ácidos teicoicos como ácido lipoteicoico, pero éste último predomina y su biosíntesis es menos dependiente de las condiciones de crecimiento bacteriano en comparación con los ácidos teicoicos.

El LTA es una molécula anfifílica anclada al citoplasma de membranas de bacterias Gram⁺ mediante interacciones hidrofóbicas y se creó que es la contraparte del lipopolisacárido, componente de las bacterias Gram⁻. El LTA es un polímero de glicerol fosfato que contiene azúcar y 2 grupos acilo, éstos últimos le confieren la capacidad de anclarse a la membrana celular. Las estructuras del LTA, propuesta por Fisher y cols. no son uniformes, debido a que encontraron diferencias entre diferentes bacterias Gram⁺.
38,39

3.2.1 Funciones.

Como posibles funciones del LTA se ha propuesto que regula la función de autolisinas, propiedad que le es conferida por su capacidad anfifílica ya que se pierde al tratamiento con detergentes. Otra característica es su naturaleza polianiónica que le permita tener un papel clave en el mantenimiento del balance catión divalente sobre la superficie celular, mediante una interacción de intercambio iónico.

Un posible papel de LTA q comparte con los lipoglucanos, es que participan como mediadores de interacciones célula-célula, célula-sustrato y la consecuente virulencia de la bacteria. También se ha identificado como el responsable de la hidrofobicidad de la superficie en los *Streptococcus* del grupo A, en los cuáles participa en la adherencia de la bacteria a la fibronectina en la superficie de células epiteliales.

3.2.2. Efectos del LTA

Cuando las células reconocen al LTA a través de sus 2 receptores CD14 y Receptor tipo Toll-2 (TLR-2) se inducen la activación de mecanismos de transducción y secreción de citocinas como la interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α);⁴ así como también induce la producción de óxido nítrico derivado de macrófagos y monocitos,⁴⁰⁻⁴² producción de factor de crecimiento hepático en HGF,⁴³ y actividades antitumorales.⁴⁴ Sin embargo, se observó que el LTA de *S aureus* antagoniza la actividad del LPS,⁴⁵ por lo que no todos los LTA de diferentes bacterias Gram⁺ tienen la misma capacidad antigénica.

Por otra parte, cuando el LTA es desacilado, pierde su capacidad de estimular a monocitos, lo que demuestra que el componente lipídico es el que le confiere su actividad biológica. El LTA activa también las vías del complemento clásica y alterna. En estudios *en vivo*, el LTA actúa en sinergia con el peptidoglucano para causar falla en órganos de ratas y protege contra el daño por isquemia y la reperfusión del corazón y riñones.

Recientemente se demostró que la aplicación nasal de LTA provoca la infiltración de neutrófilos en los pulmones, lo que sugiere que el LTA comparte con muchas propiedades con el LPS; aunque hay estudios que muestran que algunas preparaciones comerciales contiene concentraciones significativas de LPS y de otros compuestos de LTA que podrían inducir respuestas antigénicas.⁴¹⁻⁴⁶

3.3. INMUNIDAD INNATA

Los organismos superiores disponen de diferentes mecanismos de defensa contra las infecciones. Aunque son muy variados, pueden agruparse en 2 grandes grupos: inmunidad innata e inmunidad adaptativa. En el primer grupo se incluyen todos aquellos que lo hacen mediante moléculas que son codificadas por genes presentes en la línea germinal, constituyendo la inmunidad innata, y están presentes constitutivamente en todos los sujetos normales.

La inmunidad innata o natural, constituye la primera línea de defensa contra la infección. En un inicio, cuando se hablaba de inmunidad innata se hacía referencia a barreras anatómicas, por su papel físico en su defensa contra la infección, y a determinadas secreciones (clorhidropéptica, manto ácido, mucinas, lisozima, lactoferrina y lípidos antibacterianos) que contribuyen por su acción química a la protección de mucosas, así como el sistema complemento y a las células fagocíticas. Sin embargo, la visión acerca de la inmunidad innata ha cambiado a medida que los conocimientos han aumentado.⁴⁷

La inmunidad innata se basa en un variado conjunto de elementos celulares y humorales. En cierta medida, prácticamente todos los tejidos del organismo están implicados en ella, aunque muy especialmente los más expuestos a la agresión microbiana, como la piel y las mucosas, así como las células fagocíticas mieloides.

Filogenéticamente, es la parte más antigua del sistema inmunitario y el único sistema defensivo con que cuentan los animales inferiores y las plantas. Los procedimientos ya presentes en organismos unicelulares se han conservado a lo largo de la evolución, ya sea con variaciones, y lo mismo ocurre con los propios de organismos pluricelulares y de los primeros vertebrados. Finalmente, se ha visto que los sofisticados sistemas de inmunidad adaptativa propios de los mamíferos están bajo control de estos otros elementos más básicos y primitivos; podría decirse que, en la orquesta del sistema inmune, la inmunidad innata no sólo aporta gran número de músicos, además lleva la batuta.⁴⁸

Las funciones principales del sistema inmune innato incluyen.

- Reclutamiento de células inmunes hacia los sitios de infección y de inflamación, mediante la protección de factores químicos, incluyendo a las citocinas.
- Activación de la cascada del sistema complemento para identificar bacterias, activar las células y promover el aclaramiento de las células muertas o de los complejos de anticuerpos.
- La identificación y remoción de sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa a cargo de los leucocitos
- La activación del sistema inmune adaptativo mediante un proceso conocido como la presentación de antígeno.

3.3.1 Receptores tipo Toll (TLRs).

El sistema inmunitario innato es capaz de reconocer estructuras de patógenos y es capaz de diferenciar entre elementos propios y extraños, reconociendo determinadas secuencias moleculares y reaccionando en consecuencia. Los microorganismos tienen patrones moleculares que les son propios, es decir, conjuntos de moléculas que les caracterizan. Ello ocurre con los peptidoglucanos de la pared celular de la bacterias Gram + o con el LPS de las Gram-. A estos patrones moleculares asociados a patógenos se les conoce como PAMPs (patogen associated molecular patterns) y se corresponden receptores de reconocimiento del patrón (PRRs). Entre ellos destacan los receptores tipo Toll y los receptores NOD. El primer receptor de la familia Toll fue descrito por *Drosophila*, estudiando la polaridad del embrión, descubriéndose más tarde su implicación en la defensa contra infecciones. Receptores homólogos a los Toll (TLR *Toll like receptors*) están presentes en numerosos tipos de células, especialmente en células epiteliales, mononucleares, macrófagos tisulares y otros fagocíticos. Actualmente se han descrito al menos 13 diferentes TLRs en humanos, cada uno con reactividad distinta. (Tabla 5)⁴⁹

Tabla 5 Clasificación y ligandos que reconocen a los diferentes tipos de receptores semejantes a Toll

RECEPTOR	LIGANDOS
TLR1	Lipoproteína de 19 KDa de micobacterias, lipopéptidos triacilados
TLR2	Peptidoglicanos, lipoproteínas bacterianas, zymosan de paredes fúngicas, LTA
TLR3	RNA viral de doble cadena
TLR4	Lipopolisacáridos, A. lipoteicoico
TLR5	Flagelina
TLR6	Peptidoglicanos, lipopéptido de micoplasmas
TLR7	Compuestos imidazoquinólicos
TLR8	Compuestos imidazoquinólicos
TLR9	Fragmentos de CpG DNA no metilado
TLR10	No identificado
TLR11	Uropatógenos
TLR12	No identificado
TLR13	No identificado

En su conjunto, su activación desencadena diferentes acciones, incluyendo elaboración y liberación de péptidos antimicrobianos, síntesis y liberación de TNF e interferones, quimiocinas y otras interleucinas, síntesis de proteínas antivirales, activación de fagocitos y regulación de quimiotaxis. Las células presentadoras de antígeno y las células dendríticas son esenciales para la expansión clonal de los linfocitos T y B y entre otros muchos receptores expresan también TLRs; la señalización vía éstos receptores ocasiona maduración de las células y la expresión de moléculas coadyuvantes necesarias para la presentación de antígenos a los linfocitos T y para la expansión clonal de los linfocitos T y B. Se ha comprobado que la delección de los TLRs desencadena una grave insuficiencia en la respuesta inmune adaptativa. Debida a la homología del TLR con el receptor de interleucina 1 (RIL-1) y a la conservación de los canales de señalización en ambos sistemas.⁵⁰

Como se observó anteriormente, los TLR 2 reconocen una gran variedad de componentes microbianos entre los que se encuentran las lipoproteínas y lipopéptidos de varios patógenos, peptidoglicano, lipoarabinomano de micobacteria y glucolípidos de *Treponema maltophilum* y ácido lipoteicoico de bacterias Gram+. Se ha demostrado que forma heterodímeros con otros TLR como el TLR1 y el TLR6, los cuáles estructuralmente están relacionados con TLR2. Otras observaciones muestran también que los dominios citoplasmáticos de diferentes TLR son funcionalmente equivalentes, lo que sugiere que la capacidad de tipos celulares específicos para responder a bacterias Gram+ no está definida solamente por la expresión de TLR2. La expresión diferencial y la heterodimerización entre los receptores TLR incrementa el repertorio de respuestas celulares que puedan activarse por diversos estímulos infecciosos, y es posible que esta sea la base para las respuestas celulares específicas.⁵¹

Se ha demostrado también que la transfección de TLR en células CHO y HEK293, les confiere habilidad para activar al factor NF- κ B en respuesta al tratamiento con LTA. Sin embargo, en estudio realizado en macrófagos peritoneales deficientes en TLR2 y TLR4, en respuesta al LTA, las células deficientes en TLR2 no sintetizaron TNF- α mientras que las deficientes de TLR4 sintetizaron grandes cantidades de TNF- α . Por lo que se concluyó que el TLR2 reconocía LTA.⁵²

En las células humanas el TLR2 se expresa predominantemente en monocitos, macrófagos, neutrófilos, células T y B. Sin embargo otros tipos de células sintetizan RNA mensajero para TLR2 y otros tipos de TLRs. La expresión y eficacia de los TLR para la activación de señales de transducción es regulada por MD-1 y MD-2. Los péptidoglucanos también se asocian a CD14 y cuando se bloquea éste receptor se inhibe la señalización inducida por LTA a lo que sugiere que CD14 además de producir respuestas a LPS, también reconoce LTA.⁵³

3.3.2 Mecanismo de transducción del LTA.

Entre las vías de trasducción del LTA se encuentran las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y la vía de fosfatidilinositol-3 cinasa gamma (PI3K γ).

Una vez que el LTA se une a su receptor TLR2 se activa la fosfatidilcolina-fofolipasa C (PC-PLC) para inducir la activación de PKC, simultáneamente ocurre la activación de cinasa de residuos de tirosina. Estos efectos resultan necesarios para la consecuente fosforilación de las MAPK p44/p42 y p38. La cascada de fosforilaciones descrita resulta en la estimulación de NF- κ B y la subsecuente expresión de COX-2 y liberación de prostaglandina E₂. Se ha demostrado recientemente que utilizando un inhibidor específico de MAPK/p38 (SB 203580) se interrumpe en la expresión de iNOS y la liberación de óxido nítrico (NO) cuando se trata con LTA en la línea celular de macrófagos RAW 264.7, lo que sugiere que la vía de transducción de las MAPK/p38 se encuentra involucrada también en la producción de nitritos.

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

Después del reconocimiento entre TLR2 y el LTA se produce un amplio espectro de señales intracelulares como la activación de la familia de las MAPK, de la proteína cinasa B (PKB) y de la cinasa del inhibidor κ B (IKK). El incremento en la actividad de estas cinasas consecuentemente activa a diversos factores de transcripción como NF- κ B, factor de respuesta de transcripción (ATF), factor de respuesta a suero (SRF), proteína semejante a Ets (ELK), proteína de unión y aumento de CCAAT (C/EBP) y la proteína de fijación del elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB). El primer evento que inicia la cascada de transducción consiste en la co-localización y agrupamiento de receptores y la generación de señales primarias de transducción en la membrana plasmática.

La señalización mediada por AMP cíclico inhibe la activación de la cinasa de respuesta extracelular (ERK), p38, MAPK y JNK en macrófagos peritoneales y también inhibe la expresión de TNF- α , NF- κ B y la expresión de iNOS en células de kupffer y monocitos.⁵⁴

En respuesta al tratamiento con *Streptococcus B*, los receptores TLR2, TLR6 y CD14 se agrupan en la primera molécula intracelular reclutada por el complejo es el factor de diferenciación mieloide (MyD88) el cuál recluta y activa a la cinasa asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK). IRAK forma multímeros que se fosforilan y reclutan en grandes complejos consistentes en el factor activado por el receptor α TNF (TNF/TRAF6), cinasa activadora del factor de crecimiento transformante b-1 TAK1 (TAB1) y TAB2.

IRAK 4 fosforila a IRAK1, esta fosforilación es indispensable para la activación de transducción de señales, en contraposición, recientemente se ha descrito que la forma IRAK-M como inhibidor. Así mismo, la activación de TAK1 promueve su liberación del complejo y de esta forma activa a IKK β y a la MAP cinasa 6 (MKK6). La cinasa inductora de NF- κ B (NIK) se requiere para la activación de la cinasa de I κ B (IKK) que promueve la fosforilación, ubiquitinación y degradación del proteosoma 26S de I κ B y la translocación de NF- κ B al núcleo. Al proteína cinasa MAP- β (MKK β) es responsable de la activación de las MAPK, p38 y la cinasa terminal N-JUN (JNK). En presencia de la proteína adaptadora denominada intermediario conservado evolutivo de la vía Toll (ECSIT) y MEK cinasa (1/MKK1), TRAF6 puede activar a ERK 1/2, sin embargo, ERK1/2 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.

Finalmente se ha demostrado también la activación de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) de manera dependiente de PKB lo que conduce a la activación de NF- κ B. Diversos reportes señalan que las células de Kupffer producen IL-6 y TNF- α durante el trauma, éstas células también sintetizan citocinas antiinflamatorias como IL-10 en respuesta al tratamiento con LTA. LA cinasa PKB que esta activada a través de la vía de PI3K, así como la actividad de JAK-2, están involucradas en la expresión de IL-6 e IL-10, mientras que las cinasas de la familia Src participan en la expresión de TNF- α .

3.4. FLAVONOIDES

Las plantas mediante el proceso de la fotosíntesis producen las sustancias necesarias para todos los ciclos vitales de la naturaleza. Mediante intrincados y cada vez más conocidos mecanismos bioquímicos se constituyen en verdaderas factorías químicas de carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y oligoelementos como el hierro y el magnesio; y adicionalmente mantienen la atmósfera rica en oxígeno y deficiente en dióxido de carbono, permitiéndonos respirar.

Pero además de producir sustancias como los carbohidratos, las proteínas y las grasas, que los investigadores han denominado metabolitos primarios, dado que se encuentran en prácticamente todas las formas de vida y cumplen funciones básicas para la misma, existen otras que no se encuentran tan distribuidas y que se hallan restringidas solo a ciertas especies, géneros o familias como son los alcaloides, las saponinas esteroides, los aceites esenciales, los terpenoides, etc., a los cuales se les denomina metabolitos secundarios. Dentro de este último grupo están los flavonoides, unas sustancias bautizadas así porque las primeras que se lograron aislar eran de color amarillo, pero que como más adelante veremos las hay incoloras ó con otros colores diferentes del amarillo como son el rojo, el violeta y el azul.

Los flavonoides son un grupo de sustancias vegetales polifenólicas de bajo peso molecular que fueron descubiertas por el premio Nobel en Bioquímica Dr. Albert Szent-Gyorgi, quién en 1930 aisló de una cáscara de limón una sustancia, la citrina, y la denominó como "vitamina P" por que regulaba la permeabilidad de los capilares; también favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación.⁵⁶

3.4.1 Estructura química

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'12 (fig. 1). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Tres características estructurales son importantes para su función:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxil
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 514.

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo.

3.4.2 Biogénesis

Como se mencionó antes los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto: el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y la cadena C3 provienen de la ruta del ácido shikímico. Un tricétido se cicliza y se condensa con una molécula de ácido p-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonilCoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas. Estas a su vez son los precursores de las demás clases de flavonoides.

Es importante recalcar que este proceso de biosíntesis sustenta el hecho de que en la mayoría de flavonoides el anillo A sea *meta*-oxigenado, es decir como es característico de los anillos aromáticos originados por la vía de la malonilCoA; y por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta del ácido shikímico, generalmente es *orto*-oxigenado. Para el caso de la biogénesis de los isoflavonoides tales como las isoflavonas, pterocarpanos y rotenoides, los experimentos realizados por diversos investigadores sugieren que hay un proceso de migración 2,3. Por ejemplo se ha demostrado que la (2S)-naringenina (una flavanona) es convertida por una isoflavonasintasa de la soya (*Glycine max*) en genisteína (una isoflavona).⁵⁷

3.4.3 Absorción y metabolismo

El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos, o glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon.

Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina. Para evaluar los efectos biológicos de los flavonoides, así como de cualquier fármaco o componente alimenticio, uno de los más importantes aspectos es la biodisponibilidad, en la que influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución y eliminación.⁵⁸

3.4.4 Propiedades

Sin saberlo la humanidad ha consumido casi a diario esta clase de sustancias, pero como muchas otras que son conocidas para los científicos permanecen desconocidas para el ciudadano común. Debido al auge de la medicina alternativa, la ciencia se da a la tarea de investigar los componentes de algunas plantas que se utilizan en la medicina tradicional, y a los flavonoides se les han atribuido diferentes propiedades como:

- **Propiedades anticancerosas:** muchos han demostrado ser tremendamente eficaces en el tratamiento del [cáncer](#). En recientes años los flavonoides y sus análogos sintéticos han sido investigados in el tratamiento de cáncer ovárico, mama, cervico-uterino, pancreático y prostático.⁶⁰
- **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](#). Se ha estudiado que los flavonoides reducen el riesgo de enfermedades cardíacas.⁶⁰⁻⁶²
- **Antiinflamatorios y analgésicos:** Unas de las propiedades mas estudiadas son las antiinflamatorias y antialérgicas. En un estudio se demostró que la apigenina suprime la producción de quimiocinas Th1 y Th2 en monocitos humanos por la vía de las MAPKs.⁶³ La [hesperidina](#) por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se ha utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la [artritis](#). Los [taninos](#) tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides.⁶⁴
- **Propiedades antioxidantes:** En las plantas los flavonoides actúan como antioxidantes en células endoteliales, especialmente las catequinas del [té verde](#).⁶⁵⁻⁶⁶

4.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los flavonoides sobre la señalización intracelular inducida por el ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus* en fibroblastos gingivales humanos.

5.- OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar el efecto de Luteolina, Fisetina, Miricetina y Morina sobre la fosforilación de las MAPK'S, Akt y traslocación nuclear de NF- κ B, así como la expresión de COX-2 inducida por ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* en fibroblastos gingivales.

6.- HIPÓTESIS

Si los flavonoides poseen efectos antiinflamatorios, entonces regularan la secreción de citocinas proinflamatorias en fibroblastos gingivales humanos cuando sean inducidos con ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis*.

7.- TIPO DE ESTUDIO

- Experimental
- Descriptivo
- Comparativo
- Prospectivo

8.- MATERIALES

- Acrilamida Bis 30%-8%
- Agarosa 2% TBE/bromuro de etidio
- Agua con Dietilpirocarbonato
- Agua desionizada
- Alcohol isopropílico
- Anticuerpos monoclonales anti p-ERK rabbit
- Anticuerpos policlonales p-ERK rabbit
- Biofotómetro
- BSA a 0.5 mg/ml
- Buffer de corrido
- Buffer de lisis
- Buffer de transferencia
- Buffer PBS con ortovanadato
- Buffer TBE
- Cajas de 6 pozos
- Cajas petri
- Cámara de transferencia
- Cámaras de corrido
- Campana de esterilización
- DHEM 10% SBF+ AbAm
- DHEM 2% SBF+ AbAm
- Espectrofotómetro
- Flavonoides (Luteolina, Fisetina, Miricetina, Morina) a un stock de 1×10^{-3}
- Gradillas para tubos de ensaye
- Gradillas para tubos Eppendorf
- Hielera
- Incubadora
- Isopropanolol
- Kit para RT-PCR Invitrogen
- Líquidos de revelado
- LTA a un stock de 1mg/ml
- Marcadores de peso molecular y jugo azul para ADN
- Marcadores de peso molecular y jugo azul para proteínas
- Membrana de PVDF
- Microcentrifuga
- Micropipetas Eppendorf de 1000 μ l, 10-100 μ l, 1-2.5 μ l.
- Microscopio de objetivos invertidos CK2
- Oligos COX-2 sense y antisense
- Oligos GADPH sense y antisense
- Orbit Shaker
- Películas radiográficas
- Persulfato de amonio
- Pipeta electica
- Pipetas de 5ml, 10ml.

- Pipetas pasteur
- Puntas para micropipetas Eppendorf
- Reactivo de Sta. Cruz
- SDS 10%
- Solución de bloqueo
- Solución de Bradford
- Solución de lavado
- TEMED
- Termociclador para RT-PCR
- Tis 1.5M pH 8.8
- Trizol
- Trisi 0.5M pH 6.8
- Tubos de ensaye
- Tubos Eppendorf
- Vasos de precipitado
- Vortex

9.- MÉTODOS

9.1. CULTIVO CELULAR Y BIOPSIA DE TEJIDO GINGIVAL.

Fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron a partir de un donante sano médico, que era clínicamente libre de enfermedad periodontal. El tejido gingival se extirpó quirúrgicamente de la tuberosidad del maxilar y se lavó 6 veces con solución de Hanks suplementado con penicilina / estreptomina / fungizona. El tejido gingival posteriormente fué picado en 1-2 mm³ piezas y fué sembrado en 6 pocillos utilizando DMEM suplementado con 2 mM l-glutamina, penicilina / estreptomina / fungizona 100 U/ml, 100 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente, y el 10% de SBF. Los explantes se incubaron a 37 ° C en 5% de CO₂. Los cultivos celulares fueron alimentados semanalmente hasta los fibroblastos gingivales humanos alcanzaron la confluencia.

9.2. ANÁLISIS DE WESTERN BLOT.

Los HGF's se incubaron durante 30 min con los flavonoides (10 µM) y posteriormente se adicionó LTA (10 µg/ml) durante 15 minutos. Se realizó una cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Las proteínas se separaron por electroforesis mediante gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF. Posteriormente se incubaron los anticuerpos diluidos a 1:1000. Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y la autoradiografía se obtuvo después de exponer la película durante 2 min. Los experimentos se realizaron en 3 ocasiones por separado. Las muestras se analizaron con el sistema digital Lab-Works

9.3. INMUNOCITOQUÍMICA.

Las células se crecieron en cubreobjetos se trataron con el LTA a los tiempos y dosis indicados en los pies de figura y se fijaron por 30 minutos con 2% de paraformaldehído en PBS a 4°C y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Posteriormente se permeabilizaron durante 5 minutos con Triton 0.1% en PBS y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Para la visualización de las células se trataron durante 1 hr con el anticuerpo primario diluidos 1:100 en PBS, posteriormente se lavaron en cinco ocasiones con PBS. Las células se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo secundario anti-cabra IgG acoplado a fluoresceína (Santa Cruz Biotechnology) se utilizaron en dilución 1:100 en PBS. Las muestras se montaron en resina y se observaron por microscopia confocal. Los experimentos se repitieron en tres ocasiones por separado.

9.4. RT-PCR.

El RNA total se aisló de los fibroblastos gingivales humanos usando el método de Chomczynski y Sacchi . El RNA total (1µg) fue transcrito en forma inversa (RT) usando el equipo One Step RT-PCR (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos 5´TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT3´ (sentido codificante) y AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT (Sentido anticodificante) derivado de COX-2; 5´GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG3´ (Sentido codificante), y 3´TTG AAG TTC TCC AGC TCCTG5´(sentido anticodificante) y 5´-AGATCCACAACGGATACATT-3´ (Sentido anticodificante) derivado del gen de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min. El PCR se efectuó por 35 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda sencilla para los productos de cada gen y una banda sencilla de 309 pares de bases para GADPH. La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

9.5. ANÁLISIS DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

El análisis estadístico de los datos de densitométrico se realizó mediante la determinación de la densidad óptica integrada de cada muestra y el uso de *t*-test. Cualquier diferencia entre los dos grupos con un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

10.- POBLACIÓN DE ESTUDIO

1 x 10⁶ Fibroblastos gingivales humanos (HGF's)

11.- SELECCIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se utilizó una clona de Fibroblastos gingivales Humanos Los HGF's se observaron con membranas celulares íntegras y nítidas.

12.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

HGF's sanos al 100% de crecimiento

13.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Células que no sean HGF's

14.- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

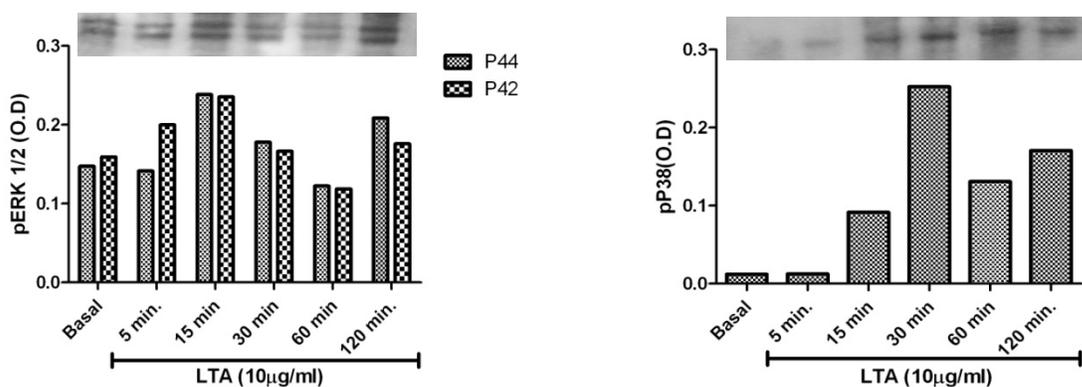
Células HGF's muertas o contaminadas

15.- RESULTADOS

Efecto del LTA sobre la fosforilación de las MAPKs en fibroblastos gingivales

La activación de las MAPKs ocurre después del tratamiento con LTA. Las MAPKs constituyen una familia conformada por ERK 1/2 (que se activa en respuesta mitogénica) y P38 (cinasa que se activa por estrés como por acción de luz ultravioleta, choque térmico o citocinas proinflamatorias).

La exposición con LTA en los cultivos de fibroblastos gingivales promovió un incremento en la fosforilación de las MAPKs de manera dependiente del tiempo (Fig 1). El máximo efecto del LTA sobre la activación de las MAPKs se observó después de los 15 min de tratamiento a una dosis de 10µg/ml para ERK, sin embargo se observó para pP38 a los 30 min. El análisis densitométrico mostró que p-ERK se activó dos veces con respecto al basal; p-P38 de 1.7 veces sobre el basal.



Fig

Figura 1. Efecto del ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* sobre la actividad de las MAPKs en fibroblastos gingivales.

Los HGFs (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la confluencia se ayunaron con DHEM + 2% de SBF por 30 minutos, al término se trataron a diferentes tiempos con LTA (10µg/ml). La reacción fue detenida con buffer de fosfato salino y se utilizaron 50µg de proteína que se separó en gel de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transfirió en una membrana de PVDF. La actividad de las cinasas se evaluó utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada. Anticuerpos contra la cinasa no fosforilada se utilizaron como control. Se utilizó una técnica de quimioluminiscencia. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

Efecto del LTA sobre la activación de Akt

Akt (proteína cinasa B), es fosforilada y activada por PKD-1. Ésta cinasa, es un importante efector del mecanismo de transducción de PI3K. LA activación de Akt resulta en la fosforilación de un gran número de sustratos que son importantes en la señalización intracelular. La activación de Akt está relacionada con el sostén de la viabilidad celular durante la liberación de mediadores inflamatorios. Por tal motivo, se decide a estudiar los efectos de LTA sobre la activación de Akt en los fibroblastos gingivales. En la figura 2 muestra que ésta cinasa se activó con el tratamiento de LTA (10µg/ml). La máxima activación se produjo después de 30 min. de tratamiento, produciéndose una activación de 1.5 veces sobre el basal.

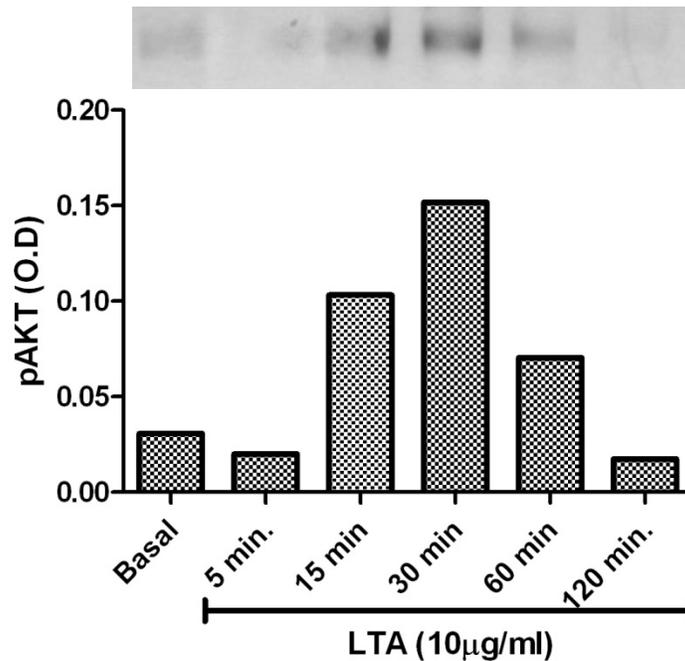


Figura 2. Efecto del ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* sobre la activación de Akt en fibroblastos gingivales.

Los HGFs (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la confluencia se ayunaron con DHEM + 2% de SBF por 30 minutos, al término se trató a diferentes tiempos con LTA (10µg/ml). La reacción fue detenida con buffer de fosfato salino y se utilizaron 50µg de proteína que separó en gel SDS-PAGE al 10% y se transfirió en una membrana de PVDF. La actividad de las cinasas se evaluó utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada. Anticuerpos contra la cinasa no fosforilada se utilizaron como control. Se utilizó una técnica de quimioluminiscencia. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

Efecto del LTA sobre la degradación de I κ B y la traslocación de NF- κ B.

La activación de NF- κ B se produce cuando el factor inhibidor de NF- κ B (I κ B) es fosforilado y de ésta forma libera a NF- κ B que es un factor clave en la liberación de mediadores de moléculas promotoras de respuestas inflamatorias como la inducción de la expresión de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico. Éste factor de transcripción se activa cuando se trasloca del citoplasma al núcleo de las células, por éste motivo, se propuso estudiar el efecto del LTA sobre la degradación de I κ B y la traslocación de NF- κ B en fibroblastos gingivales humanos. En los extractos totales encontramos que el LTA (10 μ g/ml) promovió un aumento en la fosforilación de I κ B de manera dependiente del tiempo. La máxima degradación se detectó a los 15 minutos de tratamiento. Los resultados sugieren que en LTA participa en la activación de NF- κ B debido a que se promueve la degradación de I κ B.

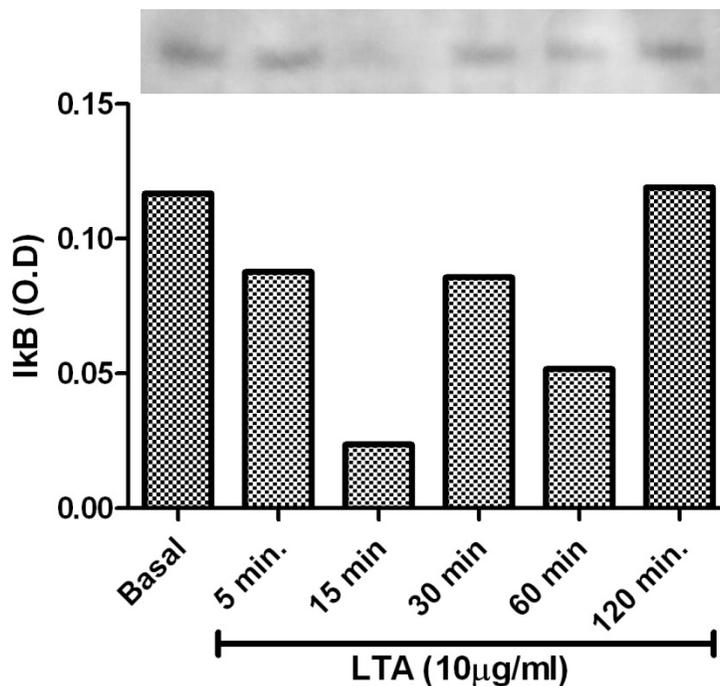


Figura 3. Efecto del ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* sobre la degradación de I κ B y la traslocación de NF- κ B en fibroblastos gingivales humanos.

Los HGFs (1x10⁶) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la confluencia se ayunaron con DHEM + 2% de SBF por 30 minutos, al término se trató a diferentes tiempos con LTA (10 μ g/ml). La reacción fue detenida con buffer de fosfato salino y se utilizaron 50 μ g de proteína que separó en gel de poliacrilamida (10%) con duodecilsulfato de sodio y se transfirió en una membrana de PVDF. La actividad de las cinasas se evaluó utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada. Anticuerpos contra la cinasa no fosforilada se utilizaron como control. Se utilizó una técnica de quimioluminiscencia. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

Efecto de los flavonoides sobre la transcripción de ciclooxigenasa-2.

Una molécula que se libera en respuesta a los procesos inflamatorios es la ciclooxigenasa-2, ésta enzima que se expresa de forma inducible, utiliza como sustrato el ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas. Por éste motivo se decidió a evaluar el efecto los flavonoides sobre la expresión de COX-2 en HGFs inducidos con ácido lipoteicoico (Fig.5). Con el propósito de evaluar la transcripción del gen se realizaron ensayos de RT-PCR. Los resultados mostraron que el tratamiento con LTA por 4 hrs promueve un incremento en la expresión de COX-2. La disminución en la expresión se observó principalmente al tratamiento con miricetina que inhibe la expresión de ciclooxigenasa al nivel basal.

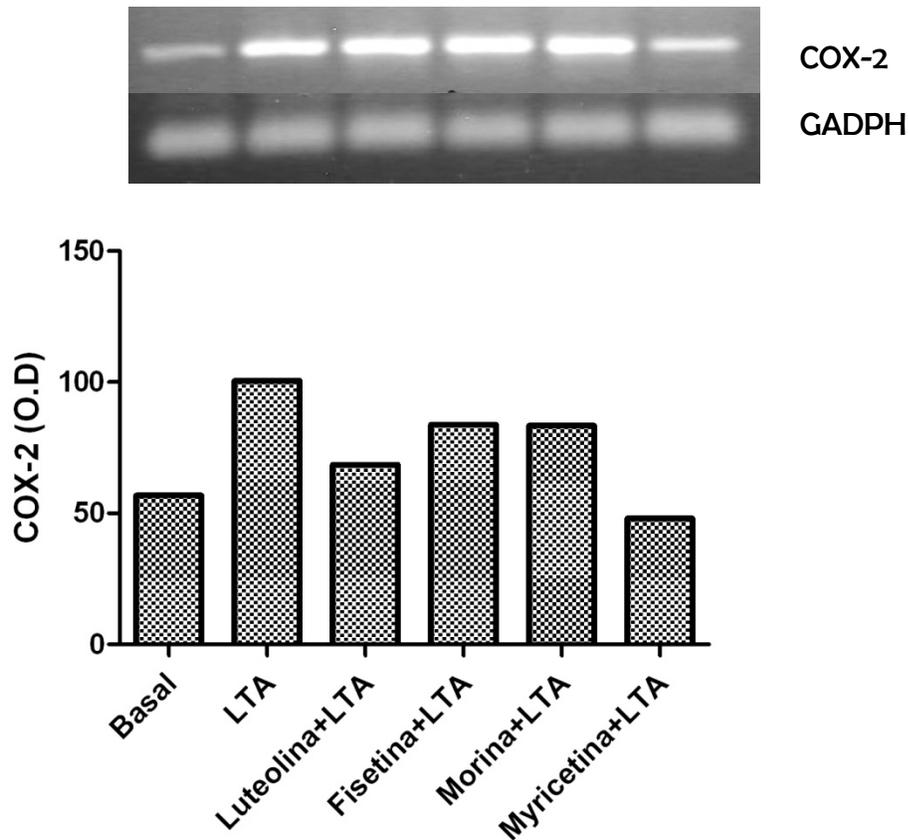
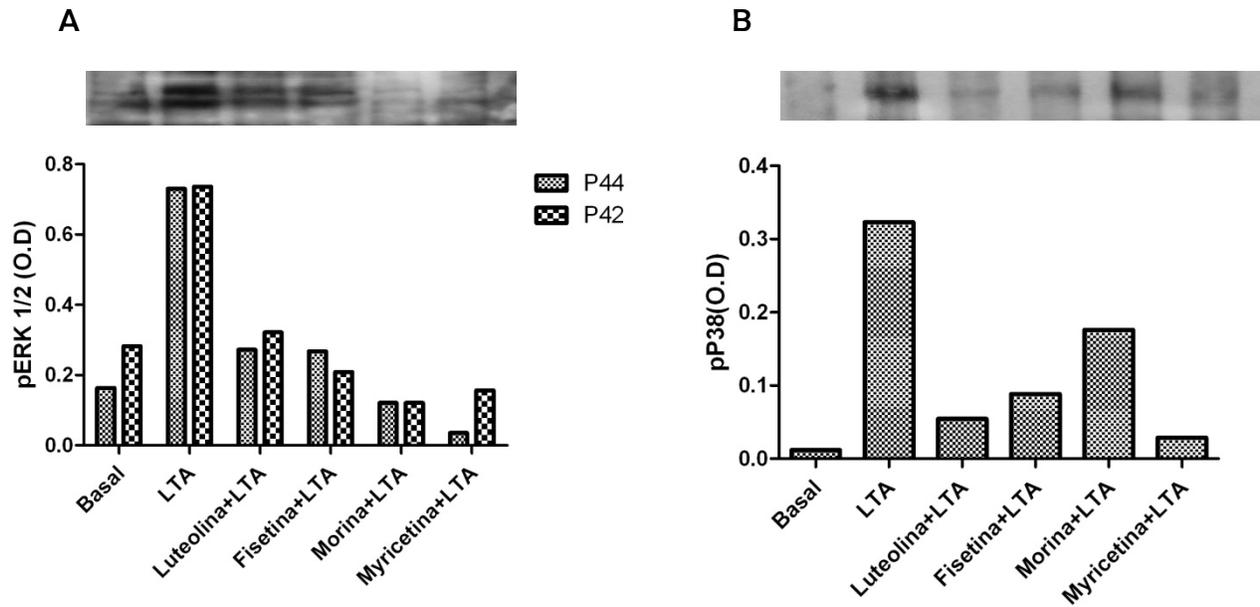


Figura 5. Efecto del ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* sobre la transcripción de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos.

Los HGFs (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la confluencia se ayunaron con DHEM + 2% de SBF por 24 horas, al término se pretrató con los flavonoides ($10 \mu\text{M}$) por 30 minutos seguidos de la inducción con LTA ($10 \mu\text{g/ml}$). Al término de la reacción se aisló en RNA y se utilizó $1 \mu\text{g}$ de RNA para el ensayo de RT-PCR, las muestras se corrieron en geles agarosa con TBE 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

Efecto de los flavonoides sobre la actividad de la MAPK's inducida por LTA en fibroblastos gingivales humanos.

Para determinar el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LTA, las células se preincubaron con luteolina, fisetina, morina y miricetina, todos a una dosis de 10 μ M durante 30 minutos y posteriormente se trataron con LTA (10mg/ml) durante 15 minutos. El tratamiento con los flavonoides bloqueó de manera significativa la fosforilación de ERK 1/2 (p44 y p42) (Fig. 6A), siendo la miricetina el flavonoide que mostró mayor inhibición en el bloqueo de la fosforilación de ERK 1/2. Posteriormente, se probó la capacidad de los flavonoides en inhibir la fosforilación de P38, la exposición de los fibroblastos gingivales humanos con LTA (10 μ g/ml) durante 15 minutos produjo un aumento en la fosforilación de de P38 (Fig 6B). Sin embargo, cuando fueron tratados posteriormente con los flavonoides (10 μ M), se bloqueó de manera significativa la fosforilación de P38 con respecto al basal.. Finalmente se evaluó el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de Akt (Fig 6D), nuevamente se encontró que el tratamiento con los flavonoides bloqueó de manera significativa la actividad de Akt.



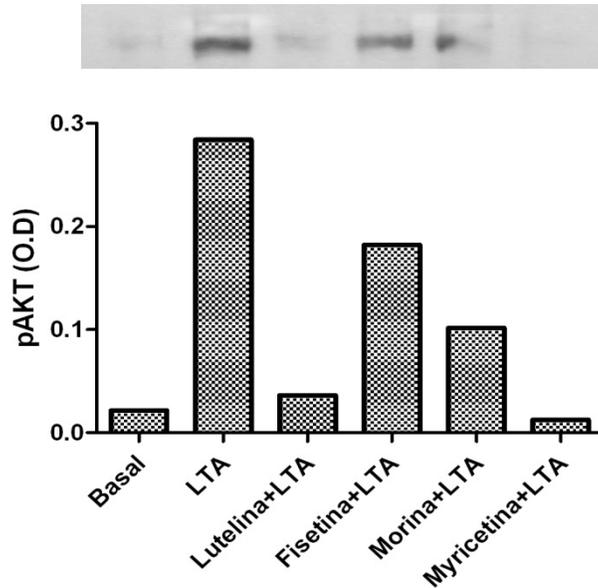
C

Figura 6. Efecto de luteolina, fisetina, morina y myricetina sobre la fosforilación de ERK1/2, p38 inducida por ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* en fibroblastos gingivales humanos.

Los HGFs (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la confluencia se ayunaron con DHEM + 2% de SBF por 24 horas, al término se pretrataron con los diferentes flavonoides (10mM) por 30 minutos y después con LTA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$). Las células se procesaron para un análisis de Western Blot usando anti-fosfo ERK1/2 (A), anti-fosfo P38 (B), anti-fosfo AKT (C), las membranas se desnudaron y se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las formas no fosforiladas de ERK1/2, p38 y JNK como controles. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

Efecto de los flavonoides sobre la localización intracelular de I κ B inducida por LTA en fibroblastos gingivales humanos.

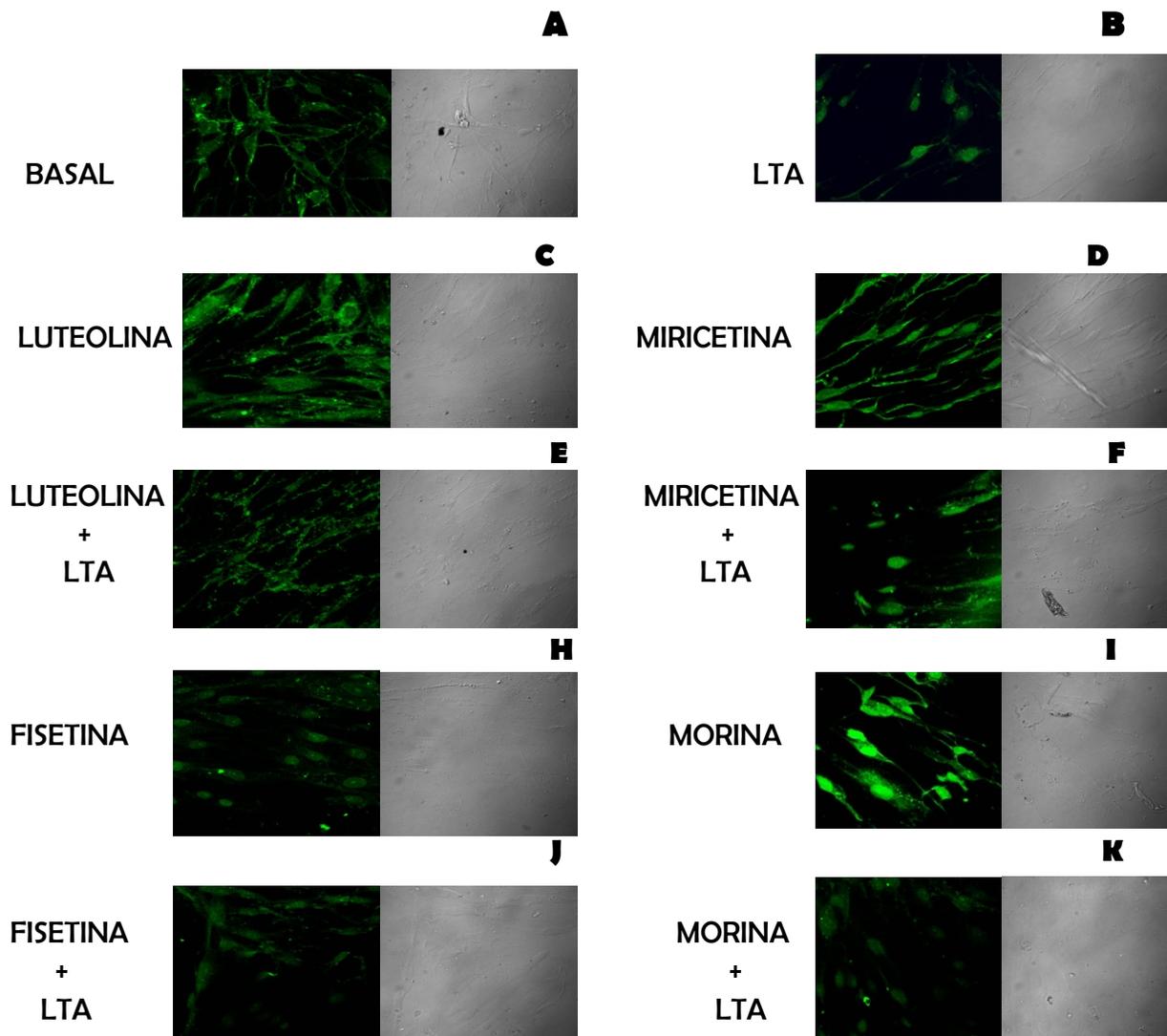


Figura 8. Efecto de luteolina, fisetina, morina y myricetina sobre la localización intracelular de I κ B inducida por ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* en fibroblastos gingivales humanos. Las células se sembraron en cubreobjetos de 0.17 mm a una densidad de 10×10^6 células/ml. Los HGFs se pretrataron con los diferentes flavonoides ($10 \mu\text{M}$) por 30 minutos y después con LTA ($10 \mu\text{g/ml}$) por 15 minutos, al término las células fijaron y se trataron con su respectivo anticuerpo por 2 horas con el anticuerpo a una dilución 1:50, se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:50. La asociación del anticuerpo secundario se observó en microscopia confocal. Los resultados son los representativos. Estudiamos el efecto de los flavonoides sobre la localización de NF- κ B en fibroblastos gingivales tratados con LTA. (Fig 8). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con LTA promueve la translocación de NF- κ B en el núcleo de las células (B). La incubación con los flavonoides inhibió la translocación de NF- κ B al núcleo por acción del LTA (E Y F). Sin embargo es importante mencionar que el tratamiento con Morina y Fisetina nos muestra que ambos compuestos promovieron que NF- κ B se translocara al núcleo y por esta razón ni morina ni fisetina bloquean la translocación (J Y K).

16.- DISCUSIÓN

Patógenos presentes en la placa dentobacteriana como *Streptococcus sanguis*, presentan en la superficie moléculas de ácido lipoteicoico, molécula que actualmente se considera como una toxina muy activa en bacterias Gram-positivas, con el potencial promover la activación de mecanismos de señalización intracelular, regular factores de transcripción y promover la expresión de un amplio conjunto de genes entre los que se encuentran ciclooxigenasa-2 e interleucina 1- β , que entre otras funciones regulan eventos que conducen a una respuesta de naturaleza inflamatoria.

Por otra parte, los flavonoides son moléculas compuestas de fenilbenzo- γ -pironas derivadas de compuestos polifenólicos que están presentes en las frutas. Un gran número de estudios señala que en estudios in vitro y en modelos animales los flavonoides regulan respuestas como el control del ciclo celular, apoptosis y controlan la transformación celular.⁶⁷⁻⁶⁹

Como la enfermedad periodontal, es una afección de naturaleza inflamatoria progresiva que destruye los tejidos que soportan y rodean a los dientes, decidimos evaluar el efecto de cuatro flavonoides, a saber, luteolina, fisetina, miricetina y morina sobre los efectos del LTA en fibroblastos gingivales humanos. Estas células son las más abundantes en la encía por este motivo en este estudio hemos establecido que el ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis*, activa vías de señalización intracelular en fibroblastos gingivales humanos (HGFs). Los resultados muestran que el tratamiento con LTA induce la activación de los miembros de las proteínas activadas por mitógeno, así como Akt, provoca la traslocación al núcleo de NF- κ B por degradación de su inhibidor y promueve la expresión de COX-2. De igual manera, se encontró que los flavonoides tienen un efecto inhibitorio en la fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$, p38 y Akt inducida por ácido lipoteicoico y solo miricetina inhibió la síntesis de COX-2.

La estructura básica de los flavonoides consiste en dos anillos benzénicos denominados anillo A y B, los cuales están unidos por un pirano heterocíclico. El anillo B está sustituido en la posición 2 por el anillo C. Los flavonoides se subdividen en función por la presencia de grupos oxi en la posición 4, un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y en la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3.

Los flavonoles como: fisetina, miricetina y morina presentan el grupo oxi en posición 4, el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y un grupo 3 hidroxilo. Así mismo, la luteolina es una flavona, carece del 3-hidroxilo.

De estos flavonoides se ha descrito que todos poseen actividades antioxidantes en macrófagos^{69,71}. Sin embargo, no existen reportes de los efectos de morina sobre la regulación de la actividad de MAP cinasas o sobre AKT por lo que en esta investigación encontramos resultados novedosos sobre el papel de morina en la regulación de la actividad de ERK $\frac{1}{2}$ y AKT, pero no muestra efecto inhibitorio sobre la activación de p38. En otra serie de experimentos encontramos que fisetina bloquea la activación de

p38 pero no de ERK ½ y de AKT. En estos ensayos encontramos que miricetina bloquea las acciones de todas las cinasas y de la expresión de COX-2.

Lo que nos sugiere que a pesar de pertenecer al mismo grupo de flavonoides poseen actividades muy diferentes o bien que las dosis efectivas varían, por este motivo nuestras investigaciones futuras estarán encaminadas en la caracterización de la EC₅₀ de cada compuesto.

Algunos investigadores⁷¹ señalan que en células PC12, fisetina induce diferenciación por activación de ERK y que la activación de ERK es bloqueada PD98059, inhibidor de MEK lo que sugiere que fisetina regula de forma directa la activación de ERK. Aunque algunos autores sugieren que PKC podría estar involucrada en este efecto⁷² o por activación de PI3K y por tanto de AKT, lo que el efecto de fisetina en fibroblastos gingivales no es mediado por AKT porque fisetina bloquea las acciones de LTA sobre la activación de AKT.

Por otra parte encontramos que a las dosis estudiadas la miricetina inhibe a ERK, p38, AKT y la expresión de COX-2. Similar a lo reportado en células epiteliales de ratón.⁷²

Con los resultados obtenidos de esta investigación podemos concluir que alguna de las características estructurales de los flavonoides regulan diferentes respuestas intracelulares, posiblemente por diferencias en hidrofobicidad es por lo que tienen diferentes efectos. Por lo que esta investigación abre infinitas posibilidades de investigación de caracterizar el efecto específico de diferentes flavonoides y utilizarlo como una herramienta terapéutica. Resulta necesario recalcar que deberá investigarse en el blanco específico que regule el proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal.

17.- CONCLUSIONES

Se ha demostrado que el ácido lipoteicoico y no solo el lipopolisacárido posee actividad antigénica, induciendo la fosforilación de las MAPKs, Akt y traslocación al núcleo de NF- κ B que a su vez, se encuentran asociadas con la señalización para la liberación de citocinas proinflamatorias. Por otra parte, los flavonoides demostraron regular los efectos ocasionados por el ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales humanos.

Los resultados obtenidos de ésta investigación aportan una información novedosa sobre la regulación de cinasas y moléculas que promueven procesos inflamatorios en la encía cuando se exponen al ácido lipoteicoico. Sin embargo, se debe realizar una mayor investigación a fin de caracterizar el control en la liberación de moléculas promotoras de la inflamación en la encía.

18.- BIBLIOGRAFÍA

1. Brown, L. J. y H. Loe. 1993. *Prevalencia, extensión, gravedad y progresión de la enfermedad periodontal*. Periodontology 2000. 2:57-71
2. American Academy of Periodontology. 1996. *Consensus report: sección de epidemiología*. Ann. Periodontol. 1:216-218.
3. D'Aiuto F, Spratt DA, Suvan J, Tonetti MS, Wilson M. *Disease severity associated with presence in subgingival plaque of Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Tannerella forsythia, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR*. J Clin Microbiol. 2008 Oct;46(10):3380-3. Epub 2008 Aug 13.
4. Gutiérrez Venegas, Gloria. Cardoso Jiménez, Patricia. *Ácido lipoteicoico, receptores y mecanismos de trasducción*. REB. Junio 2006. 25:41-49
5. Gurinder J Kaur and Daljit S Arora. *Antibacterial and phytochemical screening of Anethum graveolens, Foeniculum vulgare and Trachyspermum ammi*. BMC Complementary and Alternative Medicine 2009, 9:30
6. Ruiz Pedro A. and Dirk Haller. *Functional Diversity of Flavonoids in the Inhibition of the Proinflammatory NF- κ B, IRF, and Akt Signaling Pathways in Murine Intestinal Epithelial Cells*. Nutricional immunology 0022-3166/06 2006
7. S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras* y M.^a J. Tuñón. *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. Nutr. Hosp. (2002) XVII (6) 271-278
8. DA Luis, Aller R. *Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular*. An Med Interna (Madrid) 2008; 25: 105-107.
9. Carranza FA, Newman MG, Takei HH. *Periodontología clínica*. 9ed. México: McGraw Hill Interamericana. 2004
10. Lindhe J, Hamp S, Lo" e H. *Experimental periodontitis in the beagle dog*. J Periodontal Res 1973;8:1-10.
11. Listgarten MA, Schifter CC, Laster L. *3-year longitudinal study of the periodontal status of an adult population with gingivitis*. J Clin Periodontol 1985;12:225-38.
12. Lo" e H, Anerud A, Boysen H, et al. *Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age*. J Clin Periodontol 1986;13:431-45.
13. Page RC. *Milestones in periodontal research and the remaining critical issues*. J Periodontal Res 1999;34:331-9.
14. The American Academy of Periodontology. *International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions*. Vol. 4 No.1, 1999.
15. Armitage GC. *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions*. Ann Periodontol 1999; 4(1).
16. Marcotte H, Lavoie MC. *Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1998; 62(1): 71-109.
17. Negroni. *Microbiología Estomatológica, Fundamentos y Guía Práctica*. (2004). Editorial Panamericana. Impreso en Buenos Aires. Argentina.

18. Costerton JW. *Overview of microbial biofilms*. J Ind Microbiol 1995;15:137–40.
19. Al-Hashimi I, Levine MJ. *Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle*. Arch Oral Biol 1989;34:289–95.
20. Jenkinson HF, Lamont RJ. *Streptococcal adhesion and colonization*. Crit Rev Oral Biol Med 1997;8:175–200.
21. Kolenbrander PE. *Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems*. Annu Rev Microbiol 2000;54:413–37.
22. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, et al. *Communication among oral bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev 2002;66:486–505.
23. Chung WO, Park Y, Lamont RJ, et al. *Signaling system in Porphyromonas gingivalis based on a LuxS protein*. J Bacteriol 2001;183:3903–9.
24. Fong KP, Chung WO, Lamont RJ, et al. *Intra and interspecies regulation of gene expression by Actinobacillus actinomycetemcomitans LuxS*. Infect Immun 2001;69:7625–34.
25. Lamont RJ, El-Sabaeny A, Park Y, et al. *Role of the Streptococcus gordonii SspB protein in the development of Porphyromonas gingivalis biofilms on streptococcal substrates*. Microbiol 2002;148:1627–36.
26. McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, et al. *LuxS-based signaling in Streptococcus gordonii: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 2003;185:274–84.
27. Li YH, Lau PC, Tang N, et al. *Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in Streptococcus mutans*. J Bacteriol 2002;184:6333–42.
28. Li YH, Tang N, Aspiras MB, et al. *A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in Streptococcus mutans is involved in biofilm formation*. J Bacteriol 2002;184:2699–708.
29. Stewart PS. *Diffusion in biofilms*. J Bacteriol 2003;185:1485–91.
30. Dowson CG, Hutchison A, Woodford N, et al. *Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:5858–62.
31. Roberts AP, Cheah G, Ready D, et al. *Transfer of TN916-like elements in microcosm dental plaques*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2943–6.
32. Ohta H, Miyagi A, Kato K, et al. *The relationships between leukotoxin production, growth rate and the bicarbonate concentration in a toxin-production-variable strain of Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Microbiol 1996;142(Pt 4):963–70.
33. Marsh PD, McDermid AS, McKee AS, et al. *The effect of growth rate and haemin on the virulence and proteolytic activity of Porphyromonas gingivalis W50*. Microbiol 1994;140(Pt 4):861–5.
34. Henderson B, Poole S, Wilson M. *Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis*. Microbiol Rev 1996;60:316–41.
35. Hart TC, Kornman KS. *Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis*. Periodontol 2000 1997;14:202–15.

36. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, et al. *Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis.* J Periodontol 2000;71:1699–707
37. McGuireMK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. *The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival.* J Periodontol 1999;70:49–56.
38. Fischer, W. 1990. *Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids.* p. 123–234. In M. Kates (ed.), Handbook of lipid research, vol. 6. Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids. Plenum Press, New York, N.Y.
39. Fischer, W., H. U. Koch, and R. Haas. 1983. *Improved preparation of lipoteichoic acids.* Eur. J. Biochem. 133:523–530.
40. Bhakdi, S., T. Klonisch, P. Nuber, and W. Fischer. 1991. *Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids.* Infect. Immun. 59:4614–4620.
41. Bucher, M., K. P. Ittner, M. Zimmermann, K. Wolf, J. Hobbhahn, and A. Kurtz. 1997. *Nitric oxide synthase isoform III gene expression in rat liver is up-regulated by lipopolysaccharide and lipoteichoic acid.* FEBS Lett. 412: 511–514.
42. Cleveland, M. G., J. D. Gorham, T. L. Murphy, E. Tuomanen, and K. M. Murphy. 1996. *Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway.* Infect. Immun. 64:1906–1912.
43. Sugiyama, A., R. Arakaki, T. Ohnishi, N. Arakaki, Y. Daikuhara, and H. Takada. 1996. *Lipoteichoic acid and interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture.* Infect. Immun. 64:1426–1431.
44. Takada, H., Y. Kawabata, R. Arakaki, S. Kusumoto, K. Fukase, Y. Suda, T. Yoshimura, S. Koeguchi, K. Kato, T. Komuro, N. Tanaka, M. Saito, T. Yoshida, M. Sato, and S. Kotani. 1995. *Molecular and structural requirements of a lipoteichoic acid from Enterococcus hirae ATCC 9790 for cytokine-inducing, antitumor, and antigenic activities.* Infect. Immun. 63:57–65.
45. Shunji Sugawara, Rieko Arakaki, Hidemi Rikiishi, Haruhiko Takada. *Lipoteichoic Acid Acts as an Antagonist and an Agonist of Lipopolysaccharide on Human Gingival Fibroblasts and Monocytes in a CD14-Dependent Manner.* Infection and immunity, Apr. 1999, Vol. 67, No. 4, p. 1623–1632
46. Gao JJ, Xue Q, Zuvanich EG, Haghi KR, Morrison DC (2001) *Commercial preparations of lipoteichoic acid conation endotoxin that contibues to activation of mouse macrophages in vitro.* Infect Immun 69:751-757.
47. Blach-Olszewska Z. *Innate immunity: cells, receptors, and signalling pathways.* Arch Immunol Ther Exp 2005; 53: 245-53
48. Morgan BP, Marchbank KJ, Longhi MP, Harris CL, Gallimore AM. *Complement: central to innate immunity and Bridging to adaptive responses.* Immunol Lett 2005; 97: 171-9.
49. Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JUA, et al. *Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila.* Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:10520-10525.
50. Taguchi T, Mitchman JL, Dower SK, et al. *Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14.* Genomics 1996;32:486-488.

51. Takeuchi O, Hosmino K, Kawai T, et al. *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components.* Immunity 1999;11:443-451
52. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, et al. *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.* Nature 2001;413:732-738.
53. Schromm AB, Lien E, Henneke P, et al. *Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin induced signaling.* J Exp Med 2001;194:79-88.
54. Hellman J, Loisel PM, Tehan MM, Allaire JE, Boyle LA, Kurnick JT, Andrews DM, Sik Kim K, Warren HS (2000) *Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by Escherchia coli bacteria into serum.* Infec and Immun 68(5):2566-2572
55. Dhale MK, Overland G, Myhre AE, Stuestol JF, Hartung T, Krohn CD, Mathiesen O, Wang JE, Aasen AO(2004) *The phosphatidylinositol 3 Kinase/protein Kinase B Signaling Pathway is Activated by Lipoteichoic Acid and plays a role in Kupfer cell production of interleukin-6 (IL-6) and IL-10.* Infect and Immun 72:5704-5711
56. Singleton VL. *Flavonoids.* En: Childester CO, Mrak EM, Stewart GF (editores). *Advances in Food Research.* Academic Press, Nueva York. 149-242.
57. Winkel-Shirley, B. 2001. *Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology.* Plant Physiology 126: 485-493
58. Hollman PCH y Katan MB: *Absorption, Metabolism, and Bioavailability of Flavonoids.* En: Flavonoids in Health and Disease. Ed. Marcel Dekker, INC. New York, 1998, 22:483-522.
59. Liu HL, Jiang WB, Xie MX. *Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs.* Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2010 Jan 21.
60. G. Hertog et al. . *"Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study".* Archives of Internal Medicine 1995 Vol. 155 No. 4
61. Yochum, L. et al. *"Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women."* American Journal of Epidemiology 1999. 149:10
62. Angelone T, Pasqua T, et al. *Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by quercetin and myricetin, two red wine flavonols.* Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2010 Jan 20.
63. Huang CH, Kuo PL, et al. *Natural Flavonoid Apigenin Suppresses Th1- and Th2-Related Chemokine Production by Human Monocyte THP-1 Cells Through Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways.* J Med Food. 2010 Feb 19
64. J. Palazón, R.M. Cusidó y C. Morales. *Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino.* Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.2009
65. Łuczaj W, Zapora E, et al. *Polyphenols action against oxidative stress formation in endothelial cells.* Acta Pol Pharm. 2009 Nov-Dec;66(6):617-24
66. Manach C, Texier O, Morand C y cols.: *Compartion of the bioavailability of quercetin and catequin in rats.* Free Rad Biol Med, 1999, 27:1259-1266.
67. Crozier A, Burns J, Aziz AA. *Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: Measurements and bioavailability.* Biol. Res. 2000; 33: 79-88.

68. Volante SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ. *Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin)*. Carcinogenesis 2005; 26: 1450-1456.
69. Hou DX, Kai K, Li JJ. *Antocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: Structure-activity relationship and molecular mechanisms*. Carcinogenesis 2004; 25: 29-36.
70. Justino GC, Rodrigues M, Florêncio MH, Mira L. *Structure and antioxidant activity of brominated flavonols and flavanones*. J. Mass Spectrom., 2009 44: 45968
71. Sagara Y, Vanhnasy J and Maher P. *Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation*. J of Neurochem. 2004; 90: 1144-55.
72. Lee KM, Kang NJ, Han JH, Lee KW, Lee HJ. *Myricetin down-regulates phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse epidermal cells by blocking activation of nuclear factor kappa*. B. J. Agric Food Chem. 2007; 14: 9678-84.