



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

División de Estudios de Posgrado e Investigación  
**Laboratorio de Bioquímica**

Efecto de la miricetina sobre la expresión de COX-2 y  
síntesis de IL-1 $\beta$  en fibroblastos gingivales humanos (HGF)  
estimulados con ácido lipoteicoico (LTA) obtenido de  
*Streptococcus sanguinis*.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

C.D. OSCAR ALONSO LUNA

TUTOR: Dra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS



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.

## Resumen

---

La enfermedad periodontal afecta los tejidos de soporte del diente, y es uno de los grandes problemas de salud en México y el mundo. El factor etiológico más importante que induce a dicha enfermedad esta dado por la colonización microorganismos sobre una matriz de glucopolímeros (placa dentobacteriana), aunque también influyen enfermedades sistémicas y factores genéticos. La respuesta inflamatoria en el periodonto es el principal mecanismo que promueve la reabsorción exacerbada de hueso alveolar y subsecuente pérdida dental, donde las bacterias Gram+ y su ácido lipoteicoico, toxina con características inmunoestimuladoras parecidas al lipopolisacárido, tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria. Estudios previos en nuestro laboratorio comprobaron que el ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguinis* estimuló la fosforilación de de las MAPKs ERK 1/2 y p38, AKT, degradación de IκB y subsecuente translocación NF-κB al núcleo, así como la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos, confirmando su capacidad de activar vías de señalización relacionadas con la inflamación.

Por otra parte, los flavonoides son sustancias polifenólicas producto del metabolismo secundario de las plantas, los cuales, han demostrado múltiples beneficios para el cuerpo humano entre los que se encuentran propiedades antiinflamatorias, cardioprotectoras, antioxidantes y antioncogénicas; por lo que decidimos evaluar la capacidad de miricetina, un flavonol, en regular los efectos del ácido lipoteicoico de *S sanguinis* en fibroblastos gingivales humanos. Mediante ensayo de MTT, no se observaron efectos citotóxicos de miricetina al ser incubada en fibroblastos gingivales humanos a diferentes dosis. De igual manera, los ensayos de Western blot, RT-PCR y ELISA demostraron que miricetina reguló con tendencia estadísticamente significativa hacia niveles basales la fosforilación de ERK ½ y p-38, degradación de IκB, expresión génica y protéica de COX-2 y síntesis de IL-1β en fibroblastos gingivales humanos inducidos con ácido lipoteicoico de *S sanguinis*, siendo las dosis de 10 y 15μM las más efectivas. Tomando en cuenta todos nuestros resultados, podemos concluir que miricetina es eficaz como regulados del proceso inflamatorio en la enfermedad periodontal, por lo que puede servir como coadyuvante en el tratamiento de esta patología.

## Justificación

---

En todo el mundo se considera erróneamente que la pérdida de dientes es consecuencia natural del envejecimiento. Las enfermedades bucodentales como la enfermedad periodontal, son un problema de salud de alcance mundial que afecta en mayor frecuencia a países en vías de desarrollo como México, implicando un costo considerable para su tratamiento, estimado entre el 5 y 10% del gasto de países industrializados, y muy por encima de países en desarrollo. Por tal motivo, el acceso a la atención bucodental es limitada; en consecuencia, en la mayoría de los casos hay una pérdida considerable de órganos dentarios con subsecuente deterioro funcional, problemas digestivos y disminución en la calidad de vida.

La enfermedad periodontal afecta a los tejidos de soporte del diente. Se ha estimado que la mayoría de los niños de todo el mundo presenta signos de gingivitis, estadio inicial de dicha enfermedad; mientras entre los adultos es más común la periodontitis crónica.

En el nuevo informe sobre el programa de salud bucodental mundial de la OMS se estableció que los sistemas de salud bucodental de los países deben estar orientados hacia los servicios de atención primaria en salud y prevención, abordando factores de riesgo modificables como hábitos de higiene bucodental, ingesta de carbohidratos, falta de calcio y micronutrientes, así como el tabaquismo.

La respuesta inflamatoria como parte de los mecanismos de defensa del huésped ha sido ampliamente estudiada. Dicha respuesta, es desencadenada por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de microorganismos que residen en la placa dentobacteriana; siendo este, el principal mecanismo para promover el desarrollo de enfermedad periodontal.

El tratamiento clásico de la enfermedad periodontal involucra un trabajo biomecánico que elimine los factores que desencadenan una respuesta inflamatoria crónica en el huésped, como la placa dentobacteriana, cálculo supra e infragingival y tejido de degranulación; todo lo anterior, en combinación con diversos coadyuvantes. Sin embargo, uno de los principales coadyuvantes en el tratamiento de dicha enfermedad, el gluconato de clorhexidina, posee diversos efectos adversos como disgeusia, pigmentación de tejidos duros y blandos, achatamiento de papilas interproximales y citotoxicidad en células del ligamiento periodontal, por lo que es indispensable la búsqueda de coadyuvantes mas eficaces y no tóxicos en la terapia periodontal.

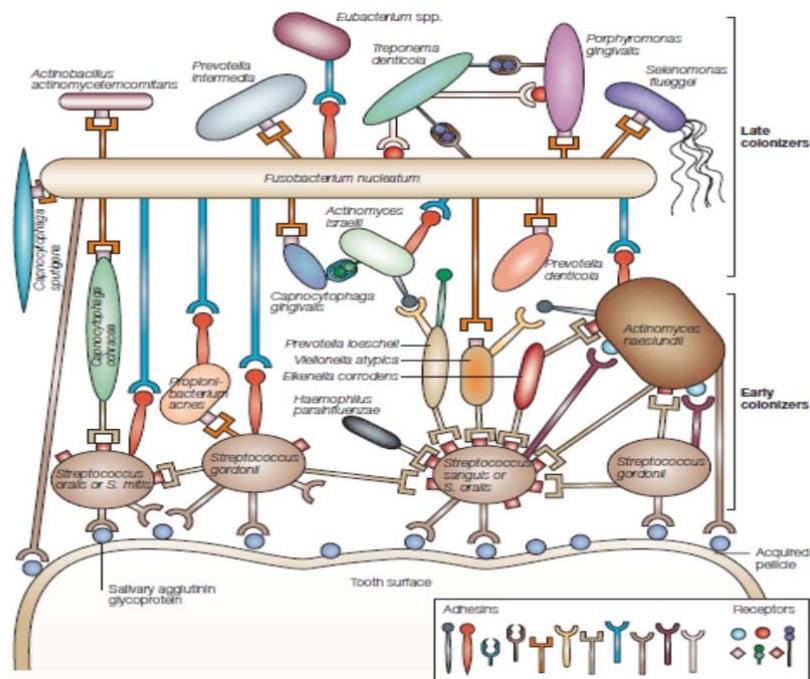
Existen investigaciones que sustentan las múltiples propiedades benéficas en la salud de los flavonoides, destacando propiedades antioxidantes, antiinflamatorias así como su capacidad de inhibir procesos carcinogénicos; y donde a su vez, no han presentado considerables efectos adversos en su empleo. Por lo que evaluamos el efecto de miricetina sobre los mecanismos de transducción de señales celulares y síntesis de citocinas proinflamatorias promovidas por una toxina bacteriana, el LTA, y su posible rol en el control y manejo de la enfermedad periodontal.

# Antecedentes

## 1. Enfermedad Periodontal

La enfermedad periodontal es un conjunto de reacciones inflamatorias que afectan a los tejidos de soporte del diente, y que en estadios tardíos conlleva a la exfoliación dentaria. Además, ésta enfermedad está asociada con infecciones vasculares sistémicas como la aterosclerosis y la estenosis coronaria.<sup>1</sup> Por mucho tiempo se describió que dicha enfermedad era causada por la acumulación de placa dentobacteriana; sin embargo, trastornos inmunológicos, genéticos u otras enfermedades sistémicas son importantes para su desarrollo.

La enfermedad periodontal se inicia por la acumulación de una biopelícula sobre la superficie del diente seguida de la invasión bacteriana de los tejidos gingivales. En la periodontitis, la coagregación es un proceso central para la formación de biopelículas, sobre la cual, bacterias genéticamente distintas inician una interconexión mediante adhesinas específicas.<sup>2</sup> **Fig. 1**



**Fig. 1. Modelo de la formación de biopelícula dental.** La película adquirida cubre la superficie del diente, la cual, es reconocida por colonizadores primarios como *Streptococcus gordonii*, *sanguis* y *mitis*. Posteriormente, otras especies colonizan mediante receptores y adhesinas para formar la placa dentobacteriana. *American Society for Microbiology, 2002.*

En la placa dental, colonizadores primarios como *Streptococcus gordonii* y otros estreptococos orales expresan adhesinas en su superficie, las cuales, proveen una base sobre la cual otros colonizadores bacterianos se agregan. En el inicio se pensó que la cantidad de placa que se formaba era la responsable para inducir periodontitis, pero en el presente, se favorece la hipótesis en la que la calidad de la placa, en términos de sus constituyentes microbianos, es la responsable.

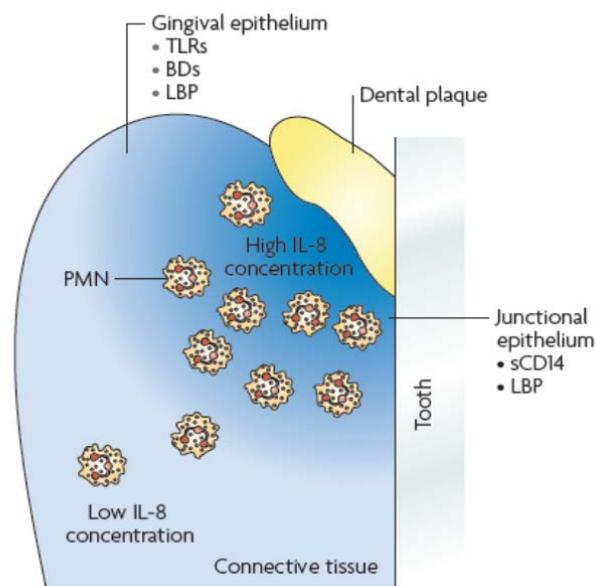
*Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus* son los principales patógenos, aunque otras especies como *Treponema denticola* se han implicado en el desarrollo de periodontitis, aún con el hecho de que la mayoría de las espiroquetas no han sido cultivadas exitosamente. En estudios recientes, utilizando técnicas moleculares filogenéticas, se han implicado también nuevas especies o filotipos con periodontitis, caries y halitosis.<sup>3-9</sup> También se observó que el ácido lipoteicoico de colonizadores primarios como *Streptococcus sanguinis*, bacteria que se consideraba inocua en el desarrollo de enfermedad periodontal, activan múltiples cascadas de señalización celular como la activación de la vía de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K), fosforilación de AKT y glucógeno sintasa cinasa (GSK3).<sup>10</sup>

Además, un estudio reportó que la pérdida de inserción y reabsorción ósea, ocurren paralelamente junto con el incremento de interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF).<sup>11</sup>

## 2. Respuesta inmune en salud periodontal

La interrelación entre microorganismos y los mecanismos de respuesta inmune innata es la base del mecanismo inmunopatológico. Debido a su yuxtaposición con los tejidos periodontales del hospedero, la placa dentobacteriana es un constante desafío para el sistema inmune innato del hospedero. En sitios de salud clínica, este desafío puede ser benéfico, ya que se promueve una resistencia a la colonización de los periodontopatógenos y activación de otras respuestas poco entendidas. En contraste, en sitios de enfermedad, la infección claramente resulta en la alteración de los mecanismos normales de defensa en el periodonto. Los tejidos periodontales no contienen una capa de mucosa amplia que prevenga el contacto entre la comunidad microbiana y la superficie de células epiteliales, a diferencia del intestino. De hecho, aunque tanto los tejidos periodontales como intestinales están en relación cercana con comunidades microbianas, se ha visto que ambos tejidos poseen estrategias diferentes para luchar con la presencia constante de estimulación microbiana.

El epitelio intestinal está conformado por una capa sencilla de células conectadas por uniones estrechas, donde subyacente a ésta, tejido linfático altamente especializado (Placas de Preyer) reconoce y absorbe antígenos. En contraste, el epitelio gingival y en particular el epitelio de unión es altamente poroso. Las células del epitelio de unión son conectadas por unos pocos de desmosomas y ocasionales uniones gap, lo que permite el llenado de líquido en los espacios intracelulares.<sup>12</sup> Para hacer frente a la constante estimulación microbiana, el periodonto posee una expresión altamente orquestada de mediadores de defensa del sistema inmune innato. **Fig. 2**



**Fig. 2. Tránsito de neutrófilos a través del tejido periodontal.** El estado de defensa en tejidos periodontales sanos es controlado por la expresión coordinada por mediadores como IL-8, facilitando el tránsito de neutrófilos. Además, células del epitelio gingival expresan diferentes receptores que ayudan a la neutralización de patógenos. *Nature reviews/Microbiology*, Julio del 2010.

La expresión coordinada de E-selectina, molécula de adhesión intracelular (ICAM) e interleucina-8 (IL-8) facilitan el tránsito de neutrófilos desde los tejidos gingivales altamente vascularizados hasta el surco gingival donde forman una pared entre los tejidos del hospedero y la biopelícula de placa dental.<sup>13-18</sup> La arquitectura tisular del epitelio de unión facilita el tránsito de éstas y otras células. Se calcula que aproximadamente 30,000 neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) transitan a través del tejido periodontal cada minuto.<sup>18,19</sup>

La presencia aumentada de neutrófilos en tejidos del hospedero es un signo de infección bacteriana. Individuos con deficiencias congénitas tanto en el número como en el tránsito de neutrófilos (deficiencia leucocitaria tipo 1 y 2) o quienes poseen neutropenia debido a inducción química con agentes antimicóticos como la ciclofosfamida invariablemente desarrollan periodontitis.<sup>20-23</sup> Por lo que las observaciones anteriores muestran que este componente celular en la salud periodontal es muy importante.

Los tejidos periodontales también expresan muchos otros mediadores innatos, como la defensina- $\beta$  1, 2 y 3,<sup>24-25</sup> CD14 tanto soluble como adherida a membrana<sup>26-27</sup> y la proteína de unión a lipopolisacárido (LBP).<sup>28</sup> Además, altos niveles de CD14 soluble en líquido crevicular fueron asociados con bolsas periodontales de menor profundidad.<sup>26</sup> En adición, ARNm de LBP son más altamente expresados en tejidos saludables que en tejidos enfermos, donde interesantemente, células del epitelio gingival son una fuente de LBP.<sup>28</sup> Esos estudios implican fuertemente a CD14 con LBP con la eliminación de bacterias y sus componentes, sugiriendo que ambos actúan de manera similar en la capa mucosa del intestino, por reducción de las interacciones bacterianas con el epitelio. Como en el epitelio intestinal, los tejidos gingivales expresan un amplio rango de TLRs.<sup>29-31</sup> Sin embargo, no es conocido si células epiteliales gingivales regulan la expresión de esos receptores para reducir las interacciones microbianas de manera similar a las observadas en el epitelio intestinal.

## 2.1 Rol de las citocinas en salud periodontal

La respuesta inmune innata a bacterias orales comensales por parte del hospedero puede contribuir al estado de defensa altamente protector del tejido periodontal.<sup>32</sup> En respuesta a bacterias orales, las capas más externas del epitelio gingival, las cuales están en contacto directo con la flora comensal, producen interleucina-8 (IL-8) y defensinas- $\beta$ .<sup>33,34-39</sup> Aunque ratones libres de gérmenes han sido usados como modelos experimentales para etiología microbiana de la periodontitis,<sup>40</sup> este modelo no ha sido usado aun para estudiar la contribución de bacterias comensales en el estado de defensa innato del periodonto. El hallazgo de que niveles de IL-1 $\beta$  en tejidos periodontales de ratones criados convencionalmente son más altos que los libres de gérmenes,<sup>41</sup> indican que el tejido periodontal puede responder a la colonización comensal y no es meramente una barrera de protección pasiva. En contraste, estudios usando ratones libres de gérmenes<sup>42-51</sup> y con mutaciones en sus TLR<sup>52</sup> han establecido que bacterias intestinales comensales juegan una parte activa en el establecimiento tanto inmune como de mecanismos de protección innata, así como su participación en el desarrollo del tejido. Estos estudios muestran que bacterias comensales contribuyen para un estado inflamatorio controlado en el intestino,<sup>51,52</sup> que es muy similar al observado en tejidos periodontales sanos.

La presencia de IL-1 $\beta$  en el tejido periodontal de ratones libres de gérmenes, aunque a niveles bajos, es consistente con la teoría de que las citocinas pueden contribuir en el proceso de homeostasis del hospedero independientemente del proceso de colonización bacteriana. El periodonto contiene tejidos de autoregeneración, incluyendo el ligamento periodontal y el epitelio gingival.<sup>12,53</sup> En adición, la matriz extracelular y la colágena tipo I del tejido conectivo ayuda a estabilizar los tejidos periodontales, mientras las fibronectinas afectan morfología celular, migración y diferenciación.<sup>54</sup> La regulación coordinada de esa proliferación y diferenciación celular es controlada por mecanismos de señalización del hospedero. Los mecanismos de señalización mantienen la homeostasis del tejido periodontal por regulación de células epiteliales así como de células residentes en el tejido conectivo y células hematopoyéticas. El líquido crevicular es un suero y exudado tisular local que es depositado alrededor de cada superficie dental y provee una representación exacta de concentraciones séricas y tisulares de mediadores inflamatorios.<sup>55,56</sup> Citocinas asociadas con inflamación, como IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF) y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) son encontradas en niveles mas bajos en líquido crevicular de sitios de salud periodontal<sup>57</sup> que en sitios enfermos.<sup>58</sup> Por consiguiente, junto con la expresión de componentes de defensa innata, el periodonto continuamente expresa citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular que son involucradas en el mantenimiento de la homeostasis periodontal. En la actualidad, la contribución relativa de bacterias comensales y el desarrollo en la expresión de citocinas, quimiocinas y células de adhesión en salud periodontal no son bien conocidas.

### 3. Mecanismos moleculares de la enfermedad periodontal

#### 3.1. Inmunidad innata

Los humanos estamos expuestos a millones de microorganismos patógenos diariamente a través de inhalación, ingesta o contacto directo. Nuestra habilidad para evitar la infección depende en parte del sistema inmune adaptativo, el cual recuerda contactos previos con patógenos específicos y los neutraliza cuando vuelven a atacar. Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa se desarrolla lentamente en la primera exposición a un agente patógeno nuevo, ya que los clones específicos de células T y B que se activan y se expanden, tomando cerca de una semana para que las respuestas sean efectivas. Además, una sola bacteria puede producir al menos 20 millones de progenies en un solo día, por lo que en las primeras horas y días de la exposición, el sistema inmune innato nos protege contra la infección. Las respuestas inmunes innatas no son específicas para un patógeno en particular y están coordinadas por el sistema complemento y células fagocíticas que reconozcan patrones conservados de los patógenos, activándose rápidamente para destruirlos.<sup>59</sup>

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

- Reclutamiento de células inmunes hacia los sitios de infección e inflamación, mediante la producción de factores químicos denominados citocinas.
- Activación de la cascada del sistema complemento para identificar bacterias, activar células y promover el aclaramiento de células muertas o de los complejos de anticuerpos
- Identificación y remoción de sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa, a cargo de leucocitos.
- Activación del sistema inmune adaptativo mediante la presentación de antígeno.

En los tejidos gingivales, las infecciones polimicrobianas causan inflamación gingival y resorción del hueso alveolar. La respuesta inmune mediada por el huésped contra esos microorganismos es lo que principalmente conlleva a la destrucción de los tejidos periodontales, aunque hay otros factores que pueden influir o exacerbar dicha destrucción. De manera general, los microorganismos residen en una matriz de glucopolímeros en donde crean un nicho simbiótico que les permite su supervivencia. Los microorganismos y sus endotoxinas, estimulan entonces a células y síntesis de mediadores químicos que regulan el proceso inflamatorio, como parte de la inmunidad innata. Se ha demostrado que linfocitos Th1 y Th2 están involucradas en la respuesta inmune adaptativa en pacientes con enfermedad periodontal.<sup>60,61</sup>

## 3.2. Inflamación

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

La respuesta inflamatoria consta principalmente de 2 fases: una reacción vascular y una reacción celular. Muchos tejidos y células están implicados en éstas reacciones, incluyendo el líquido y las proteínas del plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y los elementos celulares y extracelulares del tejido conectivo. Las células circulantes incluyen neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son los mastocitos, que rodean íntimamente a los vasos sanguíneos, los fibroblastos del tejido conectivo; los macrófagos residentes y los linfocitos. El matiz extracelular consta de proteínas estructurales (colágena y elastina), glicoproteínas adherentes (fibronectina, laminina, colágeno no fibrilar, tenascina, etc.) y proteoglicanos. La membrana basal es un componente especializado de la matriz extracelular que consta de glicoproteínas adherentes y proteoglicanos.

La inflamación se divide en patrones agudo y crónico. La inflamación aguda tiene un comienzo rápido (segundos o minutos) y es de duración relativamente corta; sus principales características son la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos. La inflamación crónicas de larga duración y se asocia, histológicamente con la presencia de leucocitos y macrófagos, angiogénesis, fibrosis y necrosis tisular.

Las reacciones vascular y celular de la inflamación aguda y crónica están mediadas por factores químicos derivados de proteínas plasmáticas o de células, y se producen en respuesta o están activadas por estímulos inflamatorios. Tales mediadores, actuando aisladamente, en combinación o en secuencia, amplifican a continuación la respuesta inflamatoria e influyen sobre su evolución. Las mismas células o tejidos necróticos, también pueden desencadenar la elaboración de mediadores de la inflamación. La inflamación termina cuando el agente agresor se neutraliza y los mediadores segregados se fragmentan o disipan. Además, existen mecanismos activos antiinflamatorios que sirven para controlar la respuesta y evitar que cause daño excesivo en el hospedero.

### 3.3. Mediadores químicos de la inflamación

Los mediadores se originan en el plasma o las células. Los mediadores derivados del plasma como proteínas del complemento y cininas, las cuales, están presentes en el plasma en forma de precursores que deben activarse, habitualmente por una serie de escisiones proteolíticas, para adquirir sus propiedades biológicas. Los mediadores derivados de células están normalmente secuestrados en gránulos intracelulares que necesitan segregarse (como la histamina) o son sintetizados *de novo* (prostaglandinas y citocinas) en respuesta a estímulos. Las células representativas de la respuesta inmune innata son las plaquetas, los neutrófilos/macrófagos y los mastocitos, aunque las células mesenquimales como endotelio, músculo liso, fibroblastos y epitelios también pueden inducirse para elaborar algunos de éstos mediadores.

La producción de mediadores activos está desencadenada por productos microbianos o por proteínas del huésped, tales como las proteínas del complemento, cinina y sistema de coagulación que a su vez, son activadas por microbios y tejidos dañados. La mayoría de los mediadores lleva a cabo su actividad biológica por la unión inicial con receptores específicos sobre las células diana. Algunos, sin embargo, tienen actividad enzimática directa (como las proteasas lisosomales) o median el daño oxidativo (especies reactivas de oxígeno y nitritos). Un mediador puede estimular la liberación de otros mediadores por las mismas células diana, donde dichos mediadores sintetizados *de novo* pueden ser idénticos o similares a los mediadores que estimularon su producción, teniendo actividades opuestas, proporcionando mecanismos de amplificación o contrarrestando la acción inicial del mediador. Los mediadores pueden actuar sobre uno o pocos tipos celulares diana, tienen diversos blancos o incluso pueden tener diferentes efectos sobre distintos tipos de células.

#### 3.3.1 Aminas vasoactivas.

Las dos aminas vasoactivas, histamina y serotonina, son especialmente importantes por que se encuentran preformadas, y por lo tanto, están entre los primeros mediadores que se liberan durante la inflamación.

La histamina es secretada principalmente por los mastocitos situados en la periferia de los vasos sanguíneos. Ésta se libera por degradación en respuesta a varios estímulos como agresión física, reacciones inmunitarias, anafilatoxinas, proteínas liberadoras de histamina derivadas de leucocitos, neuropéptidos y citocinas. La histamina induce a la vasodilatación de las arteriolas y aumenta la permeabilidad vascular de las vénulas cuando se une a los receptores H<sub>1</sub> de las células endoteliales.

La serotonina por su parte, está presente principalmente en plaquetas y células enterocromafines. Su liberación por parte de las plaquetas es activada cuando estas se agregan tras contactar con la colágena, trombina, Adenosindifosfato (ADP) y complejo antígeno-anticuerpo.

Se sabe que los niveles de histamina están incrementados en pacientes con periodontitis, siendo el tabaquismo un factor que exacerba su liberación.<sup>62</sup> En un estudio se observó que fibroblastos gingivales humanos expresaban el receptor H<sub>1</sub> de histamina, y responden a ésta produciendo IL-8, dicha producción fué sinérgicamente

aumentada ante la coestimulación con  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\alpha$ , y LPS a través de la vía de señalización de las MAPKs y  $NF-\kappa B$ , resaltando la importancia de la histamina en la amplificación de la respuesta inmune en fibroblastos gingivales.<sup>63</sup> De igual manera, se ha visto que el tratamiento de histamina en fibroblastos gingivales humanos promueve la movilización de calcio intracelular de manera dependiente a la dosis, y sorprendentemente, dicha respuesta fue bloqueada ante el tratamiento con poli(I:C); dicho efecto fue invertido ante el tratamiento de inhibidores selectivos de PKC y p38, lo que sugiere que poli (I:C) regula la movilización de calcio inducida por histamina a través de la activación de PKC y p38.<sup>64</sup>

### 3.3.2. Sistema complemento.

El sistema complemento se define como el conjunto de proteínas que funcionan en la inmunidad innata y de adaptación, así como en la defensa contra agentes microbianos. Las proteínas del complemento se encuentran inactivas en el plasma, y van de C1 a C9; cuando se activan, se convierten en enzimas proteolíticas que degradan a otras, formando una cascada de amplificación enzimática. El principal evento en la elaboración de las funciones biológicas de complemento es la activación del tercer componente, C3. La escisión de C3 puede ocurrir por una de las 3 vías: la vía clásica, que se desencadena por la fijación de C1 al anticuerpo (IgM o IgG) combinado con el antígeno; la vía alterna que se desencadena por moléculas de superficie microbiana y otras sustancias tóxicas, en ausencia del anticuerpo, y la vía lectina, en la cual, la lectina del plasma fijadora de manosa se une a los carbohidratos de los microbios y activa directamente al C1.

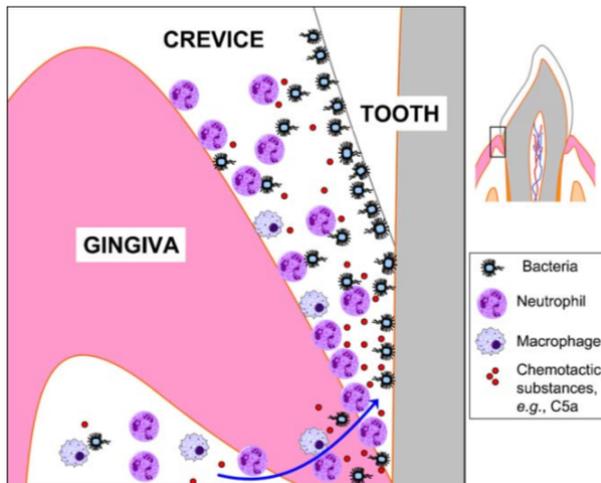
Las funciones biológicas del complemento entran en 2 categorías generales: lisis por complejo de ataque a la membrana y los efectos de sus fragmentos proteolíticos.

- Fenómenos vasculares: C3a y C5a estimulan la liberación de histamina, aumentando la permeabilidad vascular. C5a activa la vía lipoxigenasa del metabolismo de ácido araquidónico en neutrófilos y monocitos, produciendo la liberación de mediadores inflamatorios.
- Adhesión, quimiotaxis y activación de leucocitos: C5a es un poderoso agente quimiotáctico para neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos.
- Fagocitosis: C3b y su producto de escisión iC3b (inactivo), cuando se fija a la pared de la célula bacteriana, actúan como opsoninas y favorecen la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos, que portan receptores en la superficie de las células para éstos fragmentos del complemento.

C3 y C5 son los principales mediadores inflamatorios. Además de los mecanismos de activación comentados, estos pueden activarse por varias enzimas proteolíticas en el exudado inflamatorio, como la plasmina y varias enzimas lisosomales liberadas por neutrófilos. La activación del complemento está estrechamente controlada por proteínas reguladoras en las células y en la circulación. La presencia de estos inhibidores en las membranas celulares de huésped les protegen del daño inapropiado durante las reacciones protectoras contra los microbios.

Un gran número de observaciones clínicas e histológicas sugieren que el complemento está involucrado en el desarrollo de periodontitis. Fragmentos del sistema complemento activados son encontrados abundantemente en fluido crevicular de pacientes con periodontitis, mientras que están ausentes o en bajas concentraciones en pacientes sanos.<sup>65-69</sup> EL fluido crevicular representa un exudado inflamatorio contenido en el surco gingival.<sup>70</sup> En general, el complemento puede ser encontrado en el líquido crevicular hasta en un 70-80% de su concentración en el suero, sin embargo, ciertos fragmentos activados pueden ser encontrados en niveles mucho más altos en el líquido crevicular, reflejando la generación local.<sup>71-73</sup> Componentes del complemento y sus productos escindidos que componen toda la cascada ha sido encontrados en encías inflamadas crónicamente o en líquido crevicular de pacientes con periodontitis crónica. El líquido crevicular de pacientes con periodontitis, muestra actividad hemolítica dependiente del complemento, sugiriendo su presencia en exudados inflamatorios crónicos.<sup>74-78</sup> Interesantemente, la inducción de inflamación gingival experimental en voluntarios humanos causa elevación progresiva de los elementos escindidos del complemento, pudiendo así, correlacionarlos con los signos clínicos de inflamación. Específicamente éste estudio evaluó la escisión del factor B, C3 y C4 en muestras de líquido crevicular, detectando respectivamente la conversión de Bb, C3a pero no de C4a, sugiriendo la activación preferencialmente de la vía alterna.<sup>69</sup> Por otra parte, el componente central del complemento C3 está dentro del 5% de los genes que son desregulados después de la terapia periodontal.<sup>79</sup> Además, la conversión de C3 en C3c en líquido crevicular decrece posterior a la terapia periodontal.<sup>80</sup> Mecánicamente, la activación del complemento puede promover la inflamación periodontal predominantemente vía vasodilatación de inducida por C5a, incrementando la permeabilidad vascular y el flujo de exudado inflamatorio, así como el reclutamiento de células inflamatorias especialmente neutrófilos.<sup>81-82</sup> Se ha pensado que los neutrófilos son los elementos clave en el daño inflamatorio mediado por el huésped con periodontitis y pueden ser encontrados en gran cantidad en el surco gingival.<sup>83-84</sup> Neutrófilos extravasados entran al surco gingival a través del epitelio de unión, el cual, bajo condiciones de inflamación es ampliamente ocupado (cerca del 60%) por el tráfico de neutrófilos.<sup>85</sup> **Fig.3** Interesantemente, en el caso de periodontitis agresiva, el angioedema gingival severo presente es vinculado con la función desregulada del complemento, específicamente por deficiencia de del inhibidor C1.<sup>86</sup> Además, un polimorfismo de un solo nucleótido de C5 (rs17611), el cual se asocia con el incremento de los niveles séricos de C5 y susceptibilidad a fibrosis hepática, fue mostrado por ser más prevalente en pacientes con periodontitis que en pacientes sanos.<sup>87,88</sup> Un estudio inmunohistoquímico mostró expresión débil de CD59 en tejido gingival de pacientes con periodontitis comparados con los controles sanos, sugiriendo una protección reducida de esos tejidos enfermos contra daño tisular mediado por el complejo de ataque a membrana. Curiosamente, incluso cantidades subletales de C5b-9 pueden causar destrucción periodontal. Respecto a esto, concentraciones no letales de C5b-9 inducen la activación de PLA<sub>2</sub>, liberación de ácido araquidónico y síntesis de PGE<sub>2</sub>.<sup>89-91</sup> Este mecanismo puede potencialmente causar pérdida ósea periodontal, ya que induce la reabsorción ósea mediada por PGE<sub>2</sub> en cultivos de órganos de manera dependiente de C6.<sup>92</sup>

Las anteriores observaciones sugieren la participación del complemento en la inflamación periodontal y patogénesis.



**Fig. 3. Efectos de C5a sobre el tránsito de neutrófilos hacia el surco gingival.** Células inflamatorias, en su mayoría neutrófilos, son atraídas hacia el surco gingival en respuesta a señales quimiotácticas como la anafilatoxina C5a. *Biochemical Pharmacology 2010.*

### 3.3.3. Sistema cinina.

Éste sistema produce péptidos vasoactivos de las proteínas plasmáticas denominados cininógenos por la activación de proteasa específicas denominadas calicreínas. La activación del sistema cinina da lugar a la liberación del nanopéptido vasoactivo denominado, bradicinina. La bradicinina aumenta la permeabilidad vascular y produce contracción del músculo liso, dilatación de los vasos sanguíneos y dolor, dichos efectos, similares a los de la histamina. La cascada que finalmente produce cinina se desencadena por la activación del factor de Hageman (factor XII de la vía intrínseca de la coagulación) ante el contacto con superficies cargadas negativamente, tales como la colágena y membranas basales. Se produce el un fragmento del factor XII que convierte la precalicreína plasmática en una forma proteolítica activa, calicreína, la cual, escinde un precursor glucoprotéico del plasma, el cininógeno de alto peso molecular para producir bradicinina. La acción de la bradicinina es de vía corta por que se inactiva rápidamente por una enzima denominada cininosa.

Se ha observado que la bradicinina estimula la producción de IL-8 en fibroblastos gingivales humanos, además de que IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  potenciaron la producción de IL-8. Dicho efecto fue reducido en presencia del antagonista del receptor B2, HOE 140; mientras el antagonista del receptor B1, Lys-(des-arg9,Leu8), no tuvo efecto. Además, un el tratamiento con un inhibidor de PKC, BIS, redujo el efecto estimulador de bradicinina con IL1- $\beta$  y TNF $\alpha$  sobre la producción incrementada de IL-8, pero no afectó la producción de IL-8 en células estimuladas solo con ambas citocinas, mostrando el papel de bradicinina en la sobre regulación de IL-8 en fibroblastos gingivales humanos vía PKC.<sup>93</sup> En adición, se mostró que la expresión del receptor B1 y B2 en línea celular osteoblastos humanos GM-63 y en fibroblastos gingivales humanos es mejorada por la inducción de citocinas como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ ; IL-1 $\beta$  mediante la vía no canónica de NF- $\kappa$ B, activación de JNK y p38 pero no de ERK 1/2 y TNF $\alpha$  mediante la vía canónica p50/p65,

demostrando que la sobre expresión de los receptores B1 y B2 por citocinas proinflamatorias puede ser un mecanismo importante en la formación de prostaglandinas, exacerbando a su vez, los procesos de reabsorción ósea.<sup>94</sup> Se ha demostrado que bradicinina tiene la capacidad de movilizar calcio intracelular en fibroblastos gingivales humanos cuando se une a su receptor B2; además, se ha evaluado el papel de bradicinina en la expresión de los receptores tipo toll, mostrando que bradicinina regula la expresión de TLR2 a nivel transcripcional y traduccional por activación de PKC y AKT, promoviendo el proceso inflamatorio.<sup>95</sup> Con estas evidencias, se enfatiza el rol de las cininas en la fisiopatogenia de la periodontitis.

### 3.3.4. *Metabolitos del ácido araquidónico. Prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas.*

Cuando las células se activan por diversos estímulos, los lípidos de membrana se hidrolizan para generar mediadores lipídicos biológicamente activos que sirven como señales intra o extra celulares, afectando una variedad de procesos biológicos incluyendo la inflamación y la homeostasia. Se piensa que los mediadores lipídicos son autocoides u hormonas de poca amplitud que se forman rápidamente, ejercen sus efectos localmente y después decaen espontáneamente o se destruyen enzimáticamente.

El ácido araquidónico es un ácido poliinsaturado de 20 carbonos (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico) que se deriva de diversas fuentes o por conversión de un ácido graso esencial, el ácido linoleico. No se encuentra libre en la célula pero se esterifica normalmente de los fosfolípidos de la membrana. Se libera de éstos fosfolípidos por acción de las fosfolipasas celulares (PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLB, PLC, y PLD), que a su vez pueden activarse por estímulos mecánicos, químicos y físicos o por otros mediadores como C5a. Los metabolitos del ácido araquidónico, también denominados eicosanoides, se sintetizan por dos clases principales de enzimas: ciclooxigenasas (prostaglandinas y tromboxanos) y lipoxigenasas (leucotrienos y lipoxinas). Los eicosanoides se unen a los receptores ligados a la proteína G en muchos tipos celulares y pueden mediar prácticamente en cada uno de los pasos de la inflamación. Pueden encontrarse en exudados inflamatorios y sus síntesis aumenta en los sitios de inflamación.

#### 3.3.4.1. Ciclooxigenasa y sus funciones. Vía ciclooxigenasa

El ácido araquidónico se libera de los fosfolípidos de la membrana vía hidrólisis del enlace sn-2 por la PLA<sub>2</sub>.<sup>96</sup> Posteriormente es oxigenado por la ciclooxigenasa (COX) para formar prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) y subsecuentemente ser reducida por la misma COX para formar prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).<sup>97</sup> La liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular determinan la cantidad de producción de eicosanoides que ocurre; por lo tanto, la PLA<sub>2</sub> determina los niveles de eicosanoides.<sup>98,99</sup> Se ha visto que 15 genes son responsables de codificar las diversas enzimas PLA<sub>2</sub> que existen en mamíferos.<sup>100</sup>

Existen 3 diferentes clases de PLA<sub>2</sub>: PLA<sub>2</sub>secretadas (sPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2</sub>independientes de calcio del grupo intracelular VI (GVI iPLA<sub>2</sub>) y PLA<sub>2</sub>citosólicas del grupo IV (GIV cPLA<sub>2</sub>). 10 distintas PLA<sub>2</sub> de bajo peso molecular (14-19 kDa) han sido identificadas a la fecha.<sup>100</sup> Las sPLA<sub>2</sub> requieren calcio para hidrolizar el enlace sn-2 de los fosfolípidos y utilizar His-Asp en su mecanismo catabólico. Sin embargo, ha sido demostrado que las sPLA<sub>2</sub> no tienen selectividad estricta por ácidos grasos e inducen la liberación de ácido araquidónico en una manera independiente.<sup>101</sup>

iPLA<sub>2</sub> tienen un alto peso molecular (85 kDa) comparado con sPLA<sub>2</sub>, y mantienen su actividad enzimática completa aún en ausencia de calcio. Se ha pensado que las iPLA<sub>2</sub> son enzimas constitutivas y que juegan un rol importante en la remodelación de la cadena acil del fosfolípido.<sup>102</sup> Aunque iPLA<sub>2</sub> no requieren calcio para su actividad enzimática, se ha reportado que son sobre-reguladas por calcio o factores dependientes de calcio en algunos modelos celulares,<sup>100</sup> aunque su exacta regulación permanece bajo investigación.

Mientras cada clase de PLA<sub>2</sub> libera ácido araquidónico desde los fosfolípidos de las membranas celulares, solo la cPLA<sub>2</sub>α parece tener como principal función la liberación de ácido araquidónico para la producción de eicosanoides.<sup>100,103</sup> Su alta especificidad por la posición sn-2 del ácido araquidónico es responsable de su rol específico. La translocación de cPLA<sub>2</sub>α desde el citosol al aparato de Golgi, retículo endoplasmático y membrana nuclear es sobrerregulada en presencia de calcio intracelular, el cual se une en el dominio C2 terminal-N de cPLA<sub>2</sub>α.<sup>104</sup> La unión del calcio al dominio C2 permite que el dominio catalítico interactúe con el ácido araquidónico.<sup>105</sup> Se ha demostrado que cPLA<sub>2</sub>α es sobrerregulada por la fosforilación de MAPK, cinasas de interacción con MAPK y cinasa calcio-calmodulina II.<sup>106-108</sup> La evaluación en ratones cPLA<sub>2</sub>α mutados demostró una producción de eicosanoides disminuida, subsecuente disminución en la reactividad de vías aéreas, reproductividad femenina defectuosa y disminución en la agregación plaquetaria.<sup>109-111</sup> También, ratones noqueados para cPLA<sub>2</sub>α mostraron una disminución en la incidencia y severidad de artritis.<sup>112</sup>

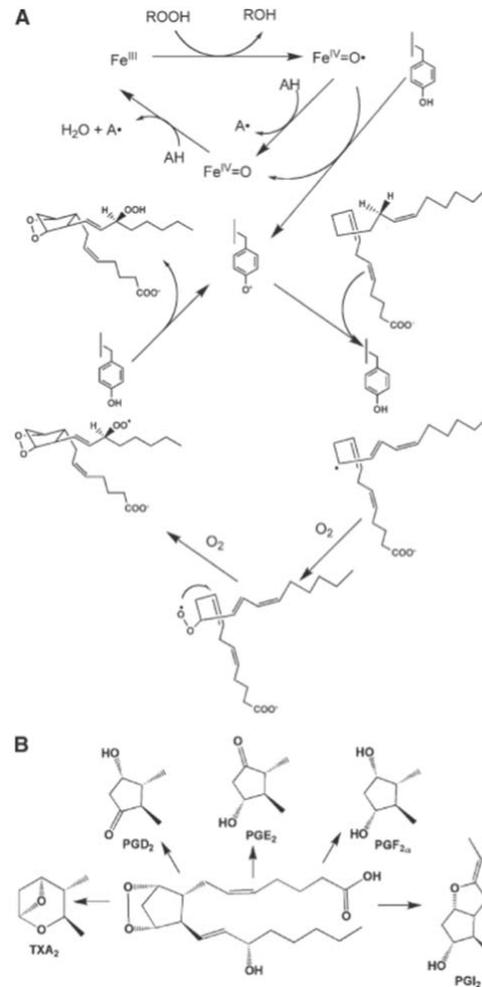
En 1971, Sir John Vane reportó que la aspirina, salicilatos e indometacina inhibían la síntesis de prostaglandinas de manera dependiente de la dosis. Se pensó que una sola enzima COX era responsable de producir prostaglandinas, y subsecuentemente, de varios efectos como dolor, inflamación, fiebre, agregación plaquetaria y citoprotección gastrointestinal. Se encontró que COX es un glicoproteína con grupo hemo unida a membrana, muy abundante en retículo endoplásmico de células productoras de prostanooides. Dentro de sus principales acciones se encuentran la ciclación del ácido araquidónico, en el cual un grupo hidroperóxido es añadido para formar prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), así como la reducción del naciente grupo hidroperóxido de PGG<sub>2</sub> para formar un producto hidroxilado, prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).<sup>113</sup> Se ha señalado también que COX puede producir prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) y otras prostaglandinas cuando el ácido linolénico gamma (DHLA) está presente como sustrato en lugar del ácido araquidónico.

En 1991, se encontró una segunda isoforma de COX, llamada COX-2. Aunque la original COX-1 y COX-2 son similares en estructura y actividad catalítica, se observó que son genéticamente distintas, ya que COX-1 está codificada por el cromosoma 9q32-9q33.3

y COX-2 en el cromosoma 1q25.2-1q25.3.<sup>114,115</sup> COX-1 y COX-2 humanas son homodímeros de 576 y 581 aminoácidos respectivamente que contiene oligosacáridos ricos en manosa, uno de los cuales facilita su plegamiento. Un cuarto oligosacárido, presente en COX-2, regula su degradación. Considerando el 60% de identidad en su secuencia, no es sorprendente que su estructura tridimensional sea muy semejante. Cada subunidad del dímero consiste de 3 dominios: el dominio del factor de crecimiento epidermal (residuos 32-72), el dominio de unión a membrana (residuos 73-116) y el dominio catalítico que comprende la mayor parte de la proteína, el cual contiene sitios activos ciclooxigenasa y peroxidasa sobre cada lado del grupo prostético hemo.<sup>116-119</sup> Sobre el lado opuesto de la proteína desde el dominio de unión a membrana, el sitio activo peroxidasa consiste en un grupo hemo posicionado en la parte inferior de la hendidura. La estructura del sitio activo ayuda a explicar la promiscuidad del sustrato específica para la peroxidasa de COX, el cual reduce un amplio rango de hidroperoxidasas orgánicas e inorgánicas.<sup>120</sup> Aunque el domo hidrofóbico puede aparentemente explicar la preferencia de la peroxidasa por peróxidos orgánicos; mutaciones del domo en residuos de alanina tiene poco efecto sobre la actividad peroxidasa o sustratos específicos.

El sitio activo de COX se localiza sobre el lado opuesto del grupo hemo, desde el sitio activo de peroxidasa hasta la parte superior de un canal en forma de L que se origina en el dominio de unión a la membrana. La boca del canal consiste en el vestíbulo, el cual debe abrirse antes de que sustratos o inhibidores puedan pasar más abajo del canal. Cuando aminoácidos se unen al sitio activo de COX, el grupo carboxilo permanece en la constricción así como el grupo metilo- $\omega$  en la parte estrecha del canal. Esto coloca al carbono 13 del aminoácido en la curva del canal en estrecha proximidad con Tyr-385, la cual es un aminoácido importante catalíticamente hablando para la reacción de COX.

El primer paso en la conversión del ácido araquidónico en PGG<sub>2</sub>, se efectúa mediante la extracción del átomo de hidrógeno pro-S del carbono 13, y los pasos que siguen son consistentes con el mecanismo de peroxidación lipídica no enzimática. La catálisis por COX requiere que la enzima sea primero activada, un proceso dependiente de la actividad de peroxidasa. La reducción de 2 electrones de un sustrato peróxido resulta en la oxidación del hemo férrico en un radical catiónico oxoferril porfirina. La transferencia de un electrón al grupo hemo desde Tyr-385 de la proteína, genera un radical tirosil en el sitio activo de COX. Éste radical, como se señaló anteriormente, se coloca perfectamente para extraer el hidrógeno pro-S del carbono 13 del aminoácido, iniciando la reacción de ciclooxigenasa. El paso final de la reacción es la reducción del radical peroxil al hidroperóxido para formar PGG<sub>2</sub>. Por lo tanto, COX activada puede llevar a cabo múltiples cambios sin necesidad repetir el paso de activación. Después de iniciada la reacción, la función primaria de la peroxidasa es reducir el hidroxiperóxido 15 de PGG<sub>2</sub> al correspondiente alcohol de PGH<sub>2</sub>.<sup>116,121</sup> **Fig. 4.**



**Fig. 4. Reacción de la ciclooxigenasa.** A: el ciclo de la peroxidasa permite la extracción de un átomo de hidrógeno de Tyr-385 formando un radical tirosil, activando el sitio activo de ciclooxigenasa. El radical tirosil extrae el átomo de hidrógeno pro-S del carbono 13 del aa, iniciando la reacción de ciclación. B: Conversión de  $\text{PGH}_2$  en PGs biológicamente activas. *Journal of Lipid Research* 2009.

COX-1 es constitutivamente expresada en la mayoría de los tejidos. Su gen, *Ptgs-1*, codifica para un ARNm de 2.8Kb que es relativamente estable. En contraste, el gen de COX-2, *Ptgs-2*, es un gen inmediato temprano que es activado por una amplia variedad de estímulos inflamatorios y proliferativos, y el ARNm de 4kb cambia rápidamente debido a la presencia de secuencias inestables en la región 3' no traducida.<sup>116-117</sup> La diferencia en los patrones de expresión génica ofrece una explicación obvia para la existencia de 2 isoformas de COX. Por una parte, se pensó que la producción de PGs dependiente de COX-1 regula múltiples funciones constitutivas y fisiológicas, como la producción de Tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) por plaquetas, funciones de citoprotección gástrica en mucosa, síntesis de prostanoides compartimentalizados en nefronas los cuales regulan diferentes aspectos de la fisiología renal así como la regulación del desarrollo en diferentes tejidos incluyendo el timo; mientras que COX-2 juega el rol predominante en la formación de prostaglandinas durante estados fisiopatológicos como inflamación y tumorigénesis. Dicha hipótesis llevó al rápido desarrollo de inhibidores selectivos para COX-2, los cuales poseen actividad antiinflamatoria sin

efectos gastrointestinales.

Otra evidencia que apoya las diferencias en la expresión de ambas isoformas es que la región promotora del gen de COX-1 humana carece de caja TATA y CAAT,<sup>122</sup> permitiendo la expresión constitutiva de COX-1 en la mayoría de las células, a diferencia de COX-2 que posee múltiples secuencias de regulación transcripcional en su región promotora, incluyendo caja TATA, motivos NF- $\kappa$ B, 2 sitios AP-2, 3 sitios Sp1, 2 sitios NF- $\kappa$ B, un motivo CRE y una caja E. La expresión de COX-2 puede ser inducida por múltiples citocinas y factores de crecimiento, vía activación de proteínas de regulación transcripcional que actúan sobre su sitio promotor.<sup>123</sup> Así, COX-2 es aparentemente el controlador primario de la síntesis de PGE<sub>2</sub> en respuesta a la inflamación.

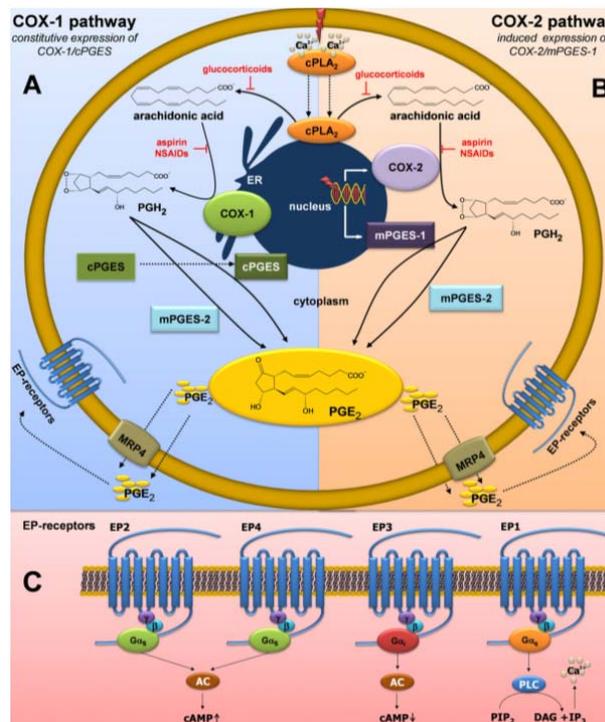
El acetaminofén es ampliamente usado como analgésico y antipirético, sin embargo, no inhibe ni a COX-1 ni COX-2 en tejidos periféricos, por lo que Flower y cols. postularon que el acetaminofén inhibía a una molécula desconocida de COX en el cerebro.<sup>124</sup> Chandrasekharan y cols. aislaron y clonaron una variante de empalme de COX-1 canina en 2002. Ésta molécula designada como COX-3, difiere de COX-1 en que un intron es incluido en el ARNm y expresión de proteína. La presencia del transcrito ARNm de COX-3 con un tamaño aproximado de 5.2kB fue subsecuentemente confirmado en células humanas; además se encontró que COX-3 está presente en altas concentraciones en tejido de corteza cerebral y cardiaco. La regulación de la transcripción de COX-3 aparentemente es idéntica a la de COX-1. COX-3 es similar a COX-1 y COX-2 en términos de estructura y función enzimática. Sin embargo, la retención del intron en COX-3 parece disminuir su actividad enzimática en comparación con COX-1 y COX-2. Interesantemente, dosis terapéuticas de acetaminofén inhiben COX-3 *in vitro*, por lo que acetaminofén representa un candidato para la inhibición de COX-3 en SNC.<sup>125</sup>

- Síntesis y funciones de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

PGH<sub>2</sub> por sí misma no juega un rol importante como un mediador inflamatorio. Mas bien, sirve como sustrato de varias enzimas específicas que producen prostanoideos estables. Esos prostanoideos incluyen a la PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina), PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub> y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y las enzimas que los producen a partir de PGH<sub>2</sub> se denominan sintasas. Debido a que las prostaglandinas sintasas (PGS) típicamente catalizan la generación de los productos finales activos, se les refiere como sintasas terminales.<sup>126</sup> Sin embargo, los mecanismos a partir de los cuales PGH<sub>2</sub> es convertida en un producto u otro no son del todo bien entendidas.

PGE<sub>2</sub> es sintetizada a partir de PGH<sub>2</sub> por PGES citosólicas (cPGES) o por PGES microsomales/asociadas a membrana 1 y 2 (mPGES-1 y 2). cPGES son constitutivas y abundantemente expresadas, además de ser preferencialmente asociadas con COX-1. La expresión de mPGES-1 es inducida por citocinas y factores de crecimiento similar a COX-2, con los cuales se asocia. Esto sugiere la coordinada regulación de COX-2 y mPGES-1 por vías de señalización similar, como la de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, expresión constitutiva de mPGES-1 en diversos tejidos y células también es reportada, mientras

que la expresión de mPGES-2 es sobre-regulada bajo condiciones patológicas como el cáncer. PGE<sub>2</sub> es transportada por la proteína 4 resistente a multidrogas dependiente de ATP (MRP4) o por difusión a través de la membrana para actuar en o cerca de su sitio de secreción.<sup>127</sup> Después, PGE<sub>2</sub> actúa localmente a través de su unión con uno o más de sus cuatro receptores afines, EP1 a EP4.<sup>128</sup> Los receptores EP pertenecen a la amplia familia de receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G, con diferentes vías de señalización y segundos mensajeros. EP1 se acopla con Gα<sub>q</sub>, y su unión con PGE<sub>2</sub> promueve la elevación del calcio libre citosólico. La señalización de EP2 y EP4 mediado por Gα<sub>s</sub> incrementa el AMPc intracelular. EP3 se considera como un receptor inhibitorio que se acopla con Gα<sub>i</sub> y disminuye la concentración de AMPc. Como regla para mediadores lipídicos de acción local, PGE<sub>2</sub> no es almacenada pero es rápidamente metabolizada. Las principales enzimas responsables de su rápida inactivación son las enzimas citosólicas ketoprostaglandina 15 reductasa<sup>13</sup> e hidroxiprostaglandina deshidrogenasa, las cuales, la ésta última es desregulada en cáncer.<sup>129</sup> **Fig. 5**



**Fig. 5.** Biosíntesis de PGE<sub>2</sub>, interacción con sus receptores a fin y principales rutas de acción farmacológica. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010.

Además de otros prostanoides, se ha descrito que PGE<sub>2</sub> es un regulador de diversas funciones fisiológicas que van desde reproducción de las neuronas hasta funciones metabólicas e inmunes. En el sistema nervioso central, PGE<sub>2</sub> está implicada en la regulación de la temperatura corporal, actividad de vigilia y sueño, así como respuestas de hiperalgesia como parte del comportamiento de la enfermedad. Se ha descrito también como un factor de la formación y regeneración ósea. Una de las más importantes características de PGE<sub>2</sub>, es su actividad vasodilatadora, a través de la cual participa en los procesos de implantación del embrión y la modulación hemodinámica

del riñón.<sup>130</sup> Sin embargo, su efecto sobre la contracción y relajación de células del músculo liso no son solo evidentes en recién nacidos y control en la presión sanguínea, también en la motilidad gastrointestinal, donde es importante en la coordinación de movimientos peristálticos. Diferencias en la expresión y distribución de receptores EP en el tracto gastrointestinal determinan funciones adicionales de PGE<sub>2</sub> en el intestino. Además de la motilidad, PGE<sub>2</sub> es importante en la secreción y funciones de la barrera mucosa. La primera línea de defensa del sistema inmune innato intestinal es la secreción de mucinas, las cuales protegen la mucosa. La secreción de mucinas por las células epiteliales gástricas puede ser inducida por PGE<sub>2</sub>. Además, en modelos de ratones lesionados, se demostró que PGE<sub>2</sub> protege pequeñas células epiteliales contra la apoptosis inducida por radiación.<sup>131</sup>

En inflamación, tiene un particular interés debido a que esta involucrada en todos los procesos fundamentales de los signos clásicos de la inflamación: rubor, calor, tumor y dolor.<sup>132</sup> Rubor y edema resultan del incremento de flujo sanguíneo hacia el tejido inflamado mediado por incremento de la dilatación arterial mediada por PGE<sub>2</sub> y permeabilidad microvascular aumentada. La hiperalgesia es mediada por PGE<sub>2</sub> a través de la señalización del receptor EP1 y actuar sobre neuronas sensoriales periféricas en el sitio de inflamación, así como en zonas neuronales centrales. Debido a ese rol en esos procesos básicos inflamatorios, se ha denotado a PGE<sub>2</sub> como un mediador proinflamatorio clásico. La relevancia de las prostaglandinas durante la promoción de la inflamación es enfatizada por la efectividad de los AINES, que actúan como inhibidores de COX.<sup>133</sup> Sin embargo, el rol de PGE<sub>2</sub> en la regulación es cada vez más compleja. Estudios en ratones noqueados para receptores EP individuales claramente reveló que no solo actúa como mediador proinflamatorio, si no que también ejerce respuestas antiinflamatorias.<sup>128</sup> Como mediador proinflamatorio, PGE<sub>2</sub> contribuye a la regulación de perfiles de expresión de citocinas en células dendríticas (CDs) y ha sido reportado censar la diferenciación de células T hacia respuestas Th1 o Th2. Un reciente estudio demostró que la señalización EP-PGE<sub>2</sub> en CDs y células T facilita la diferenciación Th17 dependiente de IL-23.<sup>134</sup> Adicionalmente, PGE<sub>2</sub> es fundamental para inducir el fenotipo de migración de CDs, permitiendo su migración hacia órganos linfáticos.<sup>135</sup> Simultáneamente, la estimulación temprana con PGE<sub>2</sub> durante la maduración induce la estimulación de moléculas coestimuladoras de la superfamilia de TNF sobre células dendríticas, resultando en una activación de células T mejorada.<sup>136</sup> En contraste, se demostró que PGE<sub>2</sub> suprime la diferenciación Th1, funciones de células B y reacciones alérgicas.<sup>137,138</sup>

La desregulación de COX ha sido descrita en la patogénesis de varias enfermedades y en diferentes tipos de tumores.<sup>139</sup> La sobreexpresión de COX-2 conlleva a elevados niveles de PGE<sub>2</sub> y es asociada particularmente con cáncer de colon, pulmón y mama,<sup>140</sup> aunque un reciente estudio encontró baja expresión de COX-2 en cáncer primario de mama, comparado con el tejido sano que lo rodea.<sup>141</sup> Además, PGE<sub>2</sub> fué implicada en varios procesos tumorigénicos, además de la involucración de receptores EP específicos. Por ejemplo, PGE<sub>2</sub> facilita la progresión del tumor a través de la estimulación de la angiogénesis vía EP2, media la invasión celular y metástasis vía EP4, además de promover la supervivencia celular mediante la inhibición de apoptosis vía numerosas señales de transducción celular. Sin embargo, células tumorales inducidas por PGE<sub>2</sub> han sido implicadas en la evasión de tumores y vigilancia inmunológica.<sup>142</sup>

Los mecanismos por los cuales PGE<sub>2</sub> participa en la supresión de respuestas inmunes antitumorales pueden ser multifacéticas. Se demostró que células de cáncer de pulmón secretoras de PGE<sub>2</sub> inducen la expresión de Foxp3 en células TCD4+ y desarrollar un fenotipo regulatorio. Además, la presencia de PGE<sub>2</sub> puede mejorar la función inhibitoria de células T reguladoras humanas. Adicionalmente, en ambientes tumorales, puede afectar a las CD alterando sus perfiles de expresión de citocinas, resultando en una reducción en la activación de células T citotóxicas específicas antitumorales.<sup>142</sup> Este hecho enfatiza la complejidad del sistema regulatorio de los prostanoideos, pero también ofrece prometedores blancos para la intervención terapéutica.

A últimas fechas se está estudiando el papel de COX-2 y sus productos en el desarrollo y progresión de la enfermedad periodontal. Se demostró que la biopelícula subgingival y no la supragingival induce la expresión de COX-2 la síntesis de PGE<sub>2</sub> e IL-6 en fibroblastos gingivales humanos, regulando la destrucción del hueso alveolar, implicando a ésta enzima y sus productos en la patogenia de la enfermedad periodontal.<sup>143</sup>

Por otro lado, la inmunohistoquímica en muestras de tejido gingival con anticuerpo anti-PGEs, resultó positivas tanto en fibroblastos, células endoteliales, músculo liso epitelio y células inmunes. Dichas células posteriormente fueron cultivadas y se evaluó la expresión de PGEs y COX-2, mostrando una mayor expresión de COX-2, mPGE-1 y síntesis de PGE<sub>2</sub>, mientras mPGES-2 y cPGEs no mostraron alteración en su expresión, todo esto ante el estímulo de citocinas proinflamatorias. Además, se observó una producción disminuida de PGE<sub>2</sub> en fibroblastos noqueados para el gen de mPGE-1 comparados con fibroblastos normales, sugiriendo que dichas células son una fuente importante de mPGEs-1, la cual contribuye a la síntesis de PGE<sub>2</sub> en periodontitis.<sup>144</sup> Lo anterior concuerda con otro estudio donde se mostró mediante análisis de western blot y microarreglos que la expresión de ARNm y protéica inducida por mPGE-1 fue sobre regulada por TNF $\alpha$ , acompañada de la expresión de COX-2 y producción de PGE<sub>2</sub> vía JNK y NF- $\kappa$ B, a diferencia de la expresión de mPGE-2 y cPGEs, donde no hubo diferencias en la expresión.<sup>145</sup> De igual manera, el tratamiento con inhibidores selectivos de COX-2 reguló la profundidad de bolsa y el sangrado al sondeo, lo que se propone como un tratamiento adjunto en la terapia periodontal.<sup>146</sup> Se ha demostrado también que lipopolisacáridos de bacterias periodontopatógenas inducen la expresión de COX-2 e iNOS y síntesis de PGE<sub>2</sub> en fibroblastos humanos gingivales humanos, dicho efecto, fué parcialmente inhibido ante el tratamiento con un inhibidor de p38, mostrando el papel de éstas células en la expresión de COX-2 y síntesis de PGE<sub>2</sub> y su papel en la enfermedad periodontal.<sup>147</sup> Estas investigaciones aportan información clave del rol de COX-2 y sus productos en la enfermedad periodontal.

- Productos de la ciclooxigenasa e inmunidad innata

Los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) son la primera línea de defensa contra la invasión bacteriana, así como las primeras células que migran hacia sitios de inflamación. Las funciones bien caracterizadas de PMNs incluyen fagocitosis de microorganismos o restos celulares, liberación de enzimas proteolíticas, generación de especies reactivas de oxígeno, síntesis de citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos. En los PMNs, el AA es metabolizado principalmente en leucotrienos por la lipoxigenasa 5 expresada constitutivamente, siendo LTB<sub>4</sub> el principal producto.<sup>148</sup> Sin embargo, hay estudios que indican que COXs y PGs están involucradas en la respuesta de PMNs. La capacidad de los PMNs humanos de sintetizar PG y Tx fue demostrado mas de 20 años atrás.<sup>149,150</sup> El factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), componentes de la pared celular bacteriana como LPS o LTA, TNF $\alpha$  y péptidos quimiotácticos inducen la síntesis de PGE<sub>2</sub> en PMNs.<sup>149,151</sup> Recientes han ampliado esas observaciones, mostrando que la sobre-regulación de COX-2 explica en gran medida la producción elevada de prostanoídes posterior a la activación de PMNs *in vitro*.<sup>152-156</sup> De hecho, LPS y LTA, ésteres de forbol, citocinas y factores de crecimiento sobrerregulan la expresión de COX-2 concentración y tiempo dependiente.

Las células dendríticas, tanto CDs maduras como inmaduras son muy sensibles a PGE<sub>2</sub>, aunque PGE<sub>2</sub> puede ejercer diferentes efectos en función de su fenotipo y condiciones de maduración y activación.<sup>157-161</sup> De hecho, PGE<sub>2</sub> mejora la producción de IL-12 en células dendríticas inmaduras estimuladas por TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.<sup>158,160</sup> Durante la migración, PGE<sub>2</sub> actúa como un cofactor, sincronizando la capacidad de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  con IL-6 para inducir CDs totalmente diferenciadas, donde aproximadamente 100 veces menos de IL-1 e TNF $\alpha$  son requeridos junto con PGE<sub>2</sub> para éste efecto.<sup>162,158-160,163</sup> Además, administración exógena de PGE<sub>2</sub> en CDs maduras muestra una disminución en la producción de IL-12 y por lo tanto, una menor capacidad en promover la respuesta Th1, aunque la liberación de IL-12 en éstas células no es influenciada únicamente por PGE<sub>2</sub>, se sugiere que de las CDs para producir IL-12 una vez que han migrado a los nódulos linfáticos, puede ser influenciada por el microambiente inflamatorio.<sup>157,159</sup>

Los monocitos y macrófagos juegan un rol esencial en la defensa del hospedero contra patógenos, participan en varios tipos de inflamación crónica y también pueden actuar en como células presentadoras de antígeno, aunque en menor capacidad que las CDs.<sup>164,165</sup> Los monocitos migran al azar a varios órganos y cavidades corporales, donde ellos se pueden diferenciar en macrófagos.<sup>166,167</sup> Durante la inflamación o infecciones locales, quimiocinas, varios péptidos o mediadores no peptídicos como mediadores lipídicos, son generados localmente para estimular la migración y diferenciación de los monocitos en macrófagos residentes, los cuales, tanto su morfología, función y propiedades varia dependiendo del tejido de residencia. Toxinas bacterianas como LPS e IL-1 $\beta$  potencialmente inducen a la expresión de COX-2 en macrófagos, tanto en agentes que inducen la transcripción bajo el control de NF- $\kappa$ B, así como la estabilización de ARNm de COX-2.<sup>168-174</sup> El efecto de TNF $\alpha$  sobre la expresión de COX-2 en macrófagos humanos es controversial. De hecho, se ha reportado que TNF $\alpha$  no tiene efecto para inducir ni para inhibir la expresión de COX-2

en función del tiempo de exposición.<sup>174,175</sup> Lo que puede sugerir que TNF $\alpha$  puede jugar un rol tanto pro como antiinflamatorio durante la inflamación, regulando la función del gen de COX-2 de manera dependiente del tiempo. IFN $\gamma$  es la principal citocina que activa a macrófagos y potencia el efecto del LPS sobre la expresión de COX-2 en macrófagos de ratones,<sup>176</sup> mientras éste no tiene mucho efecto en macrófagos de humanos<sup>170,174</sup> e incluso inhibe la expresión de COX-2 en macrófagos tratados con IL-1.<sup>170</sup> Quimiocinas asociadas con células Th2 como IL-4, IL-10 e IL-13 suprimen la inducción de COX-2 estimulada por LPS a nivel transcripcional en monocitos circulantes.<sup>177,178</sup> Una vez estimulados, los macrófagos liberan citocinas proinflamatorias como IFN $\gamma$  y PGE<sub>2</sub>, algunas de las cuales, pueden participar en la regulación autócrina de la expresión de COX-2. En adición, es probable que PGE<sub>2</sub> derivada de monocitos y macrófagos actué también como señal parácrina condicionando la presentación de antígeno de las CDs de los alrededores.

Moléculas de expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase II, las cuales son cruciales para la presentación de antígeno, han sido reportadas por ser inhibidas por PGE<sub>2</sub> en macrófagos de ratón;<sup>179</sup> pero no en humanos.<sup>180</sup> Producción de IL-12 después de la estimulación de LPS es inhibida de manera dependiente de la dosis de PGE<sub>2</sub> en monocitos humanos, similar a lo observado en CDs maduras;<sup>181</sup> Interesantemente, se requieren menores concentraciones de PGE<sub>2</sub> ( $1 \times 10^{-9}$ ) para la inhibición de IL-12 en monocitos comparado con las dosis requeridas para la directa desregulación de secreción de citocinas Th1 por células T.<sup>182,183</sup> Resumiendo, los macrófagos son capaces de secretar tanto PGE<sub>2</sub> como IL-12 durante la presentación de antígeno, y el balance entre esos 2 factores solubles puede determinar si las células T se diferencian tanto en células Th1 o Th2.<sup>184</sup>

PGE<sub>2</sub> es uno de los principales inhibidores fisiológicos de citotoxicidad causada por células asesinas naturales (NK) tanto humanas como de ratón.<sup>185-191</sup> Células NK CD56+ son predominantemente responsables de incrementar la habilidad de células mononucleares de vasos periféricos para lisar células tumorales resistentes a NK después de la estimulación con IL-2, generando células asesinas activadas por linfocinas (LAK). Células LAK son altamente citotóxicas contra una amplia variedad de células tumorales, pero no de células dañadas. PGE<sub>2</sub> también suprime la citotoxicidad de células LAK *in vitro*. Paradójicamente, indometacina de manera dependiente de la dosis mejora la actividad de células LAK aisladas de bazo de ratón después de 14-21 días de tratamiento.<sup>188</sup> La capacidad inhibitoria de PGE<sub>2</sub> sobre la actividad lítica de células NK parece jugar un papel fisiológico importante en la barrera materno-fetal durante la gestación en humanos y roedores. De hecho, se ha reportado que PGE<sub>2</sub> es uno de los principales agentes inhibitorios de células NK, la cual contribuye a la supresión inmunológica de células deciduales.<sup>185,192-194</sup>

### 3.4. Citocinas proinflamatorias

Las citocinas son pequeñas proteínas no estructurales con peso molecular alrededor de 8 a 40000Da. Originalmente fueron llamadas linfocinas y monocinas para indicar su fuente celular, pero posteriormente, el término citocina evidenció una mejor descripción ya que casi todas las células nucleadas son capaces de sintetizarlas, y a su vez, responder a ellas. No existe ningún motivo en la secuencia de aminoácidos o estructura tridimensional que permita relacionarlas; más bien, sus actividades biológicas permiten agruparlas en diferentes grupos. En mayor parte, las citocinas están implicadas principalmente en las respuestas del huésped frente a enfermedades o infecciones, a diferencia de los mecanismos de homeostasis.

Anteriormente se pensaba que las citocinas eran análogas de las hormonas; sin embargo, no es una comparación correcta ya que las hormonas tienden a ser constitutivamente expresadas por tejidos altamente especializados, y las citocinas son sintetizadas por casi todas las células, además de que las hormonas son expresadas en respuesta a señales de control homeostático, muchos de los cuales forman parte de un ciclo diario. En contraste, la mayoría de los genes de las citocinas no son expresados (al menos a nivel traduccional) a menos de estímulos específicos por agentes nocivos. De hecho, se ha puesto de manifiesto que la activación de la expresión de genes de citocinas es casi idéntica a la de los factores de estrés celular, como luz UV, choque térmico, hiperosmolaridad, o la activación de receptores que activan a las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), las cuales, fosforilan factores de transcripción para la expresión de genes. Por supuesto que los productos de la inflamación e infección también usan la vía de las MAPK para iniciar la expresión génica de citocinas.

Actualmente hay cerca de 36 citocinas con el nombre de interleucinas,<sup>195</sup> otras citocinas han conservado su original descripción biológica como el TNF $\alpha$ . Algunas citocinas promueven claramente la inflamación y son llamadas citocinas proinflamatorias, mientras que otras como IL-4, IL-10 e IL-13 suprimen la actividad inflamatoria de las proinflamatorias como IL-1, TNF y quimiocinas, denominándose antiinflamatorias.

El interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) es otro ejemplo de la naturaleza pleiotrópica de las citocinas. Como el IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ , el IFN $\gamma$  posee actividad antiviral. IFN $\gamma$  es también un activador de la vía que permite la citotoxicidad de las células T; sin embargo, IFN $\gamma$  es considerado una citocina proinflamatoria debido a que aumenta la actividad del TNF y óxido nítrico.

El concepto de que algunas citocinas funcionan primariamente para inducir la inflamación mientras que otras la suprimen, es fundamental en la biología de las citocinas y en las implicaciones clínicas. Por ejemplo, genes que son proinflamatorios son de tipo PLA<sub>2</sub>, COX-2 y óxido nítrico sintasa inducible. Esos genes codifican para enzimas que incrementan la síntesis de factor activador de plaquetas, prostanoídes y óxido nítrico. Otra clase de genes que son proinflamatorios son las quimiocinas, las cuales son péptidos pequeños de 8000Da. que facilitan el tránsito de leucocitos de la circulación sanguínea a los tejidos, como la quimiocina quimioatrayente de neutrófilos IL-8, la cual activa a neutrófilos para degranulación y causar daño tisular. IL-1 y TNF son inductores de moléculas de adhesión endotelial, las cuales son esenciales para la

adhesión de leucocitos a la superficie endotelial previo a la migración hacia los tejidos. En conjunto, la inflamación mediada por citocinas es una cascada de productos génicos usualmente no producida en salud. Ya sea inducida por una infección, trauma, isquemia, células T activadas o toxinas, IL-1 y TNF inician la cascada de mediadores inflamatorios. Citocinas antiinflamatorias bloquean el proceso o al menos lo suprimen. IL-4, IL-3, IL-10 y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ ) suprimen la producción de TNF e IL-1, quimiocinas como IL-8 y moléculas de adhesión vascular. Por lo tanto, un equilibrio entre los efectos pro y antiinflamatorios determina el resultado de la enfermedad, ya sea a corto o largo plazo. De hecho, algunos estudios han sugerido que la susceptibilidad de enfermedad esta determinada genéticamente mediante el balance o la expresión tanto de citocinas pro como antiinflamatoria. No obstante, la supresión del gen e IL-10 resulta en el desarrollo espontáneo de enfermedad intestinal inflamatoria mortal. Supresión del gen del gen TGF $\beta$ 1 también resulta en enfermedad inflamatoria espontánea. En ratones deficientes del antagonista del receptor IL-1 (IL-1Ra) se observa una enfermedad espontanea parecida a artritis reumatoide.

### 3.4.1. IL-1 y TNF

Los mecanismos de acción de TNF e IL-1 son sinérgicos. Claramente, ambas citocinas son producidas en sitios de inflamación local y por lo tanto, el efecto neto debe ser considerado al hacer correlaciones entre niveles de citocinas y severidad de la enfermedad. Hay también sinergismo entre bradicinina e IL-1, así como entre la IL-1 o TNF y factores de crecimiento mesenquimal. El factor más relevante en el dolor es el incremento de PGE<sub>2</sub> estimulado por IL-1 y/o TNF. IL-1 también reduce el umbral al dolor principalmente mediante el aumento en la síntesis de IL-1.<sup>196</sup>

La IL-1 es una citocina producida por múltiples estirpes celulares en respuesta a TNF, principalmente por macrófagos activados. Se produce en grandes cantidades en respuesta infecciones, cualquier tipo de lesión o estrés. Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria que ocasiona fiebre, neutrofilia, y producción de proteínas de la fase aguda. La familia de citocinas IL-1 esta conformada por 3 isoformas:

4. IL-1 $\alpha$ : La cual es mayormente intracelular y termina adherida a la membrana celular con ciertos efectos parácrinos en el entorno de la célula secretora
  - IL-1 $\beta$ : Es secretada a la circulación e interacciona con 2 tipos de receptores.
    - Tipo I: Se encuentra en la mayoría de las células del cuerpo y parece ser el mediador de las respuestas clásicas de la IL-1.
    - Tipo II: Se encuentra sobre linfocitos B, monocitos, neutrófilos y células de médula ósea
  - IL-1RA: es inhibitoria sobre las otras 2 formas actuando como antagonista, impidiendo la unión de IL-1 $\alpha$  y  $\beta$  a sus respectivos receptores.

A pesar de las diferencias estructurales de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , ambas moléculas se unen al mismo receptor. Las 3 moléculas son sintetizadas a partir de genes localizados en el cromosoma 2. IL1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son fragmentos e 17 kDa originados a partir de moléculas precursoras inactivas de unos 30kDa, llamadas pro IL-1 $\alpha$  y pro IL-1 $\beta$ .

En humanos, el bloqueo de la actividad de IL-1, particularmente de IL-1 $\beta$ , ha sido terapéuticamente importante en la medicina. Por otra parte, IL-1RA es un inhibidor específico de la actividad tanto de IL-1 $\alpha$  como IL-1 $\beta$ , mientras IL-1F5 e IL-1F7 parecen funcionar como inhibidores no específicos de la inflamación y respuesta inmune innata.<sup>197,198</sup> Una de las adiciones más recientes de la familia de IL-1 es IL-33, la cual es el ligando del receptor huérfano ST2.<sup>199</sup> IL-33 juega un rol importante en las funciones de mastocitos y controla la alergia y respuestas Th2. Similar a IL-1 $\alpha$ , IL-33 puede actuar a través de su receptor de superficie ST2, además de ser una citocina intracelular que puede funcionar como un factor nuclear de unión al ADN.<sup>200,201</sup>

A diferencia de otras familias de citocinas, la familia de IL-1 ejerce control sobre la inflamación tanto a nivel de receptor como a nivel nuclear. Miembros de ésta familia poseen activadores y supresores de la inflamación. IL-1Ra se une fuertemente a IL-1R y bloquea la actividad tanto de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . La administración de IL-1RA está aprobada en varios países para el tratamiento de los signos, síntomas y destrucción articular de la artritis reumatoide.

Por muchos años, ha habido un gran interés en la habilidad de IL-1 $\beta$  para dañar las células beta pancreáticas productoras de insulina,<sup>202,203</sup> ya que varios estudios en humanos han demostrado el rol de IL-1 $\beta$  en diabetes. Se observó que la administración de IL-1RA mejoró el control glicémico y la función de las células beta productoras de insulina.<sup>204</sup> En adición, la utilización de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 $\beta$  también mejoró el control glucémico y la función de células beta en pacientes con diabetes tipo 2.<sup>205</sup> Por lo tanto, la destrucción de las células beta productoras de insulina parece ser una enfermedad autoinflamatoria mediada por IL-1 $\beta$ .

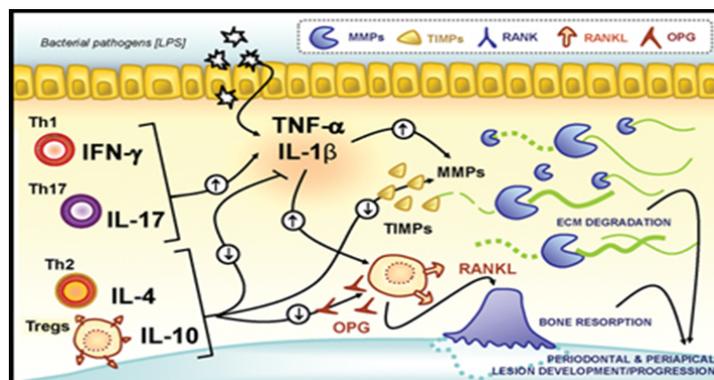
### 3.4.2. Papel de las citocinas en la reabsorción ósea. Sistema RANK/RANKL/OPG

Aunque las investigaciones en la patogénesis de la enfermedad periodontal han sido tradicionalmente enfocadas en el rol de la infección bacteriana, en las últimas dos décadas se ha incrementado el interés en los factores de respuesta del huésped que controlan la enfermedad periodontal.<sup>206</sup> Ahora se sabe que las respuestas inmune e inflamatoria son importantes en la patogénesis de la periodontitis, aunado a las factores intrínsecos (como factores genéticos) y extrínsecos (como la dieta) relacionados con el huésped.<sup>207,208</sup>

La destrucción y reabsorción alveolar son características muy importantes en periodontitis, las cuales están dadas por el incremento en la concentración de mediadores inflamatorios. **Fig. 6**

El principal mecanismo que regula la reabsorción y aposición ósea que ocurre durante la remodelación ósea es la relación del ligando del receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B (RANKL) con la osteoprotegerina (OPG),<sup>209,211</sup> y éste mecanismo probablemente contribuye a la pérdida de hueso observada en periodontitis. RANKL está presente en varios tipos celulares y une a RANK sobre precursores de osteoclastos, provocando su diferenciación en células tipo macrófagos activos que secretan enzimas que degradan la matriz ósea. OPG es un receptor soluble de RANKL que previene la interacción RANK-RANKL. A altas concentraciones de OPG, RANKL no se une a precursores de osteoclastos y por ende, la pérdida ósea se ve abatida. Niveles

de OPG son regulados por el factor transformante- $\beta$  relacionado con las proteínas morfogénicas óseas, mientras que la síntesis de RANKL es inducida por citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF. Por consiguiente, el incremento en la concentración de citocinas proinflamatorias en tejidos periodontales sanos pueden directamente afectar la pérdida ósea por incremento en la relación RANKL/OPG. Estudios en animales con enfermedad periodontal han mostrado que otros mediadores inflamatorios del hospedero, también contribuyen a la reabsorción ósea.<sup>212-215</sup> En ratones con periodontitis, la resorción ósea fue disminuida después de la administración de receptores señuelo para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o TNF<sup>212,214,215</sup> así como en ratones deficientes de IFN- $\gamma$ , IL-6 o el receptor 1 para TNF,<sup>213-216</sup> demostrando una relación entre la respuesta inflamatoria y las manifestaciones clínicas de periodontitis. En adición. Ratones deficientes tanto en selectina-E y selectina-P o IL-10 espontáneamente desarrollaron periodontitis.<sup>217,218</sup> Bajos niveles de selectina-E son encontrados en tejidos periodontales sanos<sup>219,220</sup> y se piensa que contribuyen al tránsito de neutrófilos a través del periodonto.<sup>221</sup> Sin embargo, no se observó el desarrollo de periodontitis tras la administración de antibióticos en ratones deficientes tanto en selectina-P como E,<sup>217</sup> confirmando la contribución de bacterias orales en la enfermedad. Igualmente, la enfermedad espontánea observada en ratones noqueados para IL-10 resalta la importancia de IL-10 en la prevención de la sobreexpresión de componentes del sistema inmune innato, que son expresados en respuesta a bacterias orales comensales. El desarrollo de enfermedad en ausencia de IL-10 demuestra que un balance entre mediadores pro y antiinflamatorios es necesario para mantener el estado de salud periodontal. Por lo tanto, la enfermedad espontánea en esos ratones noqueados es debido a una disrupción en el balance normal entre flora comensal y el estado de respuesta inmune innata del tejido periodontal. En cepas de ratones transgénicos con sobreexpresión de IL-1 $\alpha$ , la enfermedad periodontal se desarrolla aún con la administración de antibióticos, demostrando que es posible el desarrollo de periodontitis debido a la excesiva producción de mediadores inflamatorios en ausencia de componentes bacterianos. En consecuencia, la pérdida ósea puede resultar de la disrupción de esos mediadores, consistente en la hipótesis que diferentes disrupciones en la homeostasis del tejido periodontal puede desencadenar una excesiva inflamación y como resultado, una enfermedad.



**Fig. 6.** Alteración microbiana en la homeostasis ósea que permite la pérdida ósea. El aumento de citocinas como IL-1 $\beta$  activa a las MMPs y subsecuente degradación de la matriz extracelular; mientras el TNF se une a su receptor RANK, activando la reabsorción ósea por acción osteoclastica. *Journal of Periodontology*, 2008.

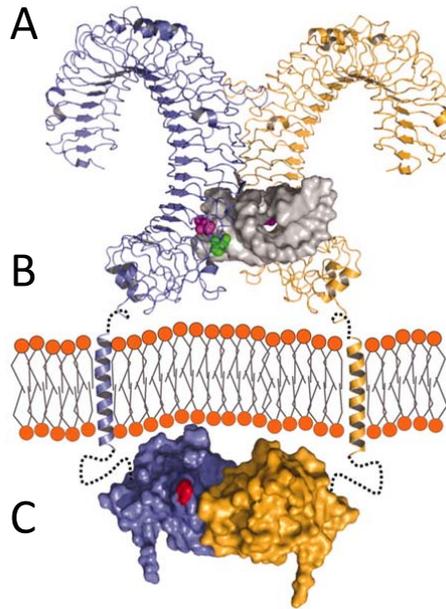
Durante la respuesta inflamatoria de los tejidos periodontales, como ya se mencionó anteriormente, hay liberación de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios, los cuales, tiene la capacidad de estimular a los osteoblastos periostales, alterando sus niveles de expresión fisiológicos.<sup>222-226</sup> Diversos estudios se enfocaron en investigar las concentraciones de RANKL y OPG en tejidos gingivales y líquido crevicular extraído de paciente con periodontitis crónica;<sup>227-232</sup> en algunos de esos pacientes, se encontró un incremento en las concentraciones de RANKL soluble sin cambio en los niveles de OPG en pacientes con periodontitis comparado con los niveles de pacientes sanos.<sup>227,228</sup> Sin embargo, una relación recíproca fue también encontrada, en los cuales la expresión de RANKL fue mas alta y los niveles de OPG mas bajos en tejidos gingivales enfermos comparados con los controles.<sup>230</sup> Y ésta misma relación, ha sido encontrada a nivel de ARNm de RANKL/OPG extraído de tejido gingival de pacientes con periodontitis.<sup>233</sup>

Además de los osteoblastos, RANKL es expresado por fibroblastos y linfocitos T y B. Linfocitos T y B activados aislados de tejidos gingivales de pacientes con periodontitis, parecen ser una fuente muy abundante de RANKL.<sup>227,234,235</sup> En un estudio, se encontraron células T y B predominantemente del tipo celular mononuclear en tejido gingival con periodontitis, de las cuales el 45% correspondía a células T, 50% a células B y 5% a monocitos, expresaban RANKL comparados con los linfocitos de tejidos gingivales de pacientes sanos.<sup>227</sup> Sin embargo, los linfocitos B parecen no requerir la presencia de linfocitos T para inducir a la reabsorción ósea. En un modelo de ratones atímicos con periodontitis e inyectados con linfocitos B, la expresión de RANKL y la correspondiente inducción de diferenciación de osteoclastos fue mayor en las ratas que recibieron el trasplante de células B provenientes de animales inmunizados con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* comparado con los trasplantados con células B de animales no inmunizados.<sup>235</sup>

Éstos hallazgos relacionan el papel fundamental de RANKL en la inducción de osteoclastogénesis en la enfermedad periodontal.

#### 4. Receptores tipo Toll (TLR)

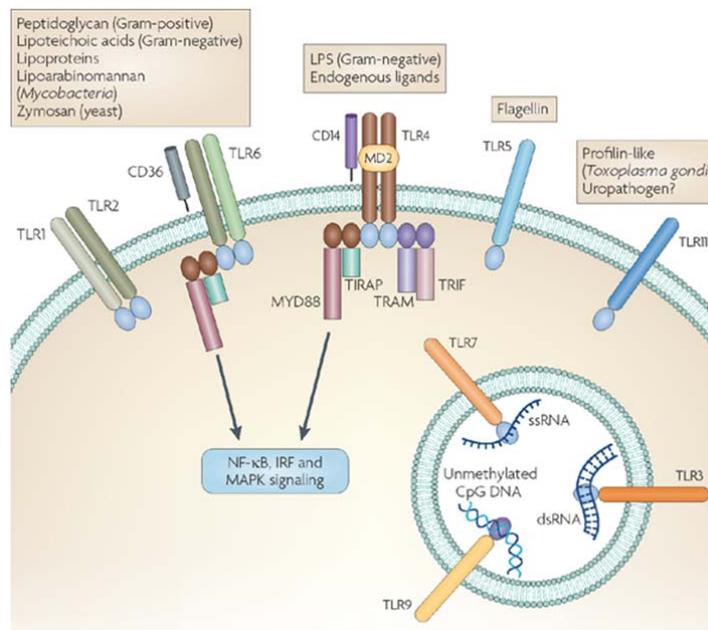
Los TLR son proteínas conformadas por un dominio extracelular rico en motivos de leucina (LRR), un dominio transmembranal y un dominio intracelular homólogo a la porción interna del receptor de IL-1 (TIR). A la fecha, 11 de los 13 TLRs han sido identificados en humanos donde cada uno reconoce PAMPs derivados de diferentes microorganismos, incluyendo virus, bacterias protozoos y hongos. **Fig. 7**



**Fig. 7. Estructura molecular de los TLR.** A: Dominio extracelular rico en motivos de leucina (LRR), B: Dominio transmembranal y C: Dominio intracelular homólogo al receptor de IL/Toll (TIR). *Seminars in Immunology*, 2007.

Los TLRs son clasificados en varios grupos dependiendo del ligando que reconocen. Los TLR 1, 2, 4 y 6 reconocen lípidos. Por ejemplo, el TLR4 junto con sus componentes extracelulares como MD-2 y CD14 reconocen lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-, la cual causa shock séptico. EL TLR2 forma heterodímeros con TLR1 y TLR6 y no TLRs como CD36 para discriminar una amplia variedad de PAMPs, incluyendo peptidoglicano, lipopéptidos y lipoproteínas de bacterias Gram+, lipopéptidos de micoplama y zimosan de hongos. En particular, TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6 pueden discriminar triacil y diacil lipopéptido respectivamente. En adición, se hipotetiza que el TLR10 también se heterodimeriza con TLR2 y TLR1, aunque los ligandos permanecen desconocidos.<sup>236</sup> El TLR5 es expresado abundantemente en células intestinales de la lámina propia, donde reconoce flagelina.<sup>236,237</sup> Una tercera clase de TLRs incluyen el TLR3, 7, 8 y 9, cuya localización intracelular permite detectar ácidos nucleicos derivados de virus y bacterias. EL TLR3 reconoce ARN de doble cadena (dsRNA), el cual, es producido por varios virus durante su replicación. El TLR7 reconoce moléculas tipo imidazoquinolonas, análogos de guanósina así como loxiribina y ARN de doble cadena (ssRNA) derivado de varios virus y pequeños ARN interferentes. El TLR8, el cual es altamente homólogo al TLR7, participa en el reconocimiento de imidazoquinolonas y ssRNA. Ha sido reportado que el TLR8 es expresado sobre células T reguladoras, y

directamente reconoce oligonucleótidos de ADN que contiene poliG. Éste reconocimiento puede revertir la función supresiva de las células T reguladoras sin requerir la activación de células dendríticas. El TLR9 reconoce motivos CpG en ADN presentes en genomas virales y bacterianos así como también ácidos no nucleicos y hemozoina del parásito de la malaria.



**Fig. 8. Familia de los TLR.** En humanos se han caracterizado hasta la fecha 11 diferentes TLR, de los cuales 9 se sabe su función. Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 8 están localizados en la membrana celular; mientras los TLR 3, 7 y 9 se encuentran en membranas endosomales. *Nature Reviews Immunology*, 2007.

#### 4.1. Dominio TIR

Después del reconocimiento de los PAMPs, los TLRs activan cascadas de señalización intracelular que inducen a genes que codifican para la síntesis de citocinas proinflamatorias como  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  e  $IL-12$ . La señalización de los TLRs también provoca la sobre regulación de moléculas co-estimuladoras sobre células dendríticas, un paso que es crucial para la inducción de respuestas inmunes adaptativas para patógenos específicos. Además, varios TLRs controlan la síntesis IFN tipo I, que permite activar respuestas antivirales.

EL reconocimiento de los PAMPs estimula el reclutamiento de un conjunto de adaptadores intracelulares hacia el dominio TIR, incluyendo MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM vía interacciones TIR-TIR.<sup>238</sup> MyD88 es un adaptador universal que activa vías de señalización inflamatorias, y es compartido por todos los TLRs con excepción del TLR3. EL reclutamiento de MyD88 permite la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) ERK, JNK y p38 así como la translocación del factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), controlando la expresión de genes de citocinas inflamatorias. TIRAP activa una vía de señalización dependiente de MyD88 río debajo de TLR2 y TLR4.

TRIF es reclutado por TLR2 y TLR4 activando una vía alterna (vía dependiente de TRIF) que culmina en la activación de NF- $\kappa$ B, MAPKs y el factor de transcripción IRF3. La activación de IRF3 es esencial para la inducción de IFN tipo 1, particularmente IFN $\beta$ . TRAM participa selectivamente en la activación de la vía dependiente de TRIF río debajo de TLR4, pero no de TLR3. Recientemente, se demostró que SARM, una molécula adaptadora adicional, inhibe la vía dependiente de TRIF en líneas celulares humanas; sin embargo, la función fisiológica de SARM en ratones permanece desconocida.<sup>239</sup> Colectivamente, cada TLR recluta una combinación específica de moléculas adaptadores que les permite activar diferentes factores de transcripción, aumentando respuestas apropiadas y efectivas para cada tipo e patógenos

#### 4.2. Vía dependiente de MyD88

La asociación de los TLRs y MyD88 estimula el reclutamiento de los miembros de la familia de IRAK, incluyendo IRAK1, IRAK2, IRAK e IRAK-M. En particular, IRAK4 es indispensable para la vía de activación dependiente de MyD88. Una vez fosforilada, IRAK se disocia de MyD88 e interactúa con TRAF6, un miembro de la familia TRAF. TRAF6, una ligasa E3, forma un complejo con Ubc13 y Uev1A para promover la síntesis de cadenas de poliubiquitina unidas a la lisina 63, la cual en turno activa a TAK1 y MAPKKK.<sup>240</sup> TAK1 en combinación con TAB1, TAB2 y TAB3 activan 2 vías río abajo involucradas con el complejo IKK y la familia MAPK.

El complejo IKK, compuesto de IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y la subunidad regulatoria IKK $\gamma$ /NEMO catalizan la fosforilación de las proteínas I $\kappa$ B. Ésta fosforilación es necesaria para la degradación de I $\kappa$ B y la subsecuente translocación de del factor de transcripción NF- $\kappa$ B al núcleo, controlando la expresión de varios genes. Miembros de la familia de las MAPK, fosforilan y activan al factor de transcripción AP-1, un dímero de proteínas de región básica de zipper de leucinas con Jun, Fos, ATF y subfamilias de Maf.<sup>241</sup> Entre ellos, c-Jun esta implicado por tener un rol central en respuestas inflamatorias en señalización por TLR. Células derivadas de ratones deficientes de TAK1 consistentemente muestran reducida producción de citocinas proinflamatorias y afectada activación de MAPK y NF- $\kappa$ B en respuesta a varios ligandos de TLRs, indicando un esencial y no redundante rol de TAK1 en la activación de vías de señalización NF- $\kappa$ B y MAPK.<sup>242</sup> Sin embargo, los sustratos de TAK1, los cuales son responsables de la activación de complejos IKK y MAPK permanecen desconocidos.

Aunque análisis *in vitro* han implicado a Ubc13 en la activación de NF- $\kappa$ B y MAPK, vía ubiquitinización de TAK1, estudios en ratones con en el gen de Ubc13 eliminado de varios tejidos, han mostrado que hay un rol indispensable en la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>243</sup> Macrófagos deficientes de Ubc13 muestran defectos en la inducción de citocinas proinflamatorias después del tratamiento con múltiples ligandos para TLRs, así como también una activación afectada de las MAPK, pero no en la activación de NF- $\kappa$ B. Importantemente, la activación de TAK1 y ubiquitinización de TRAF6 fueron normalmente observadas en ausencia de Ubc13. Dado que TAK1 y TRAF6 son esenciales para la activación óptima de MAPK y NF- $\kappa$ B en señalización por TLR, es posible que Ubc13 activa la vía de las MAPK independientemente de TAK1/TRAF6 o que está localizada río debajo de TAK1/TRAF6. Alternativamente, otras 2 enzimas E2 como Ubc5 pueden compensar la pérdida de función de Ubc13 por activación de la vía

dependiente NF- $\kappa$ B TAK1/TRAF6 *in vivo*. Notablemente, en células deficientes de Ubc13, hay una reducción en la estimulación de ubiquitinización de IKK $\gamma$ /NEMO, sugiriendo una unión entre la ubiquitinización IKK $\gamma$ /NEMO y la activación de las MAPK.<sup>243</sup>

### 4.3. Vía dependiente de TRIF

Ratones deficientes de MyD88 han mostrado una falla para activar NF- $\kappa$ B y MAPK y producir citocinas proinflamatorias en respuesta a ligandos específicos para TLR2, 5, 7 y 9. Aunque macrófagos deficientes de MyD88 también muestran fallas en la producción de citocinas proinflamatorias, en respuesta a LPS, aparentemente activan NF- $\kappa$ B y MAPK, aunque con cinética retrasada.<sup>244</sup> Además, la activación de IRF3 y subsecuente inducción de IFN $\beta$  después del tratamiento con ligandos de TLR3 y TLR4 es normal en ratones deficientes de MyD88.<sup>245</sup> Estas observaciones sugirieron la existencia de una vía independiente de MyD88 en la señalización de TLR3 y TLR4. En esos aspectos, TRIF fue identificado como adaptador esencial en la señalización independiente de MyD88.<sup>246,247</sup> TRIF es reclutado hacia el TLR3 y TLR4 para activar IRF3 y NF- $\kappa$ B. Ratones deficientes de TRIF consistentemente muestran defectos en la activación de IRF3 e inducción de IFN $\beta$  después de la estimulación de LPS y Poli IC.<sup>248,249</sup> Sin embargo, activación en fases tardías de NF- $\kappa$ B y MAPK y después de la estimulación con LPS es totalmente abolida en ratones doble deficientes de TRIF y MyD88, indicando que la señalización dependiente de TRIF contribuye a en la activación de la fase tardía de MAPK y NF- $\kappa$ B.<sup>248</sup>

Las regiones N y C terminal de TRIF tienen distintas funciones en lo que respecta al reclutamiento de moléculas de señalización. La región N terminal de TRIF activa tanto a promotores de IFN $\beta$  y NF- $\kappa$ B, mientras la región C terminal activa a NF- $\kappa$ B pero no al promotor de IFN $\beta$ . La región N terminal recluta IKKs no canónicas, TBK1 (T2K, NAK) e IKKi (IKK $\epsilon$ ), la cuál fosforila residuos de serina/treonina presentes en la región C terminal de IRF3.<sup>250,251</sup> IRF3 en sus forma fosforilada forma un dímero, el cual se transloca del citoplasma al núcleo para regular la expresión de genes como IFN $\beta$ . Células noqueadas tanto de IKKi y TBK1 muestran una disminución en la activación de IRF3 en respuesta a ligandos de TLR3 y TLR4, mientras la activación de MAPK y NF- $\kappa$ B e inducción de citocinas proinflamatorias no es afectada en esas células.<sup>252-254</sup> Por otra parte, la región N terminal de TRIF recluta TRAF6 vía motivos de unión a TRAF.<sup>255</sup> TRAF6 dominante negativo previene la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TRIF y mutaciones en los motivos de unión de TRAF6 de TRIF abaten la activación de NF- $\kappa$ B, indicando la importancia de TRAF6 en activación de NF- $\kappa$ B dependiente de TRIF. La región terminal de TRIF contiene un motivo de interacción homotípica Rip (RHIM), el cual media su interacción con RIP1, un miembro de la familia RIP involucrado en la activación de NF- $\kappa$ B mediada por el receptor TNF.<sup>256</sup> TLR3 y TLR4 median la activación de NF- $\kappa$ B y la subsecuente inducción de genes blanco son afectados en ausencia de RIP1, indicando que RIP1 participa en la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de TRIF. Además, RIP es reportado como poliubiquitinado y forma un complejo con TRAF6 y TAK1;<sup>257</sup> En conjunto, el reclutamiento por TRIF de RIP y TRAF6 puede facilitar la activación de TAK1, resultando en la activación de NF- $\kappa$ B y MAPK. Es actualmente incierto si Ubc13 es un componente del complejo que media la poliubiquitinización de

RIP. Recientes reportes han sugerido que la activación de IRF3 dependiente de TRIF está estrechamente ligada a la fase tardía de activación de NF- $\kappa$ B.<sup>258,259</sup> Parece que en la activación tardía de NF- $\kappa$ B inducida por LPS requiere la síntesis *de novo* de TNF $\alpha$ . De hecho, una reducción de IRF3 por ARN pequeños silenciadores (siRNA) resulta en la inhibición de la fase tardía de activación de NF- $\kappa$ B. Es posible que IRF3 activado por la vía dependiente de TRIF, se une a la región promotora de TNF $\alpha$  para promover su síntesis, el cual subsecuentemente se une al receptor TNF para iniciar la activación tardía de NF- $\kappa$ B en manera autócrina; sin embargo, análisis detallados en ratones deficientes de RIP1 es debido a defectos en la señalización de del receptor TNF en esas células.

#### 4.4. IRFs en señalización de TLR

Hay nueve miembros de la familia de IRF (IRF1-IRF9) y varios IRFs además del IRF3 son críticamente involucrados en la señalización de TLRs.<sup>260</sup> IRF7, el cual también está presente también en citoplasma y se transloca al núcleo después de su fosforilación y es el más similar estructuralmente al IRF3. IRF7 activa potentemente al promotor de IFN $\beta$  y a varios genes de IFN $\alpha$ . A diferencia de IRF3, la expresión de IRF7 es baja en condiciones basales, pero rápidamente es sobre regulada en respuesta a infecciones virales o a ligandos de TLRs en la mayoría de los tipos celulares, sugiriendo una regulación de retroalimentación positiva en la inducción de IFN tipo I.<sup>260</sup> Sin embargo, IRF7 es constitutivamente expresado en células dendríticas plasmocitoides (pDC), las cuales tienen la habilidad de producir IFN tipo I en respuesta a una amplia variedad de virus.<sup>261,262</sup> TLR7 y TLR9 son abundantemente expresados en pDC; notablemente, la inducción de IFN tipo I mediada por TLR7 y TLR9 es provocada por una vía dependiente de MyD88, pero no por la vía dependiente de TRIF.<sup>263,264</sup> En ese contexto, ha sido demostrado que IRF7 forma un complejo con MyD88, IRAK1, IRAK4 y TRAF6 que se transloca hacia el núcleo en respuesta a ADN CpG en pDC.<sup>265,266</sup> Aunque ratones deficientes de MyD88, IRAK4 o TRAF6 tiene defectos en la activación de IRF3 y NF- $\kappa$ B, con un concomitante deterioro en la inducción de citocinas inflamatorias e IFN tipo I en respuesta a ADN CpG; la deficiencia de IRAK1 resulta en menor activación de IRF7 sin afectar la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>267</sup> Sin embargo, IRAK1 y no IRAK4 es capaz de fosforilar a IRF7. A la vez, IRAK1 es más probablemente una cinasa que fosforila a IRF7 en pDC.<sup>268</sup> Recientemente, ha sido reportado que IKK $\alpha$  posee un rol similar a IRAK1, teniendo la habilidad de unirse y fosforilar a IRF7.<sup>268</sup> Aunque las relaciones funcionales entre IRAK1 e IKK $\alpha$  permanecen inciertas, es posible que funcionen como un heterodímero para potenciar la activación de IRF7. IRF7 también participa en la inducción de IFN tipo I, activado por helicasas ARN citosólicas RIG-I y Mda5, las cuales reconocen dsARN en células dendríticas convencionales, macrófagos y fibroblastos.<sup>269,279</sup> EN esas vías, IRF7 es fosforilado por TKB1/IKKi pero no por IRAK1/IKK $\alpha$ , así que aunque TLR7 y TLR9 requieren IRAK1 e IKK $\alpha$  para una óptima fosforilación de IRF7, RIG-I y Mad5 usan TKB1/IKKi para activar tanto IRF3 como IRF7. Colectivamente, IRF7 es un regulador maestro para la inducción de IFN tipo I tanto en vías dependientes como independientes de TLR.

Componentes adicionales involucrados en el complejo MyD88/IRF7 en pDC han sido recientemente identificados. TRAF3, un miembro de la familia TRAF, es importante

para la inducción de IFN tipo I en la señalización de TLR7 y TLR9.<sup>271,272</sup> TRAF3 se une a MyD88, IRAK1 y quizá IKK $\alpha$ , modulando la activación de IRF7. Además, TRAF3 es también requerido para la activación de IRF3 e IRF7 dependiente de TKB1/IKKi en la vía de señalización de TLR7 y RIG-I/Mad5, indicando que TRAF3 es un componente integral en la activación de IRF7 e IRF3 por múltiples vías. Notablemente, TRAF3 es también necesario para la inducción de citocina antiinflamatoria IL-10, pero no para citocinas proinflamatorias, en respuesta a ligandos específicos de TLR3, 4, 7 y 9. En adición, esplenocitos noqueados en IRAK1 muestran una remarcable reducción de IL-10 después del tratamiento con LPS.<sup>273</sup> En consecuencia, la vía dependiente de TRAF3-IRAK1 puede también controlar la liberación de IL-10 también. La osteopontina (OPN) es una fosfoproteína secretada implicada en diversas funciones celulares, incluyendo la reabsorción ósea, vascularización, inflamación y polarización Th1. En pDC, la expresión de OPN es sobre expresada por ligandos para TLR9 a través de T-bet, un factor de transcripción maestro que controla la diferenciación Th1. pDC aisladas tanto de ratones deficientes T-bet u OPN poseen defectos en la inducción de IFN tipo 1 en respuesta a ligandos de TLR9, pero pueden producir IL-6 impulsada por NF- $\kappa$ B normalmente.<sup>274</sup> Un reporte previo mostró que el precursor de OPN (OPNi) es retenido en el citoplasma, sugiriendo una posible función de OPNi como una molécula de señalización intracelular. En éste contexto, ha sido demostrado que la expresión de un mutante OPN carece señales que estimulan la producción de IFN $\alpha$  por cDC, pero no en DC convencionales, y que OPNi interactúa y se colocaliza con Myd88.<sup>274</sup> Además, la transcripción nuclear de IRF7 en respuesta a ligandos de TLR9 es afectada en pDC deficientes de OPN. Esas observaciones sugieren que OPn intracelular es un componente del complejo MyD88-IRF7 en pDC.

IRF1 también participa en la señalización de TLR9.<sup>275</sup> IRF1 se une directamente a la región central de MyD88 y es liberado hacia el núcleo en respuesta a la estimulación. Células dendríticas convencionales derivadas de ratones deficientes de IRF1 mostraron alterada síntesis de IFN $\beta$ , óxido nítrico sintasa inducible e IL-12 en respuesta a ligandos de TLR9. EN contraste, pDC derivadas de ratones deficientes de IRF1 mostraron inducción normal de IFN $\beta$  e IFN $\alpha$ , lo que sugiere que un tipo celular específico es involucrado con IRF1 en señalización dependiente de MyD88. Es también conocido que la inducción de citocinas es mejorada por el pretratamiento con IFN $\gamma$  en respuesta a ligandos de TLRs. Como la estimulación de IFN $\gamma$  induce la expresión de IRF1, es posible que IRF1 esté involucrado en el mejoramiento mediado por IFN $\gamma$  en la señalización de TLRs, sin embargo, éste efecto no fue observado en ratones deficientes de IRF1. En consecuencia, IRF1 es reclutado por MyD88 cuando éste es inducido por la estimulación con IFN $\gamma$  y transloca dentro del núcleo en respuesta a la estimulación de TLR para inducir un repertorio de genes incluyendo IFN $\beta$  en células dendríticas convencionales.

Además de IRF3, IRF7 e IRF1, IRF5 también está involucrado en la señalización de TLR.<sup>276</sup> Células dendríticas convencionales y macrófagos deficientes de IRF5 muestran producción alterada de citocinas en respuesta a múltiples ligandos de TLR, mientras exhiben secreción normal de IFN tipo I en pDC. IRF5 se une a MyD88 y TRAF6, translocándose al núcleo después de su fosforilación. En el núcleo, IRF5 se une a los motivos ISRE encontrados en la región promotora de los genes que codifican para citocinas inflamatorias causando su expresión, presumiblemente vía NF- $\kappa$ B. Así como la producción de citocinas inflamatorias ocurre después de la inducción con ligandos

para TLR independientemente de TKB1/IKKi e IRAK1, otras proteínas cinasas como TAK1, IRAK4 y las canónicas IKKs, las cuales median la inducción de citocinas inflamatorias dependientes de MyD88, pueden participar en la fosforilación de IRF5. En células humanas, la sobre-expresión de múltiples isoformas únicas de IRF5 debido a mutaciones es asociada con la patogénesis de lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune que muestra niveles elevados de IFN tipo I.<sup>277</sup>

IRF8 es mediado por respuestas mediadas por TLR9. pDC derivadas de ratones deficientes de IRF8 muestran una disminución de IFN tipo I y citocinas inflamatorias mediadas por TLR9. Esas células también muestran un daño severo en la actividad de NF- $\kappa$ B para unirse al ADN en respuesta a ligandos de TLR.<sup>278</sup> Estos datos sugieren fuertemente la posibilidad de que IRF8 facilita la unión de NF- $\kappa$ B con el ADN o es un activador del complejo IKK.

#### 4.5. Localización y señalización de los TLR

Los TLRs pueden ser clasificados en dos grupos basados en su localización subcelular. EL primer grupo incluye al TLR1,2 4, 5 y 6 los cuales están presentes sobre la membrana celular EL segundo grupo incluye al TLR3, 7, 8 y 9 los cuales se localizan en compartimientos intracelulares como endosomas.<sup>236</sup> Los TLRs intracelulares censan ácidos nucleicos virales y bacterianos en particular. Partículas virales son endocitadas y degradadas en endosomas tardíos o lisosomas y esa degradación causa liberación de ARN o ADN permitiendo su contacto con los TLRs. Sin embargo, ha sido sugerido que la localización intracelular de esos TLRs es importante para discriminar ADN propio del ADN de virus. Cuando en la región transmembranal y citoplásmica del TLR9 es reemplazada por la del TLR4, la proteína quimera TLR9N4C es transportada hacia la membrana,<sup>279</sup> Mientras TLR9N4C responde a ADN CpG, ésta no tiene la habilidad de sensar ADN viral. Mas importantemente, cuando TLR9N4C es expresada sobre la superficie celular de macrófagos, éstas células responden a su propio ADN. Como el reconocimiento anormal del propio ADN es asociado con la patogénesis de enfermedades autoinmunes, la localización intracelular del TLR9 puede actuar como salvavidas contra el contacto de ADN propio.

En pDC, TLR9 actúa como sensor de infecciones virales, el cual permite la transcripción de IFN tipo I, particularmente de IFN $\alpha$ , a través de la vía MyD88-IRF7. En otras células como las células dendríticas convencionales o macrófagos, los ligandos para TLR9 inducen pobremente IFN tipo I, pero pueden permanecer induciendo citocinas inflamatorias. Un mecanismo que explica esas diferencias es que las pDC expresan IRF7 y las otras células no. Sin embargo, la regulación espacio-tiempo de la señalización de TLR9 ha sido recientemente propuesta como una explicación alternativa para la habilidad de pDC en la robusta producción de IFN $\gamma$ .<sup>280</sup>

En contraste con la señalización intracelular de los TLRs, la cual utiliza MyD88 o TRIF, los TLRs localizados sobre la membrana plasmática, como el TLR1, 2, 4, 6 usan TIRAP y/o TRAM como adaptadores adicionales, sugiriendo una unión entre el uso de los adaptadores y la localización de los TLRs. TRAM se localiza en la membrana plasmática y aparato de Golgi, donde se colocaliza con TLR4 pero no con TLR3.<sup>281</sup> Mutaciones en el sitio de miristolización del extremo terminal N de TRAM provocan su distribución en el citoplasma y suprime la activación de NF- $\kappa$ B e IRF3, indicando la importancia de su

localización en la membrana plasmática. Proteínas miristoladas son fosforiladas por PKC, provocando su disociación de la membrana plasmática; en consecuencia, TRAM es fosforilada en serina 16 por PKC $\epsilon$  en respuesta al LPS.<sup>282</sup> Ésta fosforilación es requerida para la activación de NF- $\kappa$ B y MAPK en células estimuladas con LPS así como en la eliminación de otros tipos de bacterias. Colectivamente, la fosforilación de TRAM por PKC $\epsilon$  en la membrana plasmática y su subsecuente disociación de la misma, es un pre-requisito para la activación de la vía dependiente de TRIF. Actualmente no es bien claro como el LPS activa a PKC $\epsilon$  en la señalización de TLR. TIRAP contiene un dominio de unión a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), blanco de TIRAP en la membrana plasmática y facilita interacciones con TLR4.<sup>283</sup> Mutaciones en los sitios de unión PIP<sub>2</sub> disminuyen la capacidad de TIRAP de localizarse en la membrana plasmática para inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias en respuesta al LPS, sugiriendo que el reclutamiento de TIRAP dependiente de PIP<sub>2</sub> a la membrana es importante para la señalización de TLR4. La señalización por integrina regula la producción de PIP<sub>2</sub> a través de la activación de la GTPasa ARF6 y PI5K. Macrófagos que carecen de la integrina C11b muestra una menor localización de TIRAP en la membrana y una hiposensibilidad al LPS. Estos hallazgos sugieren que el TLR4 recluta TIRAP en la membrana plasmática como resultado de la producción de PIP<sub>2</sub> mediado por integrina C11b, y que posteriormente activa MyD88 después de que el complejo de señalización es montado para iniciar la señalización dependiente de MyD88.

#### 4.6. Regulación de la señalización de TLR.

La regulación negativa de la señalización de los TLR es esencial para limitar tanto la inflamación como de moléculas identificadas como reguladores negativos. Algunas de esas moléculas regulan negativamente la expresión de los TLR, mientras que otros regulan negativamente la señalización vía secuestro de moléculas de señalización, bloqueo de su reclutamiento, degradación de proteínas blanco e inhibición de la transcripción. Además, la mayoría de esas proteínas son inducibles, sugiriendo una retroalimentación negativa de la respuesta de inmunidad innata dependiente de los TLR.

RP105, originalmente identificada como proteína de superficie específica de células B que promueve la proliferación, contiene un LRR extracelular con una homología a la del TLR4 y un tallo citoplásmico corto.<sup>284</sup> EL LRR de RP105 se asocia con MD-1 para formar un complejo sobre la superficie celular.<sup>285</sup> RP105 es también expresado sobre células no B y el complejo RP105-MD-1 interactúa con el complejo TLR4-MD2 para prevenir la unión de LPS con TLR4-MD-2. Ratones deficientes de RP105 muestran una hiperproducción de citocinas proinflamatorias en respuesta al LPS, pero responden normalmente a ADN CpG, indicando que RP105-MD-1 específicamente inhibe la señalización de TLR4.<sup>286</sup>

ST2L pertenece a la familia del receptor de IL-1, compuesta por un dominio tipo inmunoglobulina extracelular y un dominio TIR intracelular. Ratones con mutaciones en ST2L muestran una producción mejorada de citocinas proinflamatorias en respuesta al LPS y una inducción afectada en la tolerancia al LPS.<sup>287</sup> ST2L secuestra MyD88 y TIRAP para inhibir el reclutamiento de esos adaptadores al TLR4.

SIGIRR también pertenece a la familia de receptores IL-1, pero carece de 2 residuos e aminoácidos esenciales para su señalización.<sup>288</sup> Células epiteliales intestinales y de riñón y esplenocitos derivados de ratones deficientes de SIGIRR responden fuertemente al tratamiento con LPS y ADN CpG respecto a la activación incrementada de NF- $\kappa$ B y JNK. SIGIRR interactúa con IRAKs y TRAF6 para bloquear la señalización de los TLR.

Triad3A es una ligasa E3 que se une al dominio TIR del TLR4 y 9, pero no del TLR2. La sobre-expresión de Triad3 promueve la degradación de TLR4 y TLR9 vía proteosoma, inversamente, una reducción de la expresión de Triad3A por ARN silenciadores aumenta la expresión de esos TLRs con una concomitante activación de moléculas de señalización.<sup>289</sup> Esos datos sugieren que Triad3A actúa como regulador negativo de la señalización de los TLR, regulando negativamente la expresión de TLR4 y TLR9.

Varias proteínas intracelulares han sido identificadas como reguladores negativos de la función de las proteínas adaptadoras contenidas en el dominio TIR. Entre los miembros de la familia IRAK, IRAK-M carece de actividad cinasa intrínseca, y la sobre expresión de IRAK-M resulta en la prevención de la disociación de IRAK4 e IRAK1 de MyD88.<sup>290</sup> En consecuencia, ratones deficientes de IRAK-M secretan mas citocinas inflamatorias en respuesta a varios ligandos de TLR con respecto a los ratones tipo silvestre. La constatación de que IRAK-M es inducible por LPS sugiere una función de retroalimentación negativa de IRAK-M en la señalización de TLR. Variantes de empalme de IRAK1 (IRAK1c), IRAK2 (IRAK2c, IRAK2d) y MyD88 (MyD88s) han sido aisladas e implicadas en antagonizar la señalización de TLR.<sup>291,292</sup> IRAK1c carece de actividad cinasa, y por lo tanto, interfiere con la señalización de TLR. IRAK2c e IRAK2d carecen de dominio muerto, el cual es requerido para la interacción con MyD88, previniendo su reclutamiento. MyD88s forma un heterodímero con MyD88, el cual no es capaz de reclutar IRAK4, de éste modo se inhibe la fosforilación de IRAK1.

SOCS1 es una ligasa E3 inicialmente identificada por suprimir las vías de JAK-STAT y también suprime la señalización río debajo de TLR4 y TLR2. TIRAP es fosforilado por una tirosina cinasa, Btk, en respuesta a ligandos de TLR2 y TLR4, e interactúa con SOCS1, el cual subsecuentemente marca a TIRAP para ubiquitinación y degradación.<sup>293</sup>

Mientras TRAF3 y TRAF6 regulan positivamente la señalización de TLR, TRAF1 y TRAF4 están implicados en la regulación negativa. TRAF1 interactúa con TRIF, y la sobre expresión e TRIF causa la escisión de TRAF1 dependiente de caspasa-8.<sup>294</sup> Los fragmentos escindidos de TRAF1 pueden inhibir la activación de NF- $\kappa$ B e IRF3 dependiente de TRIF, sugiriendo que la escisión de TRAF1 inducido por TRIF1 es responsable del bloqueo de la vía dependiente de TRIF. TRAF4 interactúa con TRIF y TRAF6, y su sobreexpresión resulta en la inhibición de la activación inducida por TRIF y TRAF6.<sup>295</sup> TRAF4 también suprime la de NF- $\kappa$ B dependiente de MyD88, por lo tanto, TRAF4 puede servir para antagonizar la función de TRAF6 por su prevenir su reclutamiento hacia el complejo adaptador. Adicionalmente, la función de TRAF6 es regulada negativamente por varios mecanismos independientes. En respuesta al LPS, arrestina- $\beta$  interactúa con TRAF6 para prevenir su oligomerización, resultando en la inhibición de poliubiquitinización de TRAF6 y subsecuente activación de las MAPK e NF- $\kappa$ B.<sup>296</sup>

A20, una enzima de desubiquitinización inducible, remueve los restos de ubiquitina de TRAF6 para terminar la señalización de TLR.<sup>297</sup> Ratones deficientes A20 muestran una mejor activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a múltiples ligandos para TLR, incluyendo TLR2,4 y 9.<sup>297</sup>

La activación de factores de transcripción es también regulada negativamente. La fosforilación de la región terminal C de IRF3 por TBK1/IKKi es esencial para su actividad transcripcional. IRF3 también es fosforilado en Ser339, y su fosforilación está relacionada con la desestabilización de IRF3 mas que con su activación. La peptidil-prolil isomerasa Pin1 citoplásmica, la cual cataliza la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos localizados en el extremo terminal N de la prolina para modular la función del sustrato, uniendo a IRF3 cuando es fosforilado en Ser339, activando ubiquitinización y subsecuente activación de IRF3 por una vía dependiente de proteosoma para finalizar las respuestas de IFN.<sup>298</sup> La estimulación con LPS permite la expresión de ATF3, un miembro de la familia de factores de transcripción ATF/CREB. Macrófagos deficientes de ATF3 producen grandes cantidades de IL6 e IL-12. Mecánicamente, ATF3 recluta histonas desacetilasas, las cuales alteran la estructura de la cromatina para restringir el acceso de NF- $\kappa$ B y AP-1 a la región promotora de los genes que codifican para IL-6 e IL-12, y por lo tanto, reprime su expresión.<sup>299</sup>

Se ha reportado que IRF4 se une a MyD88.<sup>300</sup> Mientras IRF7 se une a al extremo N terminal de MyD88, IRF5 e IRF4 interactúan con la misma región central de MyD88. Macrófagos derivados de ratones deficientes de IRF4 muestran una alta expresión de genes de citocinas proinflamatorias, la cual es dependiente de IRF5. Como la expresión del gen IRF4 es sobre-regulada después de la exposición con ligandos de TLR, el IRF4 inducido puede asociarse con MyD88 para prevenir el reclutamiento de IRF5, así atenuando la respuesta inflamatoria dependiente de IRF5.

#### 4.6.1. Regulación por miARN

Recientemente, micro ARNs (miARN) han emergido como reguladores claves de los TLR, en particular en macrófagos, y es muy probable que su regulación en la señalización permita la resolución del proceso inflamatorio.

miARNs son ARNs no codificantes (21-22 nucleótidos), la mayoría de los cuales son intergénicos o intrónicos, aunque una minoría son derivados de ARNs mensajeros que codifican para proteínas.<sup>301</sup> miARNs se acoplan con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), produciendo miRISCs que se unen a sus UTR 3' complementario de genes blanco y por lo tanto, reprime la traducción del ARN mensajero, promueve degradación o estabiliza el ARN mensajero blanco. En macrófagos, se han descrito en particular 3 miARNs: miR-155, miR-146a y miR-21.<sup>302</sup> Interesantemente, miR-155 y miR-146a están presentes específicamente en macrófagos inducidos por LPS, en comparación con neutrófilos polimorfonucleares activados similarmente, sugiriendo un rol particular para esos miARNs en macrófagos.<sup>303</sup>

## miR-155

El gen que codifica para miR-155 está localizado sobre el cromosoma 21 en el cluster de interacción de células B (BIC).<sup>304</sup> BIC es una región altamente conservada entre humanos y ratones, y es altamente expresada en órganos linfoides. La expresión de miR-155 es fuertemente inducida por LPS o IFN de tipo I, tanto en monocitos y macrófagos de humano y de ratón, demostrando que esos miARNs participan en la respuesta inmune innata tanto en infección bacteriana y viral.<sup>305,306</sup>

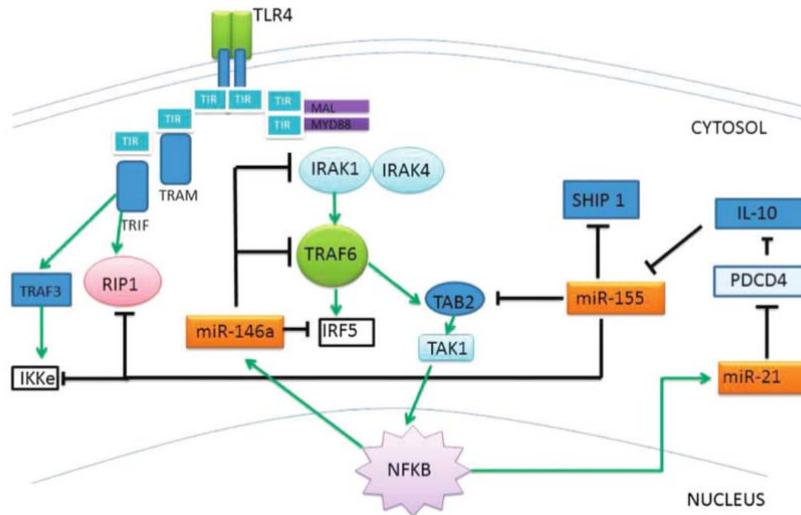
Además, miR-155 es sobre-expresado en células T y B activadas y ha sido demostrado que juega un rol en la regulación de la expresión de citocinas en el centro germinal.<sup>307</sup> miR-155 es inducido tanto por las vías de MyD88 y TRIF a través de la estimulación con LPS o poli I:C,<sup>306</sup> regulando respuestas proinflamatorias más que antiinflamatorias. Esto es por que uno de sus roles en macrófagos es permitir la traducción de TNF.<sup>305,308</sup> Macrófagos en condiciones basales, el UTR 3' de TNF induce su autorepresión, la cual es liberada bajo la estimulación de LPS vía unión de miR-155. Esto ha sido demostrado en macrófagos, donde la sobreexpresión de miR-155 resulta en una producción incrementada de TNF y su deficiencia, resulta en niveles bajos de TNF.<sup>308</sup> Por lo que probablemente la regulación de miR-155 en macrófagos limita la producción de TNF y podría ser usado como terapéutico en enfermedades mediadas por TNF. En un estudio *in vivo* se demostró que células B que sobre-expresan miR-155 transgenicamente producen más TNF y dichos ratones tienen una elevada susceptibilidad al shock séptico inducido por LPS.<sup>307</sup> A la vez, miR-155 es regulado negativamente por IL-10, una citocina antiinflamatoria.<sup>309</sup> La inhibición de miR-155 por IL-10 incrementa la expresión del dominio homólogo Src 2 (SH2) contenido en la inositol 5 fosfatasa 1 (SHIP1), un conocido blanco de miR-155.<sup>310,311</sup> Previamente, se ha demostrado que SHIP1 funciona como regulador negativo de las respuestas inducidas por TLR.<sup>312-314</sup> La acción de SHIP1 es probable que sea a través de un loop de regulación negativa como la proteína serina/treonina cinasa AKT, la cual es desregulada por SHIP1, regulando negativamente miR-155.<sup>315</sup> Así, después de la estimulación con LPS, el incremento en la expresión de miR-155, bajos niveles de SHIP1 y actividad incrementada de AKT; como AKT desregula miR-155, los niveles elevados de miR-155 son llevados hacia sus niveles iniciales. Se ha visto que ratones noqueados para miR-155 poseen una alterada respuesta inmune para *Salmonella typhimurium*, y esos ratones no pueden ser exitosamente inmunizados contra ese patógeno.<sup>316</sup> Análisis adicionales revelaron un defecto en la activación de células B y T, explicando la ineficiente inmunización en esas cepas. Además, la falla en la respuesta de las células T, es debido en parte a la deficiencia de las células dendríticas para presentar antígeno debido a una alterada respuesta Th1, en las cuales, las células T CD4+ tuvieron una menor producción de citocinas.<sup>316</sup> Dicha respuesta es probablemente debido a la falla de las células dendríticas para activar funcionalmente señales co-estimuladoras y a una defectuosa presentación de antígeno; donde miR-155 puede ser responsable de la alterada producción de citocinas. Un segundo estudio mostró que ratones noqueados para miR-155 presentaban un reducido número de centros germinales de células B, mientras que los ratones que sobreexpresaban miR-155 mostraban elevados niveles, concluyendo que miR-155 alcanza su respuesta en parte por regulación de la expresión de citocinas, como TNF.<sup>307</sup>

## miR-146

miR-146 es uno de los más prominentes siARNs activados por LPS en macrófagos.<sup>302,317</sup> Resolvina D, un mediador lipídico antiinflamatorio, también induce miR-146.<sup>318</sup> La expresión de miR-146 es dependiente de NF- $\kappa$ B y hasta la fecha, IRAK1, IRAK2 y TRAF6 han sido demostrados por ser blancos de miR-146.<sup>317</sup> Dichos blancos son componentes de la señalización de NF- $\kappa$ B y por lo tanto, controlan su expresión. IRAK1 fué validado como blanco de miR-146 en estudios *in vivo*.<sup>319</sup> Desde que IRAK1 y TRAF6 son requeridos para la activación de NF- $\kappa$ B, hay por lo tanto un loop de regulación negativa, mediante el cual la activación de NF- $\kappa$ B sobre-regula a miR-146, que bajo maduración, desregula a IRAK1 y TRAF6 y por lo tanto, se reprime la actividad de NF- $\kappa$ B. IL-1 $\beta$ , la cual es producida en respuesta a endotoxinas bacterianas, activa la producción de miR-146, resultando en una disminución en varias citocinas y quimiocinas, incluyendo CXCL8, CXCL5, CXCL8, IL-6 e IL-1 $\beta$  por sí misma,<sup>320-323</sup> y por lo tanto, previene una inflamación exacerbada además de conducir hacia la homeostasis. Ratones de 6 meses de nacidos y noqueados para miR-146 desarrollaron desordenes autoinmunes que culminaron en la muerte. Esos ratones exhiben menor tolerancia y sus macrófagos responden mucho más al LPS, además que desarrollan tumores en los órganos linfoides debido a inflamación crónica.<sup>324</sup> miR-146 es por lo tanto, el mejor miARN entendido en términos de prevención del daño inflamatorio, y su rol puede ser potencialmente explotado para prevenir ciertos desordenes inflamatorios y tumores.

## miR-21

miR-21 es producido bajo la estimulación de LPS vía MyD88 de manera dependiente de NF- $\kappa$ B en macrófagos.<sup>325</sup> Controla la inflamación por desregular la traducción del supresor de tumor inflamatorio de muerte celular programada 4 (PDCD4),<sup>325</sup> un inhibidor de la producción de IL-10. Por lo tanto, miR-21 promueve la producción de IL-10 bajo la estimulación de LPS por regulación de PDCD4. IL-10 es una citocina antiinflamatoria que bloquea a NF- $\kappa$ B y por lo tanto, limita la respuesta inflamatoria. Por lo que miR-21 puede ser otro miARN clave en la regulación de la inflamación. miR-21 regula a NF- $\kappa$ B de manera celular-específica. miR-21 forma un loop de regulación negativa en células de inmunidad innata que mantienen la inflamación en jaque al limitar la expresión de NF- $\kappa$ B a través de la sobre regulación de IL-10; IL-10 reprime a NF- $\kappa$ B. En contraste, en células tumorales, miR-21 desregula la fosfatasa y tensina homóloga (PTEN) y activa a AKT, y por lo tanto, mantiene/aumenta la actividad de NF- $\kappa$ B.<sup>326</sup> y por lo tanto, promueve la tumorigénesis. Un número de blancos de miR-21 en genes asociados a tumores han sido identificados y validados, incluyendo la tropomiosina 1 (TPM1), la proteína rica en cisteína inducida por reversión con motivos Kazal (RECK), ligando Fas (FasL), proteína 63 asociada a tumor (TAp63) y ribonucleoproteína K nuclear heterogénea (HNRPK).<sup>327-330</sup> miR21 es por lo tanto, visto como un “oncomir”, y su activación por TLR otra relación entre inflamación y cáncer.**Fig. 9**



**Fig. 9. Mecanismos de regulación de la señalización de TLRs por miARN.** mi-R45, mi-R21 y mi-R146a están implicados en la regulación de la respuesta inmune iniciada por los TLRs. *International Immunology*, 2011.

#### 4.5. Recetores tipo toll (TLR) en enfermedad periodontal

El sistema inmune innato es la primer línea de defensa que protege al hospedero de la invasión de patógenos microbianos. Las células hospederas expresan varios receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que censan diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que van desde lípidos, lipoproteínas y ácidos nucleicos.<sup>236</sup> El reconocimiento de los PAMPs por los PRRs activa vías de señalización intracelular que culminan en la inducción de citocinas inflamatorias, quimiocinas, interferones (IFNs) y sobre regulación de moléculas co-estimuladoras.

En mamíferos, la familia de receptores tipo toll (TLR) expresados sobre las células presentadoras de antígeno como células dendríticas y macrófagos, son de suma importancia para en la inducción de respuestas de inmunidad innata así como en el subsecuente desarrollo de inmunidad adaptativa.

El hallazgo que la familia de receptores de reconocimiento microbiano como los TLR están presentes en el periodonto, ha abierto la posibilidad de que varias especies bacterianas, incluyendo especies comensales y bacterias patógenas, sean reconocidas por células periodontales. Éstos receptores de reconocimiento de patrones reconocen componentes microbianos (como ADN, flagelos y fimbrias, etc.) que son compartidos tanto por bacterias comensales como por patógenos, pueden reconocer ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram+ como lipopolisacáridos de bacterias Gram-, activando cascadas de señalización involucradas en varias respuestas del sistema inmune innato.<sup>331</sup>

Una vez que la composición de la placa dental permite la simbiosis de microorganismos, varias bacterias encontradas en la placa subgingival puede contribuir a una respuesta inflamatoria destructiva. La placa dental posee varios

microorganismos que pueden activar tanto a TLR2 como TLR4. Muestras de individuos con mayor presencia de placa dentobacteriana mostraron mayor activación de TLR4 en comparación de individuos con menos placa, ambos grupos indujeron la activación tanto de TLR2 como TLR4.<sup>332</sup> Además, no hay una fuerte asociación entre especies bacterianas específicas en la placa dental y la habilidad de activar a TLR2 o TLR4. Sorpresivamente, el TLR2 medió la pérdida ósea en respuesta a *P. gingivalis* en un modelo de ratón, aún cuando la unión al TLR4 provoca una respuesta inflamatoria mas potente.<sup>333,334</sup> Estos datos apoyan la teoría de que el TLR2 puede interactuar con bacterias comensales Gram+, iniciando la respuesta inflamatoria destructiva.

Las células epiteliales del surco gingival son las primeras células que responden a los PAMPs. Esa células expresan la molecula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y el ligando para la función linfocítica asociada con el antígeno-1 (LFA-1), los cuales, interactúan directamente en la fijación y migración de leucocitos hacia el surco gingival. IL-8, un potente quimioatrayente de neutrófilos, es liberado por células epiteliales para iniciar la migración de neutrófilos.<sup>335</sup> Células epiteliales también producen metaloproteinasas de matriz en respuesta a PAMPs, causando daño directo en tejidos gingivales.<sup>337</sup> Cuando se estimula a través de los TLRs, los neutrófilos exhiben quimiotaxis incrementada así como la producción de citocinas proinflamatorias.<sup>338</sup> La IL-8 secretada por células epiteliales, estimula a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos a través de TLR-4, permitiendo una incrementada adhesión de monocitos por expresión incrementada de selectina-E, ICAM-1 y VICAM-1.<sup>339</sup>

Las CDs son células inmunes residentes presentes tanto en el epitelio como en el tejido conectivo. Los TLRs presentes en esas células inducen su maduración cuando son estimuladas por PAMPs, esas células no solo actúan como células presentadores de antígeno, si no también producen citocinas y moléculas coestimuladoras que activan las respuestas TH1 y Th2.<sup>340</sup> A medida que el epitelio de unión se rompe, los microorganismos y sus productos obtiene acceso al tejido conectivo subyacente activando directamente a las células presentes ahí. Una vez estimuladas por PAMPs, fibroblastos gingivales producen citocinas proinflamatorias que conllevan a la inflamación y destrucción del tejido. Fibroblastos del ligamento periodontal, por otra parte, producen proteinasas bajo la estimulación de TLRs, resultando en la degradación directa del tejido periodontal.<sup>341</sup> Por lo que la señalización de los TLRs en el epitelio de unión es importante en el mantenimiento de salud y progresión de la enfermedad periodontal. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales los TLRs permiten la evasión inmunológica de bacterias y la progresión de la enfermedad no es bien conocida. Una disrupción en la homeostasis del tejido que permite la producción de citocinas inflamatorias destructivas, claramente contribuye al daño asociado con periodontitis. Sin embargo, la diversidad de diferentes especies bacterianas presentes y la habilidad de los miembros de la familia de receptores tipo toll de reconocer tanto especies comensales como patógenas, contribuye a la modulación disfuncional de la respuesta inmune innata.

En la actualidad, no se sabe que vías de señalización deben ser bloqueadas para atenuar la destrucción y mejorar la defensa del huésped. Por lo que se requiere de nuevas investigaciones que permitan entender estos mecanismos y desarrollar alternativas terapéuticas para el control de la periodontitis.

## 5. Ácido lipoteicoico y su actividad inflamatoria

Las infecciones se caracterizan por reacciones inflamatorias del hospedero ante microorganismos patógenos, como ya se ha mencionado, 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).

Los ácidos teicoicos fueron identificados en 1958 por Baddiley y cols. cuando investigaban el papel de las moléculas de glicerol difosfato (CDP-glicerol) y citidina de robitol difosfato (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 último 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, determinando que los ácidos lipoteicoicos son 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.<sup>342</sup>

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 un polímero de glicerolfosfato que contiene azúcar y 2 grupos acilo, éstos últimos le confieren la capacidad de anclarse a la membrana celular.<sup>343,344</sup>

Se ha propuesto que el LTA 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 que 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.

### 5.1. Mecanismo de transducción del LTA

Una vez que el LTA se une a su receptor TLR2 se activa la fosfatidilcolina-3-oxilipasa 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- $\kappa$ B y la subsecuente expresión de COX-2 y liberación de prostaglandina E<sub>2</sub>. 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 visto que PI3K $\gamma$  se activa por receptores acoplados a proteínas G durante procesos inflamatorios. Neutrófilos de ratón deficientes de PI3K $\gamma$  muestran isquemia, reducción en migración y peritonitis. Así mismo, se muestra una reducción en la translocación de NF- $\kappa$ B y en la síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estos estudios sugieren que PI3K $\gamma$  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 (AKT) y de la cinasa del inhibidor  $\kappa$ B (IKK). El incremento en la actividad de estas cinasas consecuentemente activa a diversos factores de transcripción como NF- $\kappa$ 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 colocalización 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- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B y la expresión de iNOS en células de kupffer y monocitos.<sup>345</sup>

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 a 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 $\beta$  y a la MAP cinasa 6 (MKK6). La cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK) se requiere para la activación de la cinasa de  $\kappa$ B (IKK) que promueve la fosforilación, ubiquitinación y degradación el proteosoma 26s de I $\kappa$ B y la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Al proteína cinasa MAP- $\beta$  (MKK $\beta$ ) 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 $\zeta$  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- $\kappa$ B. Diversos reportes señalan que las células de Kupffer producen IL-6 y TNF- $\alpha$  durante el trauma, éstas células también sintetizan citocinas antiinflamatorias como IL-10 en respuesta al tratamiento con LTA. La cinasa PKB que está 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- $\alpha$ .<sup>346</sup>

## 5.2. Efectos del LTA

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 *in vivo*, el LTA actúa en sinergia con el peptidoglucano para causar falla en órganos de ratas,

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.<sup>347-351</sup>

En fibroblastos gingivales humanos y cardiomicocitos de ratón (H9c2), se ha visto que el LTA activa múltiples vías de señalización, como la vía de PI3K, MAPKs y promueve la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B así como la expresión de COX-2 en diferentes tiempos. Además, se ha observado que el LTA promueve la fosforilación de AKT y GSK-3. Además, la inactivación de GSK-3 promueve la acumulación nuclear de catenina- $\beta$  y la expresión de conexina 43, dichos efectos, fueron abatidos durante el tratamiento con inhibidores de PI3K, demostrando el papel de LTA en la regulación inmunológica de enfermedad periodontal.<sup>352,353</sup>

Como hemos visto, las señales intracelulares que desencadenan PAMPs de bacterias colonizadoras de la placa dentobacteriana, incluyen las vías de señalización de las MAP cinasas y PI3K-AKT, donde el factor de transcripción NF- $\kappa$ B es crucial en la regulación de la respuesta inflamatorio. El entendimiento de éstos mecanismos puede ser de gran importancia clínica, ya que la regulación de estas cascadas de señalización pueden ser un blanco terapéutico, donde compuestos polihidroxiados como los flavonoides, han regulado cascadas de transducción involucradas en inflamación, estrés oxidativo y cáncer.

## 6. Flavonoides

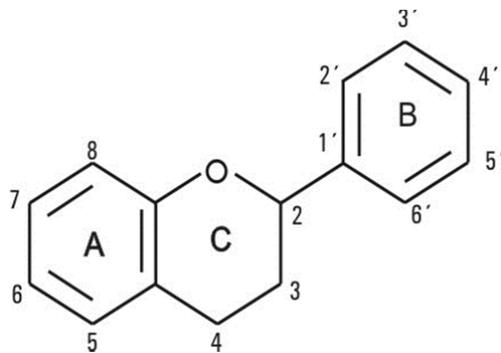
A través de la historia de la humanidad, la Medicina se ha preocupado por mantener y/o restablecer un estado óptimo de salud; de igual manera, es evidente la correlación de una buena alimentación con un estado de salud óptimo. Esto es muy evidente en culturas orientales, en las cuales, su población alcanza edades avanzadas con muy buenos niveles de salud. Las investigaciones enfocadas en alimentos que componen su dieta, demostraron que ciertas sustancias contenidas en frutas, semillas y vegetales regulan procesos dañinos para el cuerpo humano como la acumulación de radicales libres, inflamación e incluso el cáncer, todo esto sin efectos secundarios adversos.

Los vegetales, mediante el proceso de la fotosíntesis producen las sustancias necesarias para todos los ciclos vitales de la naturaleza. Las plantas, además de producir sustancias como los carbohidratos, proteínas y 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 nombradas así porque las primeras que se lograron aislar eran de color amarillo, sin embargo, 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. Probablemente, la primera vez que la ciencia descubrió los flavonoides fue cuando Roberto Boyle en 1664, hizo una primera descripción de los efectos de los pigmentos de las flores en medio ácido y básico.<sup>354</sup> Posteriormente, el primer flavonoide fue indentificado en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina, Dr. Albert Szent-Gyorgi, quién 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.<sup>355</sup>

### 6.1. Estructura química y clasificación

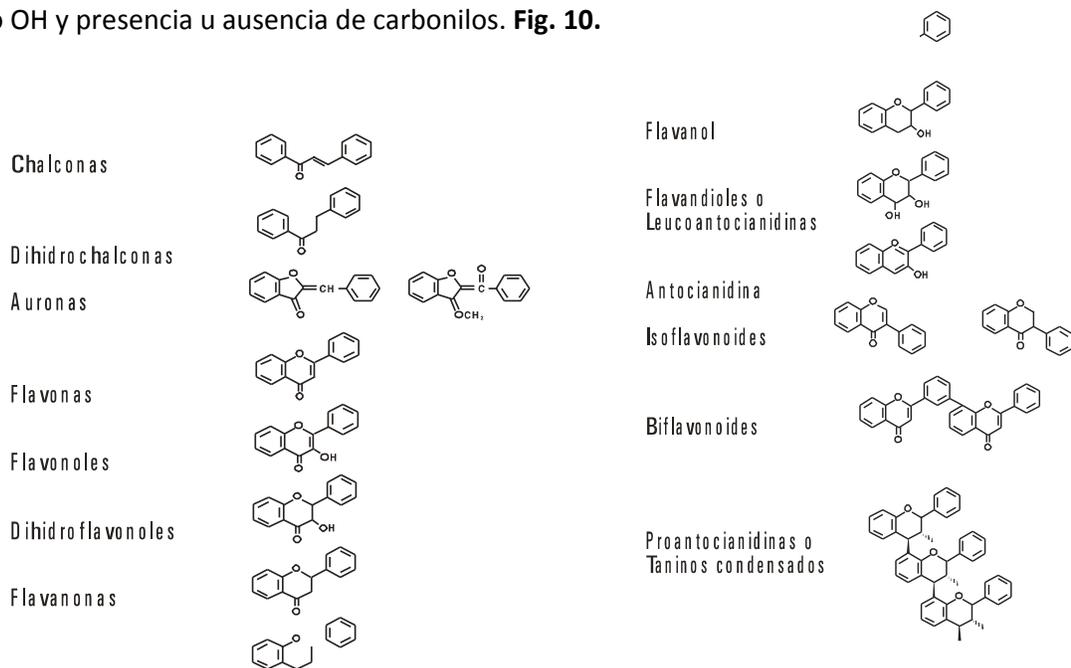
Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

**Fig. 10**



**Fig. 10. Estructura general de los flavonoides.** Los flavonoides comparten una estructura general formada por dos anillos fenilos (A y B) unidos mediante un anillo pirano heterocíclico (C). *Archivos de Cardiología de México, 2006.*

En función de sus características estructurales, se han identificado 13 subclases de flavonoides con un total de 5000 compuestos, los cuáles varían en las posiciones del grupo OH y presencia u ausencia de carbonilos. **Fig. 10.**



**Fig. 11. Clasificación de los flavonoides.** *Revista Cubana de Investigación Biomédica, 2003.*

## 6.2. Biosíntesis

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase luminosa de la fotosíntesis, en donde catalizan el transporte de electrones. Los aminoácidos fenilalanina y tirosina provienen de la ruta del ácido siquímico, el cual sintetizado en los plastos por condensación de 2 productos fotosintéticos, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato, y cuando a éste se le añade una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, se forma fenilalanina.

La biosíntesis de flavonoides se inicia cuando la fenilalanina, por acción de amoniliasas de fenilalanina, es transformada en ácido cinámico, que luego es convertido en ácido *p*-cumarínico por la incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático por la ácido cinámico 4-hidroxilasa. Posteriormente, la acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-ScoA, el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides.<sup>356</sup>

### 6.3. 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.<sup>357</sup>

### 6.4. Capacidad antioxidante de los flavonoides

Bajo una consideración biológica, un antioxidante puede definirse como aquella sustancia que cuando se encuentra presente a concentraciones mucho menores que las de un sustrato oxidable, disminuye o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato, por lo que los antioxidantes desempeñan un papel fundamental en la protección de estructuras celulares que pudieran ser dañadas en reacciones que involucren radicales libres,<sup>358</sup> pues éstos atacan a los ácido grasos saturados en las membranas, causando así peroxidación de lípidos, disminución en la permeabilidad membranal así como daño a proteínas membranales, procesos implicados en el desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.<sup>359</sup>

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres.<sup>360-362</sup> Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas como la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, la NADH oxidasa y la xantina oxidasa, evitando la generación de especies reactivas de oxígeno así como de hidroperóxidos inorgánicos.<sup>363,364</sup> Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben las enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la PLA2,<sup>365</sup> al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes como la catalasa y superóxido dismutasa.<sup>366</sup> De ésta forma, los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres.

Las especies reactivas de oxígeno reaccionan con las biomoléculas conduciendo al daño celular y tisular.<sup>367</sup> Afortunadamente el organismo cuenta con mecanismos efectivos para protegerse de los efectos nocivos de éstas especies químicas.<sup>368,369</sup> Estos mecanismos se componen de enzimas y de complejos no enzimáticos como el glutatión (GSH), ácido ascórbico y el  $\alpha$ -tocoferol contenido en membrana.

Numerosas investigaciones han evaluado la actividad antioxidante de los flavonoides frente a los radicales libres generados durante la peroxidación lipídica, ya sea enzimática o no. Casi todos los resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes hidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes, y que éste efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en posición 4, como sucede con la quercetina.<sup>370-375</sup> Al mismo tiempo se evidencia que las agliconas de los flavonoides se muestran más potentes en sus acciones antilipoperoxidativas que sus correspondientes glucósidos.<sup>371</sup>

Por su parte, las antocianidinas muestran muy buenas propiedades secuestrantes de radicales libres.<sup>376,377</sup> Sin embargo, dependiendo de las condiciones experimentales, sus bajos potenciales de oxidación pueden hacer que éstas se comporten como agentes pro oxidantes, involucrándose en procesos de ciclaje redox. En éste sentido, su estructura polihidroxilada desempeña un papel muy importante. Por lo tanto, los flavonoides con un grupo pirogalólico en el anillo B exhiben una mayor actividad antioxidante que los que presentan un grupo catecólico, sin embargo, al mismo tiempo son más susceptibles a mostrarse como agentes pro oxidantes, lo que neutraliza sus efectos antioxidantes.<sup>378</sup>

Los flavonoides secuestran  $O_2^-$  y  $OH^\cdot$ .<sup>375,379,380</sup> Morazzoni y cols. pusieron de manifiesto que la rutina, seguido de la quercetina, se comportó como el secuestrador más fuerte de  $O_2^-$ , generado enzimáticamente a través del sistema xantina oxidasa y no enzimáticamente a través del sistema NADH- metosulfato de fenacina. Los valores de  $IC_{50}$  de la peroxidación lipídica en homogenatos de hígado de ratón estuvieron en el orden de  $10^{-6}M$  para ambos flavonoides.<sup>377</sup> En este mismo contexto, una investigación con 15 flavonoides dió a conocer que las constantes de reacción de éstos con el  $O_2^-$  se encuentran en intervalos de  $1 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-7}$  mM.<sup>381</sup>

La (+)catequina, la (-)epicatequina, la 7,8-dihidroxi flavona y la rutina secuestran el  $OH^\cdot$  generado en un sistema de Fenton en un rango de 100 a 300 veces superior a los efectos del manitol, típico secuestrador de especies reactivas de oxígeno. El ensayo se efectuó a través de la determinación del ácido metanesulfónico formado por la reacción del DMSO y éste radical.<sup>382</sup> Por su parte, la quercetina y la luteolina suprimieron la reacción de Fenton interfiriendo la onda catalítica voltamétrica. Un grupo catecol en el anillo B, el grupo carbonilo en posición 4 y una región 5-hidroxi que pueden aumentar la quelación de Fe por parte de éstos compuestos, pudieran explicar éstos resultados.<sup>383</sup>

Los flavonoides inhiben también los efectos degradativos provocados por el  $H_2O_2$ .<sup>363,376</sup> La quercetina y la catequina eliminaron la toxicidad de  $H_2O_2$  en células V79 de hámster chinos, a través de la formación de colonias en *Salmonella* TA104 y *E. coli* PQ37. Los flavonoides impidieron la disminución en el número de colonias provocadas por  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  en éstas células. Los grupos OH de las posiciones 3' y 4' en el anillo B y un doble

enlace entre los carbonos 2 y 3, unido al grupo carbonilo de la posición 4 en el anillo C, son cruciales para la actividad protectora.<sup>384</sup>

Numerosas evidencias apuntan hacia la protección del ADN ejercidas por los flavonoides al inhibir los efectos oxidativos que provocan las especies reactivas de oxígeno sobre el ADN. Se mostró que el pretratamiento con flavonoides a concentraciones entre 7.6 y 297.4mM redujo el daño oxidativo al ADN generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 100mM en linfocitos humanos, siendo apigenina y luteolina los más efectivos.<sup>385</sup>

La ciclooxigenasa y lipoxigenasa, involucradas en la cascada del ácido araquidónico, resultan inhibidas por los flavonoides en múltiples ensayos experimentales. La eficacia de la inhibición varía enormemente; así, un único flavonoide puede inhibir a una enzima a bajas concentraciones, pero puede necesitar de concentraciones 100 veces superiores para inhibir a otra. Por ejemplo, la silibina inhibe fuertemente a la lipoxigenasa-5 de granulocitos humanos y de las células de kuffer humanas y de ratas, con valores de IC<sub>50</sub> alrededor de 15mM determinados por la formación de leucotrienos.<sup>386</sup> Sin embargo, se necesitan concentraciones de hasta 3 o 4 veces mayores para lograr la mitad de inhibición máxima en la vía de COX en células endoteliales y granulocitos humanos.<sup>363</sup> Otro ensayo con 11 flavonoides mostró que éstos inhibieron tanto a la ciclooxigenasa como lipoxigenasa, pero algunos como el cirsilol y otros fueron más efectivos para inhibir a lipoxigenasa.<sup>386</sup>

## 6.5. Efecto de los flavonoides sobre algunos sistemas enzimáticos

*In vitro*, se demostró que los flavonoides afectan la actividad de diversos sistemas enzimáticos, aunque existen evidencias de que también pueden hacerlo *in vivo*, por lo que es pertinente indicar los efectos de los flavonoides sobre aquellos sistemas enzimáticos que pueden ser potencialmente blancos terapéuticos.

### Cinasas

PKC es una enzima que fosforila los residuos de serina y treonina, ampliamente distribuida en mamíferos, siendo dependiente de Ca<sup>2+</sup> y de fosfolípidos, con una participación activa en diversas funciones celulares como procesos inflamatorios y tumorigénicos.<sup>387-389</sup> Se ha demostrado que PKC es inhibida *in vitro* e *in vivo* por quercetina, morina, rutina y miricetina. Ferriola y cols. demostraron que fisetina y luteolina fueron los inhibidores más activos de la PCK de cerebro, ya que mediante experimentos en los cuales emplearon diferentes sustratos proteicos (histona y protamina) así como diversos activadores (diacilglicerol y acetato de tetradecanoilforbol), ambos flavonoides inhibieron el sitio de unión de ATP en la porción catalítica de PKC.<sup>390-396</sup> Además de PKC, otras enzimas que emplean el ATP como sustrato, fueron inhibidas por flavonoides mediante la unión competitiva del flavonoide al sitio de unión de ATP, mostrando que el grupo hidroxilo en posición 3 juega un papel importante en dicha actividad inhibitoria.<sup>397</sup> En adición, las MAP cinasas en células de cáncer epidérmico humano fueron fuertemente inhibidas por la quercetina a una concentración 30μM.<sup>398</sup> También, se demostró que la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), la cual cataliza la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina en varios tipos celulares, es inhibida por Kaempferol (IC<sub>50</sub>=0.45μM).<sup>399</sup>

## ATPasas

Los flavonoides también pueden afectar las ATPasas dependientes de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ATPasa mitocondrial y la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>400-405</sup> La ecto-ATPasa dependiente de leucocitos es inhibida por quercetina.<sup>406</sup> La  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico de músculo de ratón fue inhibida por varios flavonoides, en donde se observó también que éstos pueden inhibir la liberación de histamina de células mastocíticas.<sup>407</sup> En estudios de las proteínas contráctiles de músculo esquelético de conejo, se encontró que la quercetina causa un cambio conformacional en la estructura de la miosina, lo que coincide también con el incremento en la actividad de la ATPasa.<sup>408</sup> A concentraciones mayores, la quercetina inhibe la super precipitación de la automiosina así como la actividad de la ATPasa. En lo que respecta a la ATPasa dependientes de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , se ha demostrado que el sitio de inhibición no está relacionado con el sitio de unión específico para glucósidos cardíacos.<sup>409</sup>

## Ciclooxigenasa, lipoxigenasa y Fosfolipasa $\text{A}_2$ .

Se ha visto que la quercetina es un inhibidor efectivo de  $\text{PLA}_2$  en leucocitos humanos y de conejo.<sup>410,411</sup> La quercetagenina, el kaempferol y la escutalareina inhiben la  $\text{PLA}_2$  sinovial humana con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 12.2 a 17.6  $\mu\text{M}$ .<sup>413</sup> Yamamoto y cols. estudiaron el efecto de varias benzoquinonas, así como de diversos flavonoides, sobre algunas enzimas de la vía biosintética de los leucotrienos vasoactivos, encontrando que la 3'-4'-5 trihidroxi-6,7-dimetoxiflavona es un potente inhibidor de la 5-lipoxigenasa ( $\text{IC}_{50}=0.1\mu\text{M}$ ).<sup>414-416</sup> Para lograr tal inhibición, se requiere que el flavonoide posea una combinación de sus propiedades quelantes y reductoras de hierro, lo que se logra con los flavonoides polihidroxilados.<sup>417,418</sup> Así la inhibición selectiva de estas vías enzimáticas podría representar una esperanza terapéutica para la introducción de fármacos mas eficaces y seguros para en tratamiento de procesos inflamatorios, cáncer, Alzheimer entre otros.

## Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos

EL AMPc y el GMPc median diversos procesos biológicos a través de su capacidad de estimular a las proteínas cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, los cuales en turno, fosforilan a los sustratos proteicos celulares y desencadenan respuestas específicas. Ambos nucleótidos cíclicos se forman a partir de ATP y GTP mediante la activación catalítica de la adenilato y guanilato ciclasa, sin embargo, esta actividad se interrumpe por acción de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE). La inhibición de la PDE por los flavonoides ha sido ampliamente descrita, poniendo como requerimientos estructurales para esta inhibición la presencia de un núcleo flavona, flavanol y flavilio.<sup>419-421</sup> Se ha propuesto que la capacidad inhibitoria de la PDE por los flavonoides se debe a la semejanza estructural con el anillo de pirimidina del AMPc y a la presencia del anillo de pirinona en los flavonoides activos. Por lo anteriormente expuesto, las PDE son un blanco celular muy importante, dado que algunos flavonoides aislados y purificados de plantas muestran una inhibición selectiva. De igual manera, se ha demostrado que flavonoides como la apigenina, disminuyen la actividad plaquetaria inducida por prostaciclina, un efecto que ha sido atribuido a la inhibición de la adenilato ciclasa, por lo que inhibidores selectivos de ésta enzima podrían

presentar una notable actividad antiagregante plaquetaria.

### Sialidasa

La sialidasa (neuramidasa) cataliza la hidrólisis de residuos de ácido siálico a partir de siaglicoconjugados, ejerciendo un efecto sobre funciones biológicas ante la presentación de antígeno y receptores. La sialidasa de hígado de ratón es inhibida no competitivamente por la isoscutelareina-8-*O*-glucorónido ( $IC_{50}=40mM$ ), mientras que la sialidasa del virus de la influenza es inhibida débilmente.<sup>422</sup> En ambos casos se observó que los núcleos estructurales de flavonona y chalcona carecían de esta actividad. En otros estudios con sialidasa de virus de la influenza, se encontró que los compuestos trihidroxilados como la 5,7,4'-trihidroxi-8-metoxiflavona, son moderadamente activos inhibiendo la infección por éste virus en un modelo que emplea células renales de perro, así como también la replicación del virus en embriones de pollo.<sup>423,424</sup> Por lo que algunos flavonoides podrían ser modificados estructuralmente para generar compuestos con actividad antiviral.

### Óxido nítrico sintasa

El óxido nítrico es un mediador químico que participa en procesos fisiológicos tales como la relajación del músculo liso, lisis de células tumorales, destrucción de microorganismos y otros procesos.<sup>425</sup> Se sintetiza mediante la conversión del aminoácido L-arginina en presencia de oxígeno molecular a L-citrulina, siendo un subproducto de la reacción el óxido nítrico. Esta reacción es catalizada por un sistema enzimático denominado óxido nítrico sintasa, siendo la inducible (iNOS) y endotelial (eNOS) el blanco más importante para los flavonoides.<sup>426-427</sup> A éste respecto, hay una controversia muy interesante; por una parte se ha acumulado evidencia de que la iNOS de células C6 de gliomas puede ser inhibida por la genisteína y por compuestos polifenólicos capaces de atenuar la producción de óxido nítrico en cultivos celulares C6 de astrocitos.<sup>428,429</sup> Adicionalmente, se ha reportado que quercetina, epigalactocatequina galato, morina, apigenina, fisetina y catequina inhiben la actividad de 3 isoformas de la NOS.<sup>430</sup> Sin embargo, la evidencia más reciente al respecto, apunta que extractos y flavonoides (luteolina y cinarosida) son capaces de incrementar la actividad del promotor de la eNOS así como la expresión del ARNm de esta enzima, incrementando así la producción de óxido nítrico en cultivos de células endoteliales humanas.<sup>431</sup> También se ha reportado que la (-)-epicatequina, purificada de extractos de té verde, a una concentración de 100 $\mu$ M, es capaz de generar una relajación dependiente del endotelio, la cual cursa con incrementos sustanciales en la producción de óxido nítrico y GMPc.<sup>432</sup>

Es factible que el amplio abanico de efecto de los flavonoides sobre los sistemas enzimáticos antes mencionados pueda explicarse mediante 2 hechos fundamentales:

1. La presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del núcleo flavonoide, y de una hidroxilación del anillo B, lo que favorece la interacción estereoespecífica de éstas moléculas con los sitios enzimáticos activos
2. La unión de los flavonoides a las proteínas o bien la formación de complejos estables de proteína-flavonoide haciendo inaccesible estos sitios activos.<sup>435,436</sup>

## 6.6. Flavonoides y enfermedad periodontal

En el campo de odontológico, se ha iniciado a explorar los efectos de algunos flavonoides en la regulación de la enfermedad periodontal. Se ha visto que el pretratamiento con luteolina, quercetina, genisteina y quercetagina regularon la fosforilación de las MAPKs p38, ERK ½ y JNK, así como de AKT, inhibieron la translocación de NF-κB, expresión de COX-2 y la síntesis de IL-1β y PGE<sub>2</sub> inducida por LPS de *Porphyromonas gingivalis* en fibroblastos gingivales humanos.<sup>437,438</sup> Otros estudio se mostró que el flavonoide baicalina bloqueó la liberación de MMP-8 inducida IL-8 en PMNs de pacientes periodontalmente sanos, mostrando que baicalina puede jugar un rol importante en la prevención de la enfermedad periodontal.<sup>439</sup> Además, concentrados de arándano ricos en antiocianidas inhibieron la expresión de COX-2 y producción de PGE<sub>2</sub>, IL-6 e IL-8 por fibroblastos gingivales inducidos con LPS, demostrando las interesantes propiedades de las antiocianidas en el control de la enfermedad periodontal.<sup>440</sup> Por otra parte, se evaluó el efecto de epigallocatequina galato-3 en periodontitis apical en ratas, donde se observó que éste flavonoide disminuyó la expresión de Cyr61 por osteoblastos así como la infiltración de macrófagos y disminución clínica de lesiones periapicales inducidas por oncostatina-M, mostrando las propiedades para suprimir la quimiotaxis de macrófagos y progresión de periodontitis apical.<sup>441</sup>

Sin embargo, la amplia variabilidad de flavonoides y sus diversos efectos, deben ser mas explorados en el campo de la investigación odontológica.

## 6.7. Miricetina

Miricetina (3,3',4',5,5',7-hexahidroxiflavona) es un compuesto fenólico del grupo de los flavonoles encontrado ampliamente en arándanos, uvas, moras, cebolla roja, así como en bayas, verduras y otros frutos como las nueces. Se ha demostrado al igual que otros muchos flavonoides, miricetina posee diversas propiedades benéficas para el cuerpo humano, destacando las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Un estudio reveló que miricetina posee protectores sobre el daño oxidativo del ADN, donde se observó que miricetina previno la ruptura de las cadenas de ADN a una concentración de 100µM en linfocitos humanos tratados con peróxido de hidrógeno, sugiriendo que su actividad protectora puede ser debida a su estructura y amplia difusión por las membranas celulares.<sup>442</sup>

Se ha visto que en macrófagos de ratones RAW264.7 estimulados con LPS, el pretratamiento con miricetina significativamente inhibió la producción de IL-12 de manera dependiente de la dosis; donde se observó que a través de la transfección de éstas células con el promotor de IL-12 acoplado a luciferasa y tras la inducción con LPS, aumentaba la actividad de unión de NF-κB a su sitio, lo cual, significativamente disminuyó bajo el tratamiento con la adición de miricetina, indicando que miricetina inhibió la producción de IL-12 en macrófagos activados por LPS a través de la desregulación de la actividad de unión de NF-κB.<sup>443</sup> Además, miricetina ha mostrado regular los efectos de mediadores inflamatorios como IL-1β en fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, donde se observó que el tratamiento con miricetina, disminuyó la producción de IL-6 y MMP-1 en células sinoviales estimuladas con IL-1β, a través de regular la fosforilación de las MAPKs JNK y p38.<sup>444</sup>

Por otra parte, se mostró que miricetina estimula la diferenciación osteoblastica en varios estados, la cual es asociado con el incremento en laproducción de la proteína morfogenética ósea-2 y subsecuente activación de SMAD1/5/8 y la MAPK p38. Lo que sugiere que miricetina puede regular la maduración y regulación osteoblastica y subsecuente incremento en la producción de masa ósea.<sup>445</sup>

Se ha sugerido que la vía de JAK/STAT3 juega un rol importante en carcinogénesis y transformación celular; sin embargo, miricetina ha mostrado poseer un efecto sobre la cantidad de células transformadas, esto a través de la inhibición de la actividad transcripcional de STAT3 y su unión al ADN., además de la inhibición de la fosforilación de STAT3 en tyr705 y Ser727. En adición, miricetina inhibió la fosforilación de JAK1 e incrementó la autofosforilación del receptor de EGF, aunque éste último efecto no fué observado *in vivo*, demostrando que miricetina podría tener efectos regulatorios en la transformación celular y carcinogénesis.<sup>446</sup> Por otra parte, Miricetina significativamente inhibió los niveles séricos de malonil aldehído e incrementó los niveles de superóxido dismutasa en modelos de edema. Al mismo tiempo, miricetina también disminuyó la cantidad de leucocitos, y durante inflamación crónica, inhibió la formación de tejido granulomatoso, demostrando que miricetina posee funciones antiinflamatorias potentes tanto en inflamación aguda como en inflamación crónica.<sup>447</sup>

En otras investigaciones, miricetina igualmente miricetina mostró inhibir la liberación de histamina en células RBL-2H3 inducidas con IgE o ésteres de forbol. Al mismo tiempo, miricetina también mostró inhibir la elevación de calcio intracelular, expresión de genes y secreción de citocinas proinflamatorias, además de inhibir la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y su unión al ADN, sugiriendo que miricetina posee una actividad potencial en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y alérgicas a través de su regulación en la activación de células mastocíticas.<sup>448</sup>

## 7. Tratamiento de la enfermedad periodontal.

El principal objetivo en el tratamiento de la enfermedad periodontal es controlar la infección. La cantidad y tipo de tratamientos puede variar dependiendo de su extensión. Se ha descrito que la fase inicial de la enfermedad, la gingivitis, es reversible mediante una adecuada técnica de cepillado; sin embargo, la periodontitis se considera una enfermedad incurable y donde solo existe un control de la misma. Dado que en la mayoría de los casos la enfermedad periodontal es inducida por placa dentobacteriana, ésta es el principal blanco terapéutico para el control de dicha enfermedad.

Básicamente, los tratamientos enfocados a combatir ésta enfermedad son mecánico-quirúrgicos, los cuales van desde la profilaxis, el detartraje tanto supra como infragingival hasta el raspado y alisado radicular. Sin embargo, en todos los casos, es necesario el empleo de coadyuvantes tanto a nivel quirúrgico como en su control. Dentro de los principales coadyuvantes utilizados se encuentran los enjuagues bucales, microplacas antisépticas, geles antibióticos, microesferas antibióticas, supresor de enzimas y antibióticos orales.<sup>449</sup>

Los enjuagues bucales contiene agentes antisépticos como el triclosán, el cual se ha visto ser un buen bactericida y fungicida; sin embargo, existen reportes que mencionan que algunas cepas presentan resistencia al triclosán, lo que cuestiona sus propiedades antimicrobianas.<sup>450,451</sup> además de que puede funcionar como un disruptor del sistema endócrino en ranas, sospechando tener los mismos efectos en humanos.<sup>452,453</sup>

Los chips antisépticos contienen una sustancia activa también empleada en algunos enjuagues bucales, la clorhexidina. La clorhexidina o gluconato de clorhexidina pertenece al grupo de las biguanidas, sustancias antisépticas de acción bactericida y fungicida ampliamente utilizadas en Odontología en concentraciones de 0.2%, 0.10% y 0.12%. Sin embargo, el uso prolongado de clorhexidina, ocasiona pigmentación de tejidos duros y blandos, disgeusia, achatamiento de papilas interproximales y existen reportes de citotoxicidad en células del ligamento periodontal,<sup>454,455</sup> además de urticaria aguda por clorhexidina.<sup>456</sup>

Por otra parte, el uso de antibióticos para controlar la infección bacteriana y reducción del tamaño de bolsas periodontales, así como para reducir las enzimas que producen la destrucción de tejido periodontal ha sido también empleada, destacando el uso de dicloxacilina, minociclina y tetraciclina tanto vía sistémica como local.<sup>457</sup>

Sin embargo, los coadyuvantes utilizados en la mayoría de las veces no son suficientes, además de mostrar efectos secundarios adversos como la disgeusia y otras antes mencionadas. Cabe mencionar que hasta la fecha, y dada la capacidad de regeneración de los tejidos que componen el periodonto, la mayoría de los tratamientos están encaminados al control de la infección e inflamación, y por ende, la reparación de dichos tejidos, y no a su regeneración propiamente dicha. Sin embargo, los avances en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad periodontal, ha permitido ofrecer nuevos tratamientos con un mínimo de efectos secundarios adversos, incluso aún, se ha postulado la posibilidad de tratamientos regenerativos. A manera global, el objetivo del tratamiento periodontal exitoso radica la prevención y el tratamiento inflamatorio periodontal que promueva la curación.

Por ejemplo, existen estudios que demuestran que inhibidores de la señalización de los TLRs, como las MAPK y algunas otras moléculas o factores de transcripción involucrados en dicha señalización, pueden modular las infecciones periodontales. Antagonistas específicos de IL-1 y TNF- $\alpha$  inhibieron la progresión de pérdida ósea por reducción de la formación de osteoclastos y reclutamiento de células inflamatorias en un modelo experimental de periodontitis en primate.<sup>458</sup> Recientemente, la terapia anti-TNF- $\alpha$  ha sido una terapia bien aceptada en el control de artritis reumatoide con acción rápida, la cual reduce mejor la destrucción articular comparada con otros medicamentos utilizados clásicamente. En periodontitis, antagonistas de TNF- $\alpha$  han mostrado inhibir la respuesta inflamatoria y pérdida de hueso en estudios experimentales.<sup>459</sup>

La evidente importancia de p38 en la enfermedad periodontal se deriva de estudios *In vitro* que demuestran su importante rol en esta vía de señalización para regular la expresión de citocinas inflamatorias relevantes en el proceso de la enfermedad, como IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , NO, PGE2, MMP-13, RANKL en diversos tipos celulares,<sup>460-465</sup> incluyendo células residentes periodontales y fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal.<sup>466-470</sup> En modelos de pérdida ósea alveolar con ratas se ha visto claramente que el tratamiento que la inhibición de p38 tiene un efecto protector sobre la inflamación y pérdida ósea alveolar, lo que indica que el uso de éstos agentes puede ser considerado como nuevos moduladores en el tratamiento y manejo de la enfermedad periodontal.

MK2 es una cinasa río abajo y regulada exclusivamente por p38 $\alpha/\beta$ .<sup>471</sup> Se ha visto en ratones deficientes de MK2, el papel central que juega en la producción de citocinas proinflamatorias así como resistencia al estrés y el shock endotóxico inducido por LPS, reduciendo hasta el 90% de la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.<sup>472</sup> Como la enfermedad periodontal posee remarcablemente vías inflamatorias similares, es razonable anticipar que MK2 puede ser un blanco atractivo en el tratamiento de la periodontitis. Mediante la transfección con siARN de MK2, se mostró *in vitro* atenuación de los perfiles de expresión de citocinas proinflamatorias, a través de JNK y ERK, y no siendo así para p38; además de reducir la expresión de COX-2 y de CXCL-1. *In vivo*, la observación histológica mostró que siARN de MK2 deliberadamente atenuaron el infiltrado inflamatorio asociado con pérdida ósea inducida por LPS de *A actinomycetemcomitans*, lo que está en relación con la disminución en la formación de osteoclastos.<sup>473</sup>

Los agentes anti-citocinas proveen una nueva oportunidad para modular la respuesta del hospedero en enfermedades inflamatorias. En particular, se ha visto reflejado dicho efecto en la expresión de RANKL, mediando la reabsorción ósea directamente. Pocos estudios han investigado el efecto de los antagonistas de interleucinas en periodontitis. En un estudio de investigación de inflamación y pérdida de tejido en primates con periodontitis, usando el receptor I de IL-1 soluble como inhibidor de IL-1, reportó su inhibición así como una reducción significativa en la inflamación, pérdida del aparato de inserción y reabsorción ósea.<sup>474</sup>

Como hemos descrito, las investigaciones se han enfocado en el control de la respuesta inflamatoria; sin embargo, existen tratamientos enfocados en combatir directamente la reabsorción ósea. Los bisfosfonatos actúan a través de su habilidad de inhibir la actividad osteoclastica y han sido usados en una variedad de desordenes

óseos como osteoporosis, artritis y periodontitis.<sup>475,476</sup> Como los bisfosfonatos se unen directamente a los osteoclastos y poseen un mínimo efecto a nivel de la inflamación, son usados en combinación con agentes antiinflamatorios para el manejo de la pérdida ósea asociada con inflamación.<sup>477</sup> Un gran número de estudios han sido llevados a cabo para evaluar el efecto de los bisfosfonatos en el manejo de la pérdida ósea en periodontitis.<sup>478-484</sup> Aunque algunos de esos estudios ha demostrado una mejora en la altura del hueso alveolar, las mejoras en general son bastante modestas y de cuestionable implicación clínica, pues en algunos casos, se ha presentado osteonecrosis en maxilares.<sup>485,486</sup>

La catepsina K es una cisteína proteasa de la superfamilia papaína, la cual es selectivamente expresada en osteoclastos y juega un rol importante en la degradación de la matriz ósea. Es la única proteasa conocida de mamíferos que puede solubilizar tanto colágena I y II por escisión de la región telopeptídica. Catepsina K ha sido identificada en tejidos periodontales y líquido crevicular, donde niveles altos han sido identificados en pacientes con periodontitis,<sup>487,488</sup> por lo que ha sido vista como un posible blanco terapéutico de la resorción ósea. De hecho, estudios en primates han demostrado que la inhibición de catepsina K reduce la reabsorción ósea.<sup>489,490</sup>

Las estatinas han sido ampliamente utilizadas en la prevención de enfermedades cardiovasculares a través del control del metabolismo lipídico; sin embargo, además de su capacidad de reducir los niveles de colesterol, también poseen significativas propiedades antiinflamatorias.<sup>491</sup> Una de las mas comunes estatinas es simvastatina, la cual ha mostrado interesantes resultados en relación al control de la pérdida ósea alveolar, donde varios han demostrado patrones de protección en la pérdida ósea alveolar en periodontitis.<sup>492-495</sup> Mas recientemente, se demostró que el efecto de las estatinas en el periodonto dependía del estado inflamatorio de los tejidos periodontales.<sup>496</sup>

En el consenso del séptimo taller Europeo sobre Periodoncia, fueron propuestas nuevas opciones en el control de la enfermedad periodontal, como el uso de péptidos antimicrobianos, probióticos entre otros. Interesantemente, hubo un interés en el efecto de los hábitos alimenticios sobre el estado de salud periodontal. Se observó que la dieta puede tener un rol dual, tanto en favorecer la enfermedad periodontal, como en su control. Hay evidencias de que una dieta alta en calorías induce inflamación sistémica. El aumento en la obesidad central está asociada con el incremento en la prevalencia de periodontitis.<sup>497</sup> En contraste, se ha observado una relación entre una dieta rica en fibra, micronutrientes, antioxidantes, vitamina D y C, magnesio y ácidos grasos poliinsaturados con la baja prevalencia de periodontitis.<sup>498</sup>

Hemos visto que la fisiopatogenia de la enfermedad periodontal esta controlada principalmente por mecanismos inmunológicos por parte del hospedero en respuesta a los PAMPs de microorganismos presentes en la placa dentobacteriana, desencadenando cascadas de señalización intracelular para la subsecuente síntesis de mediadores inflamatorias que ayudan a la defensa y neutralización del agente nocivo. La regulación a diferentes niveles de señalización celular por parte de los flavonoides debe ser tomada en cuenta para su posible uso en el tratamiento de las enfermedades periodontales.

## Objetivos

---

- Determinar el efecto de miricetina sobre la fosforilación de las MAPK, AKT y degradación de I $\kappa$ B en fibroblastos gingivales humanos tratados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.
- Determinar el efecto de miricetina sobre la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.
- Determinar el efecto de miricetina sobre la síntesis de IL-1 $\beta$  en fibroblastos gingivales humanos tratados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.

## Hipótesis

---

Si los flavonoides poseen propiedades antiinflamatorias, entonces, miricetina tendrá la capacidad de regular la señalización celular involucrada en la síntesis de IL-1 $\beta$  estimulada por el ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguinis* en fibroblastos gingivales humanos.

## Metodología

---

### Biopsia de tejido gingival y cultivo celular

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron a partir de un explante de tejido de encía sano, a partir de un donante sin datos clínicos de enfermedad periodontal ni sistémica.<sup>10</sup>

### Ensayo de viabilidad celular.

La viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos tratados con miricetina fué evaluada mediante actividad mitocondrial por reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT).<sup>519</sup>

### Electroforesis de proteínas y análisis de Western Blot

Los fibroblastos gingivales humanos sembrados en cajas de 6 pozos fueron preincubados durante 30 minutos con miricetina a concentraciones de 1 a 15 $\mu$ M, seguidos del tratamiento 10 $\mu$ L de LTA obtenido de *Streptococcus sanguinis* a una concentración de 10 $\mu$ g/mL durante 15 y 30 minutos.<sup>10</sup>

Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios anti-p-ERK 1/2, p-AKT, I $\kappa$ B, p-p38 y COX-2 y como controles anti-ERK 1/2, AKT, p38 y tubulina- $\gamma$  diluidos en PBS en concentraciones de 1:1000; se realizaron 3 lavados de 10 min con amortiguador de lavado (50mM de NaCl; Tris 100mM; Tween 2%; agua desionizada) y finalmente fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti-cabra, conejo y ratón a la misma concentración.

Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas utilizando el sustrato de quimioluminiscencia (Sta. Cruz Biotechnology), exponiendo la película fotográfica durante 10 min. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el sistema digital Lab-Works.

## RT-PCR

Se aisló el ARN total de los fibroblastos gingivales humanos usando el método de Chomczynski y Sacchi, el cual fue cuantificado para utilizar 1µg en la reacción. El ARN fue transcrito de forma reversa usando el kit One Step RT-PCR (InVitrogen).

La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos 5' TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT3' (sentido codificante) y 3' AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT5' (Sentido anticodificante) derivado de COX-2; 5' GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG3' (Sentido codificante) y 3' TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG5' (sentido anticodificante) y 5' AGATCCACAACGGATACATT-3' (Sentido anticodificante) derivado del gen de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) mediante 35 ciclos con desnaturalización a 94°C por un minuto, alineamiento a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por 1.5 min. Los amplicones fueron corridos en geles de Agarosa al 1% teñidos con 10µg/mL de bromuro de etidio y TBE 1X (89mM Trisma base; 89mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2mM EDTA). La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente mediante el uso de marcador de 10,000 pares de bases HyperLadder I (Bioline).

## Ensayo de ELISA

Los medios de cultivo de células tratadas para RT-PCR fueron recuperados y almacenados en ultracongelación a -80°C. Una vez congelados, fueron liofilizados hasta sequedad y el producto liofilizado fue resuspendido en agua estéril a un volumen de 50µL. La reacción de ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit TiterZyme™ EIA Human IL-1β (Assay Designs).

El cálculo del porcentaje de densidad óptica de unión se obtuvo mediante la sustracción del porcentaje de densidad óptica de cada muestra y estándar menos el porcentaje de densidad óptica del blanco. Los datos fueron analizados mediante la obtención de una pendiente en la grafica de los porcentajes de unión neta de cada estándar contra su concentración respectiva de IL-1β. La concentración de IL-1β desconocida contenida en las muestras se obtuvo por la interpolación de su porcentaje de unión neta en la pendiente.

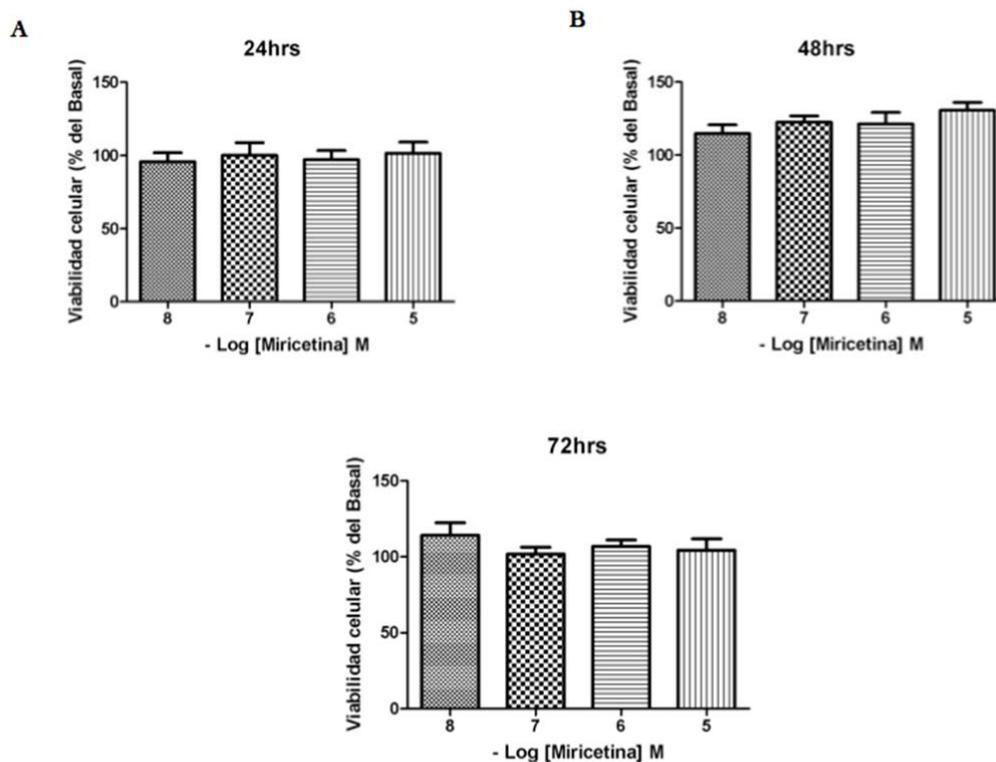
## Análisis de datos y métodos estadísticos

El análisis estadístico de los datos de densitometría 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.

## Resultados

### Efecto de la miricetina sobre la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos.

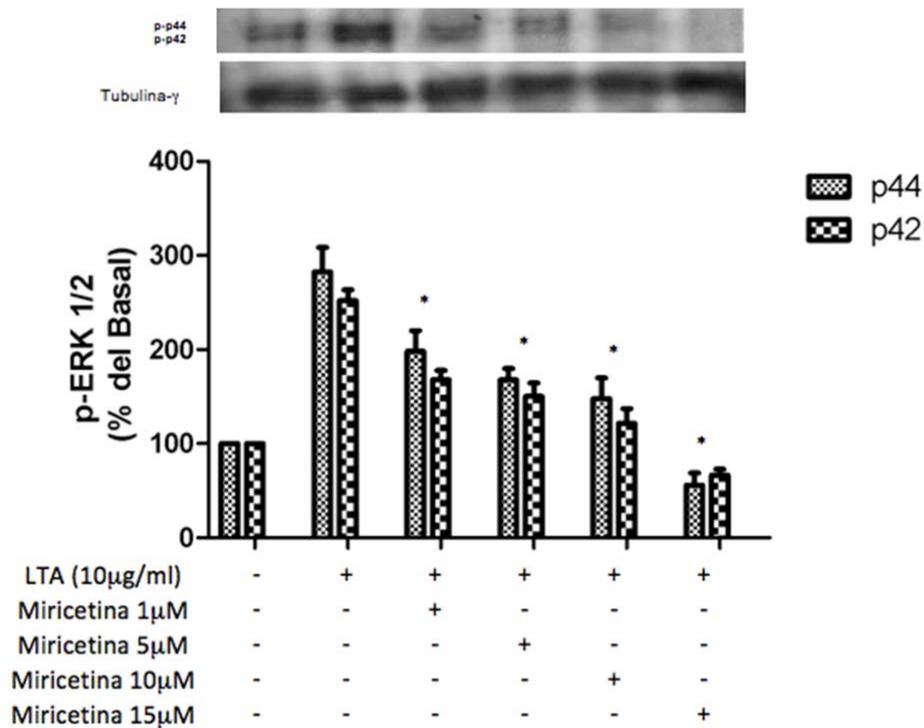
Se ha reportado que los flavonoides presentan propiedades citotóxicas en células A549 y otras líneas celulares de cáncer. Sin embargo, dicho efecto no ha sido observado en células de tejidos sanos. Para descartar un posible efecto citotóxico, mediante el ensayo de MTT decidimos primero evaluar si miricetina alteraba la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos. Nuestros resultados demostraron que fibroblastos gingivales humanos incubados con miricetina a diferentes dosis (10 $\mu$ M, 100nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M) y tiempos (24, 48 y 72 hrs) no mostraron diferencias estadísticamente significativas que indiquen disminución su viabilidad celular, por lo que se podemos concluir que miricetina no posee efectos tóxicos ni altera la viabilidad de dichas células. **Fig. 1**



**Figura 1. Efecto de miricetina sobre la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos.** Las células se sembraron en cajas de 96 pozos y se crecieron con DMEM al 10% de SBF y 1% de AbAm hasta alcanzar la confluencia del 80%. Posteriormente las células se incubaron con miricetina a 24hrs (A), 48hrs (B) y 72hrs a un stock desde 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M. La viabilidad se evaluó mediante el ensayo de MTT con un lector de placas a 550nm. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con una  $p < 0.05$ .

Efecto de miricetina sobre la actividad de pERK 1/2 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.

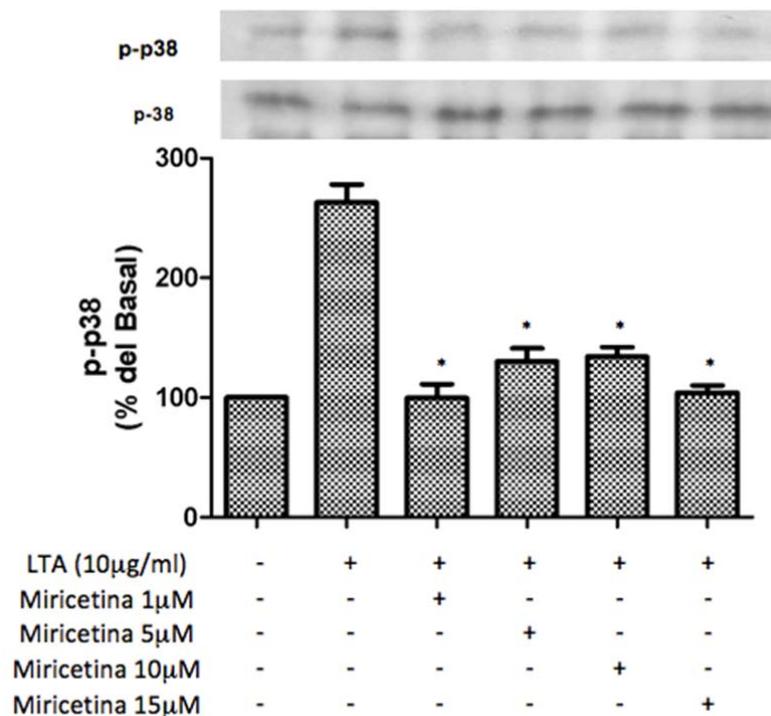
Investigaciones previas demostraron que el ácido lipoteicoico induce la fosforilación de las MAPKs ERK y p38, AKT, además de promover la degradación de IκB, favoreciendo la translocación de NF-κB al núcleo y subsecuente expresión de COX-2. Miricetina es un flavonol que ha demostrado poseer diferentes propiedades en diferentes líneas celulares, destacando su capacidad como regulador de la inflamación. Por tal motivo, se decidió evaluar el efecto de miricetina utilizando dosis de 1, 5, 10 y 15μM en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*. Nuestros resultados demostraron que la exposición con LTA, aumentó la fosforilación de ERK½ 3 veces por arriba del basal; sin embargo, miricetina reguló dicho efecto de manera dosis dependiente con tendencia hacia los niveles basales, por lo podemos concluir que miricetina regula el aumento en la fosforilación de ERK½ promovido por el ácido lipoteicoico obtenido de *S sanguinis*. **Fig. 2**



**Figura 2. Efecto de miricetina sobre la actividad de pERK ½ en fibroblastos gingivales humanos (HGFs) tratados con ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguinis*.** Los HGFs se crecieron en cajas de 6 pozos suplementados con DMEM 10% SBF 1%AbAm hasta alcanzar la confluencia. Las células se ayunaron durante 24hrs. con DMEM 2% SBF mas 1% de Ab/Am; posteriormente, se incubaron con miricetina pro 30 min. a diferentes dosis, precedido de la incubación de LTA por 15min. Se observó que la incubación con LTA incrementó 3 veces la fosforilación de ERK con respecto al basal, y dicha inducción fué regulada de manera dosis dependiente ante el tratamiento con miricetina desde 1μM hasta 15μM. Los resultados se analizaron mediante t-student con una p < 0.05.

## Efecto de miricetina sobre la actividad de p-p38 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.

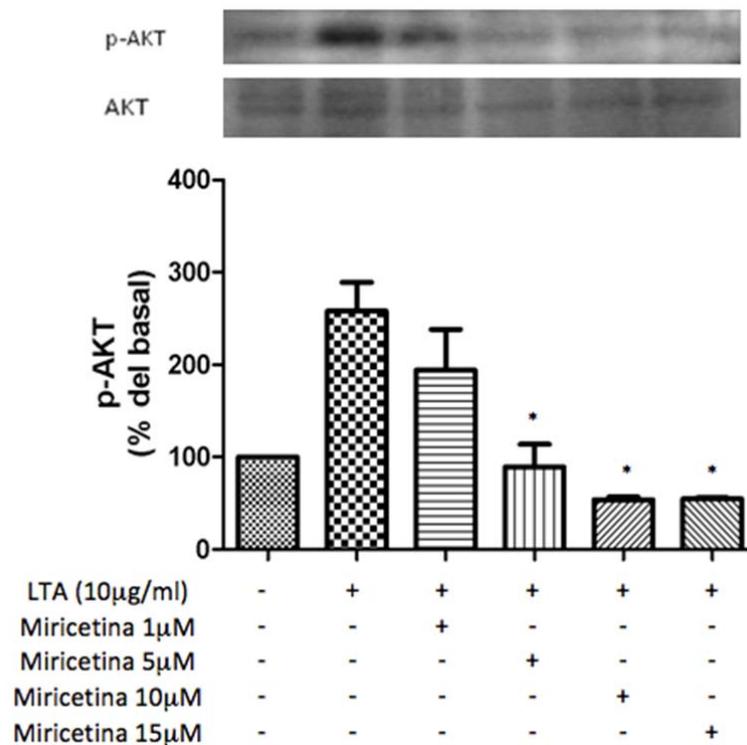
Como ya se mencionó, resultados previos en nuestro laboratorio demostraron que el ácido lipoteicoico estimuló la fosforilación MAPK p38, mostrando un máximo a los 30 minutos. Por tal motivo, también se evaluó la capacidad de miricetina para regular dichos efectos. Nuestros experimentos demuestran que el pretratamiento con diferentes dosis de miricetina regulan los efectos del ácido lipoteicoico con una diferencia estadísticamente significativa desde dosis de 1 hasta 15 $\mu$ M, en las cuales, se observó incluso que su regulación fue muy similar a los niveles basales. Con estos resultados podemos concluir que miricetina reguló los efectos del ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales humanos. **Fig. 3**



**Figura 3.** Efecto de miricetina sobre la actividad de p-p38 en fibroblastos gingivales humanos (HGFs) tratados con ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguinis*. Los HGFs se crecieron en cajas de 6 pozos suplementados con DMEM 10% SBF 1%AbAm hasta alcanzar la confluencia. Las células se ayunaron durante 24hrs con DMEM 2% SBF mas 1%Ab/Am; posteriormente, se incubaron con miricetina a diferentes dosis precedido de la incubación de LTA por 15min. Se observó que la incubación con LTA incrementó mas de 2 veces la fosforilación de p38 con respecto al basal, y dicha inducción fue regulada de manera dosis dependiente ante el pretratamiento con miricetina desde 1 $\mu$ M hasta 15 $\mu$ M. Los resultados se analizaron mediante *t*-student con una  $p < 0.05$ .

Efecto de miricetina sobre la actividad de p-AKT en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.

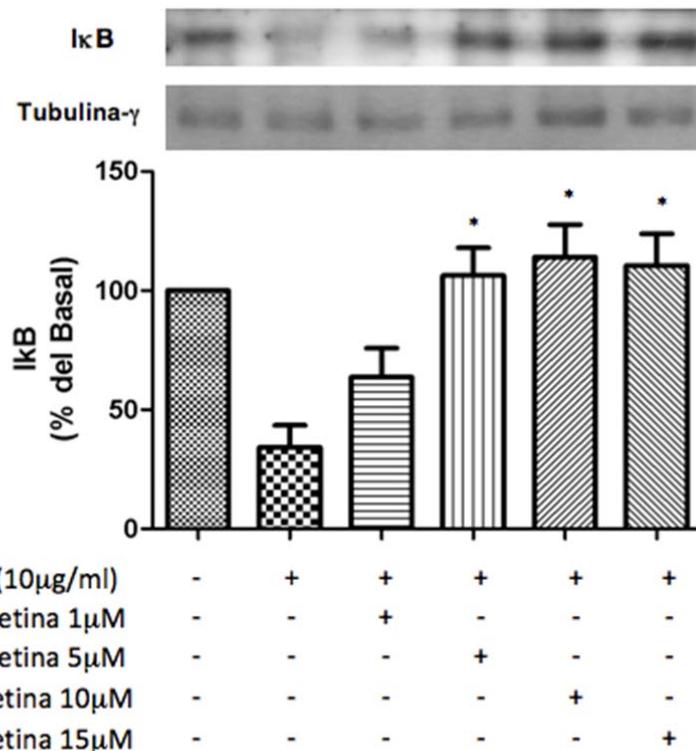
La proteína cinasa B o AKT esta involucrada dentro de la cascada de señalización de PI3K, la cual regula múltiples funciones como la supervivencia celular. Previamente, se observó que el ácido lipoteicoico promueve su fosforilación en fibroblastos gingivales humanos, mostrando un máximo a los 30 minutos. Nosotros evaluamos el efecto de miricetina a diferentes dosis (1-15µM) sobre la actividad de AKT en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico. Se observó que miricetina a dosis desde 5µM, retornó el estado basal de p-AKT alterado ante el estímulo con ácido lipoteicoico, demostrando así, que miricetina regula los efectos del ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis* sobre la vía de PI3K, específicamente por la regulación de AKT. **Fig. 4.**



**Figura 4. Efecto de miricetina sobre la actividad de p-AKT en fibroblastos gingivales humanos (HGFs) tratados con ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguinis*.** Los HGFs se crecieron en cajas de 6 pozos suplementados con DMEM 10% SBF 1%AbAm hasta alcanzar la confluencia. Las células se ayunaron durante 24hrs con DMEM 2% SBF mas 1%Ab/Am; posteriormente, se incubaron con miricetina a diferentes dosis, precedido de la incubación de LTA por 15min. Se observó que la incubación con LTA incrementó mas de 2 veces la fosforilación de AKT con respecto al basal, y dicha inducción fue regulada de manera dosis dependiente ante el pretratamiento con miricetina desde 5µM hasta 15µM. Los resultados se analizaron mediante *t*-student con una  $p < 0.05$ .

## Efecto de miricetina sobre la degradación de IκB en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.

IκB es una familia de proteínas relacionadas con la inhibición del factor de transcripción NF-κB, el cual, regula múltiples funciones al llevar a cabo la transcripción de genes, como los involucrados en la síntesis mediadores proinflamatorios, todo lo anterior, cuando IκB es degradado gracias a su fosforilación. Anteriores investigaciones en nuestro laboratorio han demostrado que el ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis* promueve la fosforilación y subsecuente degradación de IκB, permitiendo así la translocación de NF-κB al núcleo. Sin embargo, nuestros experimentos demuestran que miricetina inhibió la degradación de IκB ante el estímulo con ácido lipoteicoico, lo que sugiere que miricetina regula la translocación de NF-κB al núcleo y la subsecuente transcripción de genes. **Fig. 5**

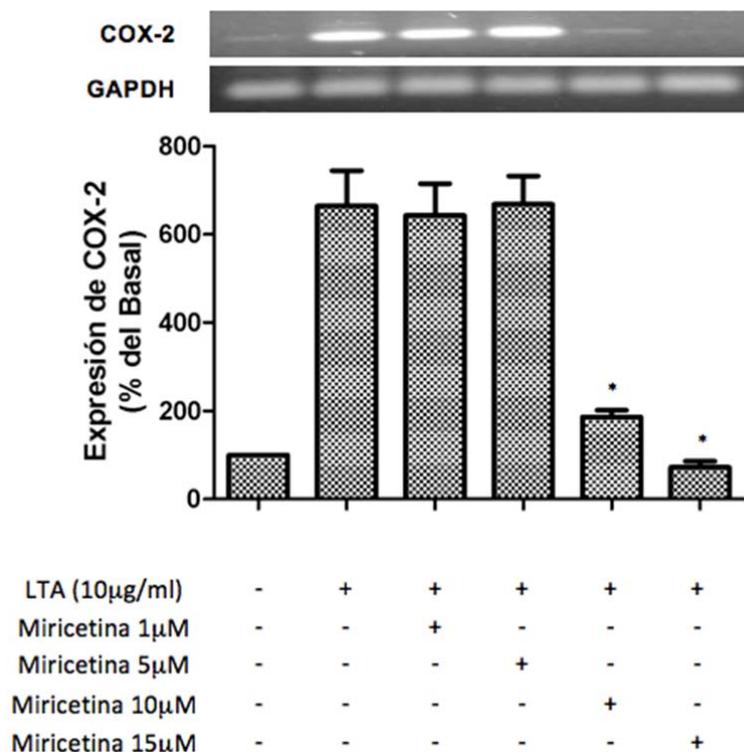


**Figura 5.**

**Efecto de miricetina sobre la degradación de IκB en fibroblastos gingivales humanos (HGFs) tratados con ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguinis*.** Los HGFs se crecieron en cajas de 6 pozos suplementados con DMEM 10% SBF 1%AbAm hasta alcanzar la confluencia. Las células se ayunaron durante 24hrs con DMEM 2% SBF mas 1% Ab/Am; posteriormente, se incubaron con miricetina a diferentes dosis precedido de la incubación de LTA por 15min. Se observó que la incubación con LTA estimuló la degradación de IκB con respecto al basal, y dicha degradación fue regulada de manera dosis dependiente ante el pretratamiento con miricetina en dosis desde 5μM hasta 15μM. Los resultados se analizaron mediante *t*-student con una  $p < 0.05$ .

Efecto de miricetina sobre la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.

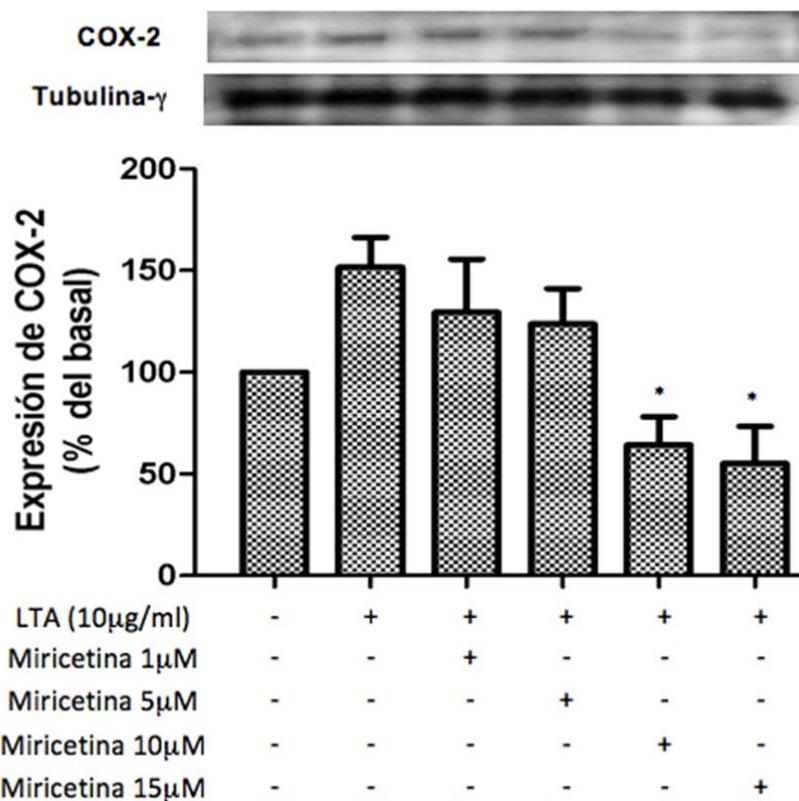
El proceso inflamatorio induce la síntesis de mediadores que lo promuevan y lo regulen. La expresión y síntesis de COX-2 es un punto clave para metabolizar la síntesis de mediadores inflamatorias como prostaglandinas y tromboxanos. Previamente nuestro laboratorio observó que el ácido lipoteicoico induce la expresión del gen de COX-2 a partir de las 4 horas de estimulación; por tal motivo, decidimos evaluar el efecto de miricetina sobre dicha expresión. Nuestros resultados muestran que miricetina tiene la capacidad de regular la expresión del gen de COX-2 en fibroblastos gingivales estimulados con ácido lipoteicoico, con niveles estadísticamente significativos similares al basal. Esto sugiere que miricetina regula también la expresión de genes involucrados con la respuesta inflamatoria. **Fig. 6**



**Figura 6.** Efecto de miricetina sobre la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos (HGFs) tratados con ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguinis*. Los HGFs se crecieron en cajas de 6 pozos suplementados con DMEM 10% SBF 1% AbAm hasta alcanzar la confluencia. Las células se ayunaron durante 24hrs con DMEM 2% SBF mas 1% Ab/Am, posteriormente, se incubaron con miricetina a diferentes dosis precedido de la incubación de LTA durante 4 horas. Se observó que la incubación con LTA estimuló la expresión de COX-2 6 veces con respecto al basal; sin embargo, dicha expresión fué regulada de manera dosis dependiente cuando ante el pretratamiento con miricetina a dosis de 10 μM y 15 μM. Los resultados se analizaron mediante *t*-student con una *p* < 0.05.

Efecto de miricetina sobre la expresión proteica de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.

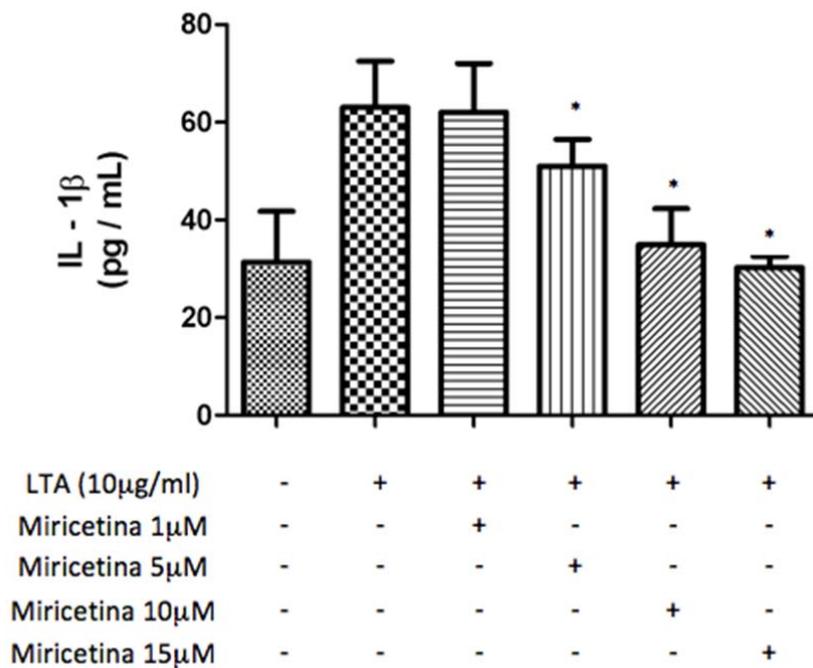
Una vez que nosotros observamos que miricetina regula la expresión del gen de COX-2 ante el estímulo del ácido lipoteicoico, nosotros decidimos evaluar ahora que tanto de esa expresión era traducida en proteína, y si miricetina regulaba también la traducción del gen de COX-2. Nuestros resultados demuestran que miricetina regula también la expresión proteica de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*. Lo anterior sugiere que miricetina regula a COX-2 no solo a nivel transcripcional, si no también a nivel traduccional, y muy probablemente disminuye la producción de prostaglandinas y tromboxanos sintetizados a partir del estímulo del ácido lipoteicoico. **Fig. 7**



**Figura 7. Efecto de miricetina sobre la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos (HGFs) tratados con ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguinis*.** Los HGFs se crecieron en cajas de 6 pozos suplementados con DMEM 10% SBF 1%AbAm hasta alcanzar la confluencia. Las células se ayunaron durante 24hrs con DMEM 2% SBF mas 1%Ab/Am; posteriormente, se incubaron con miricetina a diferentes dosis precedido de la incubación de LTA durante 4 horas. Se observó que la incubación con LTA estimuló la expresión proteica de COX-2 con respecto al basal; sin embargo, dicha expresión fue regulada de manera dosis dependiente ante el pretratamiento con miricetina en dosis de 10 μM y 15 μM. Los resultados se analizaron mediante *t*-student con una *p* < 0.05.

## Efecto de miricetina sobre la síntesis de IL-1 $\beta$ en fibroblastos gingivales humanos estimulados con ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis*.

Las citocinas proinflamatorias son aquellas proteínas encargadas de amplificar el proceso inflamatorio ante diferentes estímulos, como productos microbianos. Las principales citocinas proinflamatorias son la IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , las cuales son sintetizadas por diversos estirpes celulares. Dado que la enfermedad periodontal esta caracterizada por una respuesta inflamatoria, nosotros nos dimos a la tarea de investigar el efecto del ácido lipoteicoico sobre la síntesis de IL-1 $\beta$  en fibroblastos gingivales humanos, así como el efecto de miricetina de regular los efectos de dicha toxina bacteriana. Nuestros resultados demuestran que el ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguinis* promovió la síntesis de IL-1 $\beta$  aproximadamente 3 veces mas que los niveles basales; sin embargo, miricetina reguló dichos efectos con tendencia estadísticamente significativa a los niveles basales. Todo lo anterior sugiere que miricetina tiene la capacidad de regular también la síntesis de citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ . **Fig. 8**



**FIGURA 8. Efecto de miricetina sobre la síntesis de IL-1 $\beta$  en fibroblastos gingivales humanos (HGFs) tratados con ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguinis*.** Los medios de cultivo fueron recuperados después del tratamiento con LTA y miricetina a diferentes dosis, una vez congelados a -80°C, fueron liofilizados a sequedad y el producto final se resuspendió un volumen de 50 $\mu$ L para realizar el ensayo de ELISA en placas con anti-IL-1 $\beta$  en su fondo. Se observó que la incubación con LTA estimuló la síntesis de IL-1 $\beta$  3 veces mas con respecto al basal, y dicha síntesis fue regulada de manera dosis dependiente ante el pretratamiento con miricetina entre dosis de 5 $\mu$ M a 15 $\mu$ M. Los resultados se analizaron mediante *t*-student con una *p* <0.05.

## Discusión

---

La respuesta inflamatoria en los tejidos periodontales es uno de los principales mecanismos que conllevan a la pérdida ósea del hueso alveolar y subsecuente pérdida de órganos dentarios. Resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que toxinas bacterianas como el LTA, componente importante de bacterias Gram+, funciona como un activador inmune con características muy similares al LPS. La placa dental posee varios microorganismos capaces de activar tanto al TLR2 como al TLR4. Se ha visto que en individuos con presencia de mayor índice de placa dentobacteriana presentan mayor activación del TLR4 respecto a los que presentaban placa en menor cantidad; sin embargo, en ambos casos hubo activación del TLR2, lo que sugiere que especies comensales Gram+ pueden interactuar con el TLR2 para iniciar la respuesta inflamatoria destructiva.<sup>332-334</sup> Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que el LTA obtenido de una bacteria Gram+ residente comensal de la placa dentobacteriana, *Streptococcus sanguinis*, tiene la capacidad de inducir la fosforilación de las MAPK ERK 1/2 y p38 y subsecuente expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos, demostrando así, el rol importante del LTA como inductor de la respuesta inflamatoria periodontal. Dado que en la mayoría de los casos la enfermedad periodontal es inducida por las toxinas presentes en la placa dentobacteriana, es propuesto que la regulación de dichos efectos son acciones fundamentales para la prevención y control de la enfermedad.

Los flavonoides son un grupo de sustancias polifenólicas producto del metabolismo secundario de las plantas que han demostrado múltiples beneficios en la salud, destacando su capacidad antiinflamatoria. Miricetina es un flavonol presente en frutas como arándanos y moras, y se ha demostrado que posee múltiples propiedades antioxidantes y de regulación del proceso inflamatorio.<sup>442-448</sup> En el presente estudio, nosotros evaluamos el efecto de miricetina sobre los efectos del LTA obtenido de *Streptococcus sanguinis* en fibroblastos gingivales humanos. Se observó que miricetina no presenta propiedades citotóxicas en fibroblastos gingivales humanos, los cuales fueron incubados en dosis de 10nM, 100nM, 1µM, 10µM a 24, 48 y 72 hrs, por lo que para posteriores experimentos se decidió utilizar las 2 dosis mas altas, una intermedia entre éstas y una mayor.

La activación de las MAPK a través de la señalización de los TLR es un proceso importante que regula procesos de proliferación, supervivencia, regulación de la respuesta inmune e inflamación, ya que ha sido demostrado que su inhibición a través del precursor MEK1, regula procesos inflamatorios y carcinogénicos.<sup>499-509</sup> Nuestros resultados demuestran que la fosforilación de las MAPK ERK 1/2 y p38 se vio incrementada aproximadamente 3 veces por arriba del basal ante es estímulo con LTA en fibroblastos gingivales humanos; sin embargo, miricetina reguló dichos efectos de manera dosis dependiente a partir de una dosis de 1µM hasta 15µM. Efectos similares han sido observados en otros experimentos, donde miricetina reguló la fosforilación de las MAPK en fibroblastos sinoviales inducidos con IL-1β.<sup>444</sup> Además, ha sido también reportado que la transfección con siARN para MK2, una cinasa regulada por p38α/β, reduce los perfiles de expresión de citocinas proinflamatorias a través de ERK, demostrando que la posible regulación de p38 influye en la reducción de citocinas proinflamatorias vía MK2 y ERK.<sup>472,473</sup>

Varios receptores de superficie inducen la producción de segundos mensajeros que transmiten señales hacia el citoplasma. Una de éstas vías importantes es la de PI3K/AKT, la cual, regula varios factores de transcripción como NF-κB, controlando así funciones como la supervivencia celular, metabolismo de glucosa y cáncer.<sup>510-512</sup> Reportes demuestran que naringina, un flavonoide perteneciente a la familia de las flavononas atenúa la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas a través de la supresión de la translocación al núcleo de NF-κB y fosforilación de AKT en células de microglía BV2, previendo neuroprotección.<sup>513</sup> Experimentos realizados en éste trabajo demuestran que el tratamiento con LTA estimuló el incremento de la fosforilación de AKT respecto a los niveles basales; dicho efecto fue regulado

satisfactoriamente con miricetina a partir de dosis de 5µM hasta 15µM, demostrando efectos similares al estudio en células de microglía.

Para promover la síntesis de mediadores inflamatorios, es necesaria la activación de moléculas que induzcan una subsecuente expresión de genes que orquesten el proceso inflamatorio, dichas moléculas se denominan factores de transcripción. NF-κB es un factor de transcripción que regula un gran número de genes relacionados con apoptosis, tumorigénesis e inflamación. En su forma inactiva, NF-κB es secuestrado en el citoplasma por la familia de proteínas inhibitoras IκB, incluyendo IκBα, IκBβ, IκBγ, y IκBε. Cuando IκB es fosforilada, se promueve su posterior ubiquitinización y degradación, permitiendo la liberación y subsecuente localización de NF-κB en secuencias consenso 5'GGGACTTCC-3' de varios genes para promover su expresión. Múltiples mediadores inflamatorios son regulados a partir de la transcripción por NF-κB, por lo que ha sido demostrado que la inhibición de éste factor de transcripción regula la síntesis de mediadores inflamatorios. Varios flavonoides han demostrado inhibir la transcripción de genes por la regulación de en la señalización de NF-κB. Se ha observado que genisteína regula la síntesis de IL-1β a través de NF-κB en células de ligamento periodontal.<sup>514</sup> Similar a lo anterior, epigalactocatequina galato provee protección contra enfermedades vasculares como aterosclerosis vía NF-κB, gracias a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria, demostrando el rol de ambos flavonoides sobre la actividad de NF-κB e inflamación. Nosotros decidimos evaluar la degradación de IκB como indicador de la translocación de NF-κB, mostrando que el LTA de *S sanguinis* promueve la degradación de IκB en aproximadamente un 65% respecto a niveles basales; sorpresivamente, miricetina reguló dicha degradación con tendencia a niveles basales estadísticamente significativos a partir de dosis de 5µM hasta 15µM, lo que sugiere que muy probablemente también, miricetina regula la translocación de NF-κB al núcleo y subsecuente expresión de genes. La explicación de que flavonoides como miricetina haya regulado la fosforilación de las anteriores proteínas cinasas ha sido descrita; ya que se ha demostrado que los flavonoides inhiben el sitio de unión de ATP de diversas proteínas cinasas, donde el grupo hidroxilo en posición 3 del flavonoide juega un papel importante.<sup>390-397</sup>

El metabolismo del ácido araquidónico es un proceso fundamental para la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, donde enzimas como COX-2 son indispensables para dicha síntesis. Investigaciones sobre los mecanismos moleculares de la enfermedad periodontal han demostrado que la placa dentobacteriana subgingival induce la expresión de COX-2 y síntesis de PGE<sub>2</sub> en fibroblastos gingivales humanos, regulando así la destrucción del hueso alveolar.<sup>143</sup> Aunado a esto, el tratamiento con inhibidores selectivos de COX-2 reguló la profundidad de bolsa y sangrado al sondeo, ambos, signos clínicos de enfermedad periodontal, por lo que la regulación de ésta enzima puede ser un importante coadyuvante en la terapia periodontal.<sup>146</sup> Por tal motivo, nosotros evaluamos el efecto de miricetina sobre la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con LTA de *S sanguinis*. Nuestros resultados demuestran que miricetina reguló los efectos del LTA sobre COX-2 tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional, en ambos casos, con diferencias estadísticamente significativas en dosis de 10 y 15µM, sugiriendo un posible rol de miricetina en regular el metabolismo de mediadores inflamatorios como prostaglandinas y tromboxanos vía COX-2. De hecho, ha sido descrito que para la regulación de enzimas como COX-2, PLA<sub>2</sub> y lipoxigenasa mediante flavonoides, es necesario que estos posean propiedades quelantes y reductoras del hierro, características presentes en flavonoides polihidroxilados,<sup>417,418</sup> lo que explica los resultados obtenidos ya que miricetina presenta radicales hidroxilo en posiciones 3, 4, 5 'del anillo fenilo' B, posición 3 'del anillo pirano heterocíclico C y 5, 7 'del anillo fenilo A .

Finalmente, la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-1β, IL-6 y TNF-α orquestan eficazmente el proceso inflamatorio, donde IL-1β juega un papel importante en la reabsorción ósea exacerbada en la enfermedad periodontal, ya que ha sido ampliamente reportado su implicación en la pérdida ósea, mediante la activación y prolongación de la supervivencia de

osteoclastos mediante el sistema RANK/RANKL/OPG.<sup>515-518</sup> Por tal motivo, se decidió evaluar el efecto de miricetina sobre la síntesis de IL-1 $\beta$  en fibroblastos gingivales humanos estimulados con LTA de *S sanguinis*, donde se observó que tras la exposición con LTA, hubo un aumento en la síntesis de IL-1 $\beta$  aproximadamente 3 veces por arriba del basal; en contraste, miricetina reguló dicha síntesis de manera dosis dependiente a partir de dosis de 5 $\mu$ M a 15 $\mu$ M con tendencias estadísticamente significativas hacia los niveles basales. En otros estudios ha sido demostrado que antagonistas específicos para IL-1 y TNF- $\alpha$  inhiben la progresión de pérdida ósea por reducción en la formación de osteoclastos y reclutamiento de células inflamatorias.<sup>458</sup> Similarmente, un estudio concluyó que el uso del receptor soluble I de IL-1, funcionó como inhibidor de IL-1 y subsecuente reducción significativa en la inflamación, pérdida del aparato de inserción y reabsorción ósea,<sup>474</sup> por lo que probablemente nuestros resultados muestren un rol regulador importante en la pérdida de hueso aumentada durante el proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal, dado que miricetina mostró regular la síntesis de IL-1 $\beta$  tras el estímulo con LTA en fibroblastos gingivales humanos.

Con todos estos resultados hemos demostrado el papel importante de miricetina sobre los mecanismos inflamatorios del LTA durante la progresión de la enfermedad periodontal.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Okuda, K., Kato, T. & Ishihara, K. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Dis.* 2004; 10, 5–12.
2. Rickard, A. H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003;11, 94–100
3. Rumpf, R. W., Griffen, A. L. & Leys, E. J. Phylogeny of *Porphyromonas gingivalis* by ribosomal intergenic spacer region analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38, 1807–1810 .
4. Leys, E. J. et al. Association of *Bacteroides forsythus* and a novel *Bacteroides* phylotype with periodontitis. *J. Clin. Microbiol.* 202;40, 821–825.
5. Kazor, C. E. et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41, 558–563.
6. Brinig, M. M. et al. Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69, 1687–1694.
7. Ouverney, C. C., Armitage, G. C. & Relman, D. A. Single-cell enumeration of an uncultivated TM7 subgroup in the human subgingival crevice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69, 6294–6298.
8. Edwards, A. M. et al. Genetic relatedness and phenotypic characteristics of *Treponema* associated with human periodontal tissues and ruminant foot disease. *Microbiology* 2003;149, 1083–1093.
9. Kumar, P. S. et al. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J. Dent. Res.* 2003;82, 338–344.
10. Gutiérrez Venegas G, Cardoso-Jiménez P. Lipoteichoic acid promotes nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin via AKT in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 2011;11,1278-84.
11. Graves, D. T. & Cochran, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J. Periodontol.* 2003;74, 391–401.
12. Bosshardt, D. D. & Lang, N. P. The junctional epithelium: from health to disease. *J. Dent. Res.* 2005;84, 9–20.
13. Moughal, N. A., Adonogianaki, E., Thornhill, M. H. & Kinane, D. F. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *J. Periodont. Res.* 1992;27, 623–630.
14. Nylander, K., Danielsen, B., Fejerskov, O. & Dabelsteen, E. Expression of the endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) on endothelial cells in experimental gingivitis in humans. *J. Periodontol.* 1993;64, 355–357.
15. Gemmell, E., Walsh, L.J., Savage, N. W. & Seymore, G. J. Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J. Periodont. Res.* 1994;29, 46–53.
16. Tonetti, M. S. Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration. *J. Periodont. Res.* 1997;32, 104–109.
17. Tonetti, M. S. et al. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect. Immun.* 1994;62, 4005–4014.
18. Tonetti, M. S., Imboden, M. A. & Lang, N. P. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J. Periodontol.* 1998;69, 1139–1147.
19. Schiott, C. R. & Loe, H. The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. *J. Periodont. Res.* 1970;5, 36–41.
20. Attström, R. & Schroeder, H. E. Effect of experimental neutropenia on initial gingivitis in dogs. *Scand. J. Dent. Res.* 1979;87, 7–23.

21. Sallay, K., Listgarten, M., Sanavi, F., Ring, I. & Nowotny, A. Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. *Infect. Immun.* 1984;43, 1091–1093.
22. Hemmerle, J. & Frank, R. M. Bacterial invasion of periodontal tissues after experimental immunosuppression in rats. *J. Biol. Buccale* 1991;19, 271–282.
23. Yoshinari, N., Kameyama, Y., Aoyama, Y., Nishiyama, H. & Noguchi, T. Effect of long-term methotrexate-induced neutropenia on experimental periodontal lesion in rats. *J. Periodont. Res.* 1994;29, 393–400.
24. Lu, Q., Jin, L., Darveau, R. P. & Samaranayake, L. P. Expression of human  $\beta$ -defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *J. Periodont. Res.* 2004;39, 221–227.
25. Lu, Q., Samaranayake, L. P., Darveau, R. P. & Jin, L. Expression of human  $\beta$ -defensin-3 in gingival epithelia. *J. Periodont. Res.* 2005;40, 474–481.
26. Jin, L. & Darveau, R. P. Soluble CD14 levels in gingival crevicular fluid of subjects with untreated adult periodontitis. *J. Periodontol.* 2001;72, 634–640.
27. Jin, L., Ren, L., Leung, W. K. & Darveau, R. P. The in vivo expression of membrane-bound CD14 in periodontal health and disease. *J. Periodontol.* 2004;75, 578–585.
28. Ren, L., Jin, L. & Leung, W. K. Local expression of lipopolysaccharide-binding protein in human gingival tissues. *J. Periodont. Res.* 2004;39, 242–248.
29. Mahanonda, R. & Pichyangkul, S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol.* 2000. 2007;43, 41–55.
30. Ren, L., Leung, W. K., Darveau, R. P. & Jin, L. The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and Toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 2005;76, 1950–1959.
31. Sugawara, Y. et al. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J. Dent. Res.* 2006;85, 524–529.
32. Dixon, D. R., Bainbridge, B. W. & Darveau, R. P. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol.* 2000. 2004;35, 53–74.
33. Tonetti, M. S. et al. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect. Immun.* 1994;62, 4005–4014.
34. Lu, Q., Samaranayake, L. P., Darveau, R. P. & Jin, L. Expression of human  $\beta$ -defensin-3 in gingival epithelia. *J. Periodont. Res.* 2005;40, 474–481.
35. Darveau, R. P., Belton, C. M., Reife, R. A. & Lamont, R. J. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 1998;66, 1660–1665.
36. Hasegawa, Y. et al. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. *Infect. Immun.* 2007;75, 2540–2547.
37. Huang, G. T., Zhang, H. B., Dang, H. N. & Haake, S. K. Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Pathog.* 2004;37, 303–312.
38. Chung, W. O., Dommisch, H., Yin, L. & Dale, B. A. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13, 3073–3083.
39. Krisanaprakornkit, S. et al. Inducible expression of human  $\beta$ -defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect. Immun.* 2000;68, 2907–2915.
40. Crawford, J. M., Taubman, M. A. & Smith, D. J. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J. Periodont. Res.* 1978;13, 316–325.
41. Dixon, D. R., Reife, R. A., Cebra, J. J. & Darveau, R. P. Commensal bacteria influence innate status within gingival tissues: a pilot study. *J. Periodontol.* 2004;75, 1486–1492.

42. Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V. & Gordon, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002;99, 15451–15455.
43. Xu, J. & Gordon, J. I. Inaugural Article: Honor thy symbionts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003;100, 10452–10459.
44. Umesaki, Y. & Setoyama, H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect.* 2000;2, 1343–1351.
45. Gordon, H. A. & Pesti, L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol. Rev.* 1971;35, 390–429.
46. Duncan, H. E. & Edberg, S. C. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Microbiol.* 1995;21, 85–100.
47. Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T. & Gordon, J. I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62,1157–1170.
48. Macpherson, A. J. & Harris, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Rev. Immunol.* 2004;4, 478–485.
49. Cebra, J. J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999;69, S1046–S1051.
50. Chadwick, V. S. & Anderson, R. P. in *Inflammatory Bowel Disease*. Elsevier Science. 1992;241–258.
51. Hooper, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001;291, 881–884.
52. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004;118, 229–241.
53. Bartold, P. M., Walsh, L. J. & Narayanan, A. S. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol.* 2000 2000;24, 28–55.
54. Mussig, E., Tomakidi, P. & Steinberg, T. Molecules contributing to the maintenance of periodontal tissues. Their possible association with orthodontic tooth movement. *J. Orofac. Orthop.* 2005;66, 422–433.
55. Champagne, C. M. et al. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol.* 2000. 2003;31, 167–180.
56. Giannobile, W. V. Crevicular fluid biomarkers of oral bone loss. *Curr. Opin. Periodontol.* 1997;4, 11–20.
57. Kamma, J., Mombelli, A., Tsinidou, K., Vasdekis, V. & Giannopoulou, C. Cytokines in gingival crevicular fluid of adolescents and young adults. *Oral Microbiol. Immunol.* 2009;24, 7–10.
58. Gorska, R. et al. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2003;30, 1046–1052.
59. Alberts, Bruce, Et. al. *Molecular Biology of the Cell.* 5th edition. Garland Science. 2008
60. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post- menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 2006;85:596- 607.
61. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160:403-409.
62. Bertl K, Haririan H, Laky M, Matejka M, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Smoking influences salivary histamine levels in periodontal disease. *Oral Dis.* 2012;18:410-6.
63. Minami T, Kuroishi T, Ozawa A, Shimauchi H, Endo Y, Sugawara S. Histamine amplifies immune response of gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2007;86:1083-8

64. Gutiérrez-Venegas G, Rodríguez-Pérez CE. Toll-like receptor 3 activation promotes desensitization of histamine response in human gingival fibroblasts: Poly (I:C) induces histamine receptor desensitization in human gingival fibroblasts. *Cell Immunol.* 2012;273(2):150-7.
65. Attstrom R, Laurel AB, Lahsson U, Sjöholm A. Complement factors in gingival crevice material from healthy and inflamed gingiva in humans. *J Periodont Res.* 1975;10:19-27.
66. Schenkein HA, Genco RJ. Gingival fluid and serum in periodontal diseases. II. Evidence for cleavage of complement components C3, C3 proactivator (factor B) and C4 in gingival fluid. *J Periodontol* 1977;48:778-84.
67. Schenkein HA, Genco RJ. Gingival fluid and serum in periodontal diseases. I. Quantitative study of immunoglobulins, complement components, and other plasma proteins. *J Periodontol* 1977;48:772-7.
68. Challacombe SJ, Shirlaw PJ. Immunology of diseases of the oral cavity. In: *Mucosal immunology.* Elsevier Academic Press. 2005;517-46.
69. Patters MR, Niekraash CE, Lang NP. Assessment of complement cleavage in gingival fluid during experimental gingivitis in man. *J Clin Periodontol* 1989;16:33-7.
70. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:216-29.
71. Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J Immunol* 2007;178:7242-50.
72. Schenkein HA, Genco RJ. Complement cleavage products in inflammatory exudates from patients with periodontal diseases. *J Immunol.* 1978;120.
73. Lally ET, McArthur WP, Baehni PC. Biosynthesis of complement components in chronically inflamed gingiva. *J Periodontal Res.* 1982;17:257-62.
74. Courts FJ, Boackle RJ, Fudenberg HH, Silverman MS. Detection of functional complement components in gingival crevicular fluid from humans with periodontal diseases. *J Dent Res.* 1977;56:327-31.
75. Toto PD, Lin L, Gargiulo A. Identification of C3a, IgG, IgM in inflamed human gingiva. *J Dent Res.* 1978;57:696.
76. Nikolopoulou-Papaconstantinou AA, Johannessen AC, Kristoffersen T. Deposits of immunoglobulins, complement, and immune complexes in inflamed human gingiva. *Acta Odontol Scand.* 1987;45:187-93.
77. Rautemaa R, Meri S. Protection of gingival epithelium against complement mediated damage by strong expression of the membrane attack complex inhibitor protectin (CD59). *J Dent Res.* 1996;75:568-74
78. Boackle RJ. The interaction of salivary secretions with the human complement system a model for the study of host defense systems on inflamed mucosal surfaces. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2:355-67.
79. Beikler T, Peters U, Prior K, Eisenacher M, Flemmig TF. Gene expression in periodontal tissues following treatment. *BMC Med Genomics.* 2008;1:30.
80. Niekraash CE, Patters MR. Simultaneous assessment of complement components C3, C4, and B and their cleavage products in human gingival fluid. II. Longitudinal changes during periodontal therapy. *J Periodontal Res.* 1985; 20:268-75.
81. Snyderman R. Role for endotoxin and complement in periodontal tissue destruction. *J Dent Res.* 1972;51:356-61.
82. Krauss JL, Potempa J, Lambris JD, Hajishengallis G. Complementary Tolls in the periodontium: how periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol* 2000. 2010;52:141- 62.
83. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res.* 2003;82:82-90.

84. Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:55–76.
85. Schroeder HE. Transmigration and infiltration of leucocytes in human junctional epithelium. *Helv Odontol Acta*. 1973;17:6–18.
86. Roberts A, Shah M, Chapple IL. C-1 esterase inhibitor dysfunction localised to the periodontal tissues: clues to the role of stress in the pathogenesis of chronic periodontitis? *J Clin Periodontol*. 2003;30:271–7.
87. Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, et al. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet* 2005;37:835–43.
88. Chai L, Song Y-Q, Zee K-Y, Leung WK. Single nucleotide polymorphisms of complement component 5 and periodontitis. *J Periodont Res*. 2010;45:301–8.
89. Niculescu F, Rus H. Mechanisms of signal transduction activated by sublytic assembly of terminal complement complexes on nucleated cells. *Immunol Res* 2001;24:191–9.
90. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, McTavish AJ. Complement-induced phospholipase A2 activation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2000;57:1052–62.
91. Daniels RH, Houston WA, Petersen MM, Williams JD, Williams BD, Morgan BP. Stimulation of human rheumatoid synovial cells by non-lethal complement membrane attack. *Immunology*. 1990;69:237–42.
92. Raisz LG, Sandberg AL, Goodson JM, Simmons HA, Mergenhagen SE. Complement-dependent stimulation of prostaglandin synthesis and bone resorption. *Science* 1974;185:789–91.
93. Brunius G, Domeij H, Gustavsson A, Yucel-Lindberg T. Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *Regul Pept*. 2005;126:183-8
94. Brechter AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH. Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases. *Bone*. 2008;43:72-83.
95. Gutiérrez-Venegas G, Arreguín-Cano JA. Bradykinin promotes TLR2 expression in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol*. 2011;11:2079-85.
96. C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science*. 2001;294:1871–1875.
97. W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito, Cyclooxygenases: Structural, cellular and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem*. 2000;69:145–182.
98. C.C. Leslie, Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production, *Biochem. Cell. Biol*. 2004;82:1–17.
99. C.O. Bingham III, K.F. Austen, Phospholipase A2 enzymes in eicosanoid generation, *Proc. Assoc. Am. Phys*. 1999;111:516 – 524.
100. M. Murakami, I. Kudo, Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway, *Prog. Lipid Res*. 2004;43:3–35.
101. I. Kudo, M. Murakami, Phospholipase A2 enzymes, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;68-69:3–58.
102. J. Balsinde, I.D. Bianco, E.J. Ackermann, K. Conde-Frieboes, E.A. Dennis, Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995;92:8527–8531.
103. C.C. Leslie, Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2, *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids*. 2004;70:373–376.
104. J.D. Clark, L. Lin, R.W. Kriz, C.S. Ramesha, L.A. Sultzman, A.Y. Lin, N. Milona, J.L. Knopf,

- A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP, *Cell*. 1991;65:1043 – 1051.
105. J.H. Evans, C.C. Leslie, The cytosolic phospholipase A2 catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes, *J. Biol. Chem.* 2004;279:6005–6016.
  106. L.L. Lin, M. Wartmann, A.Y. Lin, J.L. Knopf, A. Seth, R.J. Davis, cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell*. 1993;72:269–278.
  107. Y. Hefner, A.G. Borsch-Haubold, M. Murakami, J.I. Wilde, S. Pasquet, D. Schieltz, F. Ghomashchi, J.R.R. Yates, C.G. Armstrong, A. Paterson, P. Cohen, R. Fukunaga, T. Hunter, I. Kudo, S.P. Watson, M.H. Gelb, Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases, *J. Biol. Chem.* 2000;275:37542–37551.
  108. M.M. Muthalif, Y. Hefner, S. Canaan, J. Harper, H. Zho, J.H. Parmentier, R. Aebersold, M.H. Gelb, K.U. Malik, Functional interaction of calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A(2), *J. Biol. Chem.* 2001;276: 39653 – 39660.
  109. N. Uozumi, K. Kume, T. Nagase, N. Nakatani, S. Ishii, F. Tashiro, Y. Komagata, K. Maki, K. Ikuta, Y. Ouchi, J. Miyazaki, T. Shimizu, Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition, *Nature*. 1997;390:618–622.
  110. J.V. Bonventre, Z. Huang, M.R. Taheri, E. O’Leary, E. Li, M.A. Moskowitz, A. Sapirstein, Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2, *Nature*. 1997;390:622 – 625.
  111. D.A. Wong, Y. Kita, N. Uozumi, T. Shimizu, Discrete role for cytosolic phospholipase A(2)alpha in platelets: studies using single and double mutant mice of cytosolic and group IIA secretory phospholipase A(2), *J. Exp. Med.* 2002;196:349 – 357.
  112. M. Hegen, L. Sun, N. Uozumi, K. Kume, M.E. Goad, C.L. Nickerson-Nutter, T. Shimizu, J.D. Clark, Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis, *J. Exp. Med.* 2003;197:1297 – 1302.
  113. W.L. Smith, Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells, *Annu. Rev. Physiol.* 1986;48:251 – 262.
  114. C.D. Funk, L.B. Funk, M.E. Kennedy, A.S. Pong, G.A. Fitzgerald, Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosome assignment, *FASEB J.* 1991;5:2304 – 2312.
  115. A. Tay, J.A. Squire, H. Goldberg, K. Skorecki, Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization, *Genomics*. 1994;23:718 – 719.
  116. Smith, W. L., D. L. DeWitt, and R. M. Garavito. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69: 145–182.
  117. Rouzer, C. A., and L. J. Marnett. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem. Rev.* 2003;103: 2239–2304.
  118. Mbonye, U. R., C. Yuan, C. E. Harris, R. S. Sidhu, I. Song, T. Arakawa, and W. L. Smith. Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. *Biol. Chem.* 2008;283: 8611–8623.
  119. Garavito, R. M., M. G. Malkowski, and D. L. DeWitt. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68–69: 129–152.
  120. Kulmacz, R. J., W. A. van der Donk, and A. L. Tsai. Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2. *Prog. Lipid Res.* 2003;42: 377–404.
  121. Van der Donk, W. A., A. L. Tsai, and R. J. Kulmacz. The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry.* 200;41: 15451–15458.
  122. T. Tanabe, N. Tohnai, Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression, *Prostaglandins Other Lipid Mediators.* 2002;68-69:95 – 114.
  123. I. Morita, Distinct functions of COX-1 and COX-2, *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 2002;68-69:165 – 175.

124. M. Shitashige, I. Morita, S. Murota, Different substrate utilization between prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and-2 in NIH3T3 fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1389:57–66.
125. N.V. Chandrasekharan, H. Dai, L.T. Roos, N.K. Evanson, J. Tomsik, T.S. Elton, D.L. Simmons, COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99:13926 – 13931.
126. R.B. Zurier, Prostaglandins, leukotrienes, and related compounds. *Textbook of Rheumatology*, Elsevier. 2005;204:356 – 369.
127. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 2006;119:229–40.
128. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007;282:11613–7.
129. Tai HH, Cho H, Tong M, Ding Y. NAD<sup>+</sup>-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structure and biological functions. *Curr Pharm Des* 2006;12:955–62.
130. Fortier MA, Krishnaswamy K, Danyod G, Boucher-Kovalik S, Chapdalaine P. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J Physiol Pharmacol* 2008;59:65–89.
131. Dey I, Lejeune M, Chadee K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 2006;149:611–23.
132. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871–5.
133. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56:387– 437.
134. Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, et al. Prostaglandin E(2)-EP4 signaling promotes immune inflammation through T(H)1 cell differentiation and T(H)17 cell expansion. *Nat Med.* 2009;15:633–40.
135. Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med.* 2003;9:744–9.
136. Krause P, Bruckner M, Uermosi C, Singer E, Groettrup M, Legler DF. Prostaglandin E2 enhances T cell proliferation by inducing the co-stimulatory molecules OX40L, CD70 and 4-1BBL on dendritic cells. *Blood.* 2009;113:2451–60.
137. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 2002;23:144–50.
138. Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, et al. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol.* 2005;6:524–31.
139. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis.* 2009;30:377–86.
140. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metast Rev.* 2007;26:525–34.
141. Boneberg EM, Legler DF, Senn HJ, Furstenberger G. Reduced expression of cyclooxygenase-2 in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100: 1042–3.
142. Ahmadi M, Emery DC, Morgan DJ. Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8<sup>+</sup> T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo. *Cancer Res.* 2008;68:7520–9.
143. Belibasakis GN, Guggenheim B. Induction of prostaglandin E(2) and interleukin-6 in gingival fibroblasts by oral biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;63:381-6.
144. Båge T, Kats A, Lopez BS, Morgan G, Nilsson G, Burt I, Korotkova M, Corbett L, Knox AJ, Pino L, Jakobsson PJ, Modéer T, Yucel-Lindberg T. Expression of prostaglandin E synthases in periodontitis immunolocalization and cellular regulation. *Am J Pathol.*

2011;178:1676-88

145. Båge T, Lindberg J, Lundeberg J, Modéer T, Yucel-Lindberg T. Signal pathways JNK and NF-kappaB, identified by global gene expression profiling, are involved in regulation of TNFalpha-induced mPGEs-1 and COX-2 expression in gingival fibroblasts. *BMC Genomics*. 2010;11:241
146. Pinho Mde N, Pereira LB, de Souza SL, Palioto DB, Grisi MF, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Short-term effect of COX-2 selective inhibitor as an adjunct for the treatment of periodontal disease: a clinical double-blind study in humans. *Braz Dent J*. 2008;19:323-8
147. Gutiérrez-Venegas G, Maldonado-Frías S, Ontiveros-Granados A, Kawasaki-Cárdenas P. Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sci*. 2005;77:60-73
148. Serhan CN. Eicosanoids in leukocyte function. *Curr Opin Hematol* 1994;1:69-77.
149. Goldstein IM, Malmsten CL, Kindhal H, Kaplan HB, Radmark O, et al. Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1978;148:787 - 91.
150. Zurier RB, Sayadoff DM. Release of prostaglandins from human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1975;1: 93-7.
151. Herrmann F, Lindemann A, Gauss J, Mertelsmann R. Cytokine stimulation of prostaglandin synthesis from endogenous and exogenous arachidonic acids in polymorphonuclear leukocytes involving activation and new synthesis of cyclooxygenase. *Eur J Immunol* 1990;20:2513 - 6.
152. Pouliot M, Gilbert C, Borgeat P, Poubelle PE, Bourgoin S, et al. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist activated human neutrophils. *FASEB J* 1998;12:1109 - 23.
153. Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol* 1998;160:1402-10.
154. Zaitso M, Hamasaki Y, Matsuo M, Miyazaki M, Hayasaki R, et al. Induction of cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin H2 synthase-2 by lipopolysaccharide in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol* 1999;63:94 - 102.
155. Fasano MB, Wells JD, McCall CE. Human neutrophils express the prostaglandin G/H synthase 2 gene when stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:304 - 8.
156. Nihiro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 1997;89:1621 -8
157. Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a + CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol* 1998;161:2804 - 9.
158. Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1997;186:1603 - 8.
159. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijderwint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* 1997;159: 28-35.
160. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Parnig L, et al. Proinflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997;27: 3135 - 42.
161. Whittaker DS, Bahjat KS, Moldawer LL, Clare-Salzler MJ. Autoregulation of human monocyte-derived dendritic cell maturation and IL-12 production by cyclooxygenase-2-

- mediated prostanoid production. *J Immunol* 2000;165:4298–304.
162. Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kallinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 2000;164:4507 – 12.
  163. Gadher SJ, Woolley DE. Comparative studies of adherent rheumatoid synovial cells in primary culture: characterisation of the dendritic (stellate) cell. *Rheumatol Int* 1987;7:13–22.
  164. Hashimoto SI, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood* 2000;96:2206 – 14.
  165. Bjercke S, Gaudernack G. Dendritic cells and monocytes as accessory cells in T-cell responses in man: II. Function as antigen-presenting cells. *Scand J Immunol* 1985;21:501 – 8.
  166. Andreesen R, Bross KJ, Osterholz J, Emmrich F. Human macrophage maturation and heterogeneity: analysis with a newly generated set of monoclonal antibodies to differentiation antigens. *Blood* 1986;67:1257 – 64.
  167. Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* 1999;94:837 – 44.
  168. Barrios-Rodiles M, Tiraloché G, Chadee K. Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and post-transcriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 beta and TNF-alpha. *J Immunol* 1999;166: 963–9.
  169. Ristimäki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1994; 269:11769 – 75.
  170. Barrios-Rodiles M, Chadee K. Novel regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by IFN-gamma in human macrophages. *J Immunol* 1998;161: 2441 – 8.
  171. Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ. Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:28 – 32.
  172. Srivastava SK, Tetsuka T, Daphna-Iken D, Morrison AR. IL-1 beta stabilizes COX II mRNA in renal mesangial cells: role of 3'-untranslated region. *Am J Physiol* 1994;267:F504 – 8.
  173. Gou Q, Liu CH, Ben-Av P, Hla T. Dissociation of basal turnover and cytokine-induced transcript stabilization of the human cyclooxygenase-2 mRNA by mutagenesis of the 3'-untranslated region. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242:508 – 12.
  174. Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 1995; 270:31315 – 20.
  175. Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. *Biochem Pharmacol* 2000;59:187 – 94.
  176. Riese JT, Hoff T, Nordhoff A, DeWitt DL, Resch K, Kaever V. Transient expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 during mouse macrophage activation. *J Leukocyte Biol* 1994;55:477 – 81.
  177. Endo T, Ogushi F, Sone S. LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is downregulated by IL-13, but not by IFN-gamma. *J Immunol* 1996;156:2240 – 6.
  178. Berg DJ, Zhang J, Lauricella DM, Moore SA. IL-10 is a central regulator of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *J Immunol* 2001;166:2674 – 80.
  179. Snyder DS, Beller DI, Unanue ER. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression.

- Nature 1982;299:163 – 5.
180. Kunkel SL, Campbell Jr DA, Chensue SW, Higashi GI. Species dependent regulation of monocyte/macrophage Ia antigen expression and antigen presentation by prostaglandin E. *Cell Immunol* 1986;97:140 – 5.
  181. Heinen E, Cormann N, Braun M, Kinet-Denoel C, Vanderschelden J, Simar LJ. Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids: VI. Analysis of prostaglandin secretion. *Ann Inst Pasteur/Immunol* 1986;137D:369 – 82.
  182. Van der Pouw Kraan TC, Boeijs LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995;181:775 – 9.
  183. Snijdwint FG, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150:5321 – 9.
  184. Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol* 1998;161:2723 – 30.
  185. Linnemeyer PA, Pollack SB. Prostaglandin E2-induced changes in the phenotype, morphology, and lytic activity of IL-2-activated natural killer cells. *J Immunol* 1993;150: 3747 – 54.
  186. Malygin AM, Meri S, Timonen T. Regulation of natural killer cell activity by transforming growth factor-beta and prostaglandin E2. *Scand J Immunol* 1993;37:71 – 6.
  187. Leung KH. Inhibition of human NK cell and LAK cell cytotoxicity and differentiation by PGE2. *Cell Immunol* 1989; 123:384 – 95.
  188. Longley RE, Stewart D, Roe KG, Good RA. Inhibition of murine lymphokine-activated killer (LAK) cell activity by adherent cells. *Cell Immunol* 1989;121:225 – 36.
  189. Droller MJ, Schneider MU, Perlmann P. A possible role of prostaglandins in the inhibition of natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against tumor cells. *Cell Immunol* 1978;39:165 – 77.
  190. Brunda MJ, Herberman RB, Holden HT. Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. *J Immunol* 1980; 124:2682 – 7.
  191. Roder JC, Klein M. Target – effector interaction in the natural killer cell system: IV. Modulation by cyclic nucleotides. *J Immunol* 1979;123:2785 – 90.
  192. Lala PK, Kennedy TG, Parhar RS. Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua: II. Characterization of the suppressor mechanisms. *Cell Immunol* 1988; 116:411 – 22.
  193. Parhar RS, Yagel S, Lala PK. PGE2-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential antitrophoblast activity. *Cell Immunol* 1989;120:61 – 74.
  194. Scodras JM, Parhar RS, Kennedy TG, Lala PK. Prostaglandin-mediated inactivation of natural killer cells in the murine decidua. *Cell Immunol* 1990;127:352 – 67.
  195. Tripodi D, Conti F, Rosati M, Maccauro G, Saggini A, Cianchetti E, Angelucci D, Fulcheri M, Tetè S, Salini V, Caraffa A, Antinolfi P, Toniato E, Castellani ML, Conti P, Theoharides TC. IL-36 a new member of the IL-1 family cytokines. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26:7-14. Review
  196. Schweizer A, Feige U, Fontana A, et al. Interleukin-1 enhances pain reflexes: mediation through increased prostaglandin E2 levels. *Agents Actions* 1988; 25:246–251
  197. Sharma S, Kulk N, Nold MF, Graf R, Kim SH, et al. 2008. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J. Immunol*. 180:5477–82
  198. Costelloe C, Watson M, Murphy A, McQuillan K, Loscher C, et al. IL-1F5 mediates antiinflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. *J. Neurochem*. 2008;105:1960–69
  199. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type

2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479–90

200. Werman A, Werman Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, et al. The precursor form of IL-1 $\alpha$  is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004;101:2434–39
201. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007;104:282–87
202. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH. Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia* 1986;29:63–67
203. Bendtzen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen JH, Dinarello CA, Svenson M. Cytotoxicity of human interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 1986;232:1545–47
204. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 2007;356:1517–26
205. Donath M, Whitmore J, Bauer R, Scannon P, Weder C, et al. An anti-IL-1 antibody, in a double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of the safety and pharmacokinetics in patients with type 2 diabetes mellitus, a new approach to therapy. *Diabetologia* 2008;51:433
206. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontol* 2000 1997; 14:9-11.
207. Offenbacher S. Periodontal diseases: Pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;1:821-878.
208. Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. *J Clin Periodontol* 2007; 34:367-369.
209. Cochran, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J. Periodontol.* 2008;79:1569–1576.
210. Nagasawa, T. et al. Roles of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol.* 2000.2007;43;65–84.
211. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–342.
212. Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J. Immunol.* 1998;160:403–409.
213. Baker, P. J. et al. CD4+ T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect. Immun.* 1999;67:2804–2809.
214. Delima, A. J. et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2001;28:233–240.
215. Graves, D. T. et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* 1998;69:1419–1425.
216. Garlet, G. P. et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor- $\alpha$  receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin. Exp. Immunol.* 2007;147:128–138.
217. Niederman, R. et al. Infection-mediated early-onset periodontal disease in P/E-selectin-deficient mice. *J. Clin. Periodontol.* 2001;28:569–575.
218. Al-Rasheed, A., Scheerens, H., Rennick, D. M., Fletcher, H. M. & Tatakis, D. N. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10. *J. Dent. Res.* 2003;82:632–635.

219. Moughal, N. A., Adonogianaki, E., Thornhill, M. H. & Kinane, D. F. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. *J. Periodont. Res.* 1992;27:623–630.
220. Tonetti, M. S. et al. Localized expression of mRNA for phagocyte specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect. Immun.* 1994;62:4005–4014.
221. Tonetti, M. S. Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration. *J. Periodont. Res.* 1997;32:104–109.
222. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post- menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 2006;85:596- 607.
223. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160:403-409.
224. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-342.
225. Mizuno A, Kanno T, Hoshi M, et al. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2002;20:337-344.
226. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane- bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:768-775.
227. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006;169:987-998.
228. Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasodom A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL upregulation associated with peri- odontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2007;78:1062-1069.
229. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res* 2003;38:380-387.
230. Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004;83:166-169.
231. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: Implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol* 2007;34:370-376.
232. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2006;41:354-360.
233. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: Possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003;11: 17-21.
234. VernalR,DutzanN,Herna' ndezM,etal.Highexpression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol* 2006;77:1772-1780.
235. Han X, Kawai T, Eastcott JW, Taubman MA. Bacterial responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol* 2006;176:625-631.
236. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783–801.
237. Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, et al. Detection of

- pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 2006;7:868–74.
238. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499–511.
239. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF- dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006;7:1074–81.
240. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005;7:758–65.
241. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002;4:131–6.
242. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6:1087–95.
243. Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, et al. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* 2006;7:962–70.
244. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115–22.
245. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001;167:5887–94.
246. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002;169:6668–72.
247. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM- 1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003;4:161–7.
248. YamamotoM,SatoS,HemmiH,HoshinoK,KaishoT,SanjoH,etal. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640–3.
249. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 2003;424:743–8.
250. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003;300:1148–51.
251. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:491–6.
252. McWhirterSM,FitzgeraldKA,RosainsJ,RoweDC,GolenbockDT,Maniatis T. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:233–8.
253. Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, et al. The roles of two IkappaB Kinase related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 2004;199:1641–50.
254. Perry AK, Chow EK, Goodnough JB, Yeh WC, Cheng G. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to Toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* 2004;199:1651–8.
255. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003;171:4304–10.

256. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* 2004;5:503–7.
257. Cusson-Hermance N, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3 and 4-induced NF-kappa B activation but does not contribute to IRF-3 activation. *J Biol Chem* 2005;280: 36560–6.
258. Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* 2005;309:1854–7.
259. Werner SL, Barken D, Hoffmann A. Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science* 2005;309:1857–61.
260. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006;6:644–58.
261. Colonna M, Trinchieri G, Liu Y J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219–26.
262. Liu YJ. IPC: professional Type 1 interferon producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275–306.
263. Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 2002;14:1225–31.
264. Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* 2003;170:3059–64.
265. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 2004;5:1061–8.
266. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15416–21.
267. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotsu T, Kato H, Takeshita F, et al. Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase-1 (IRAK-1) plays an essential role for TLR7- and TLR9-mediated interferon-alpha induction. *J Exp Med* 2005;201:915–23.
268. Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, Hemmi H, et al. IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* 2006;440:949–53.
269. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006;442:39–44.
270. Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* 2006;22:561–9.
271. Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006;439:204–7.
272. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006;439:208–11.
273. Huang Y, Li T, Sane DC, Li L. IRAK1 serves as a novel regulator essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-10 gene expression. *J Biol Chem* 2004;279:51697–703.
274. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MB, Kobayashi KS, Glimcher LH, et al. Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 2006;7:498–506.
275. Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 2006;103:15136–41.
276. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005;434:243–9
  277. Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2006;38:550–5.
  278. Tsujimura H, Tamura T, Kong HJ, Nishiyama A, Ishii KJ, Klinman DM, et al. Toll-like receptor 9 signaling activates NF-kappaB through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:6820–7.
  279. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self-DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006;7:49–56.
  280. Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 2005;434:1035–40.
  281. Rowe DC, McGettrick AF, Latz E, Monks BG, Gay NJ, Yamamoto M, et al. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6299–304.
  282. McGettrick AF, Brint EK, Palsson-McDermott EM, Rowe DC, Golenbock DT, Gay NJ, et al. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC {epsilon} during Toll-like receptor 4 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9196–201.
  283. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 2006;125:943–55.
  284. Miyake K, Yamashita Y, Ogata M, Sudo T, Kimoto M. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J Immunol* 1995;154:3333–40.
  285. Miyake K, Shimazu R, Kondo J, Niki T, Akashi S, Ogata H, et al. Mouse MD-1, a molecule that is physically associated with RP105 and positively regulates its expression. *J Immunol* 1998;161:1348–53.
  286. Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 2005;6:571–8.
  287. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O’Neill LA, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004;5: 373–9.
  288. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2003;4:920–7.
  289. Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2004;5:495–502.
  290. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CAJ, Medzhitov R, Flavell R. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110:191–202.
  291. Janssens S, Burns K, Vercammen E, Tschopp J, Beyaert R. MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1- dependent gene expression. *FEBS Lett* 2003;548:103–7.
  292. Hardy MP, O’Neill LA. The murine IRAK2 gene encodes four alternatively spliced isoforms, two of which are inhibitory. *J Biol Chem* 2004;279:27699–708.
  293. Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 2006;7:148–55.
  294. Su X, Li S, Meng M, Qian W, Xie W, Chen D, et al. TNF receptor- associated factor-1

- (TRAF1) negatively regulates Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF)-mediated signaling. *Eur J Immunol* 2006;36:199–206.
295. Takeshita F, Ishii KJ, Kobiyama K, Kojima Y, Coban C, Sasaki S, et al. TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF. *Eur J Immunol* 2005;35:2477–85.
  296. Wang Y, Tang Y, Teng L, Wu Y, Zhao X, Pei G. Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2006;7:139–47.
  297. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004;5:1052–60.
  298. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, et al. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* 2006;7:598–605
  299. Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Kennedy K, et al. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 2006;441:173–8.
  300. Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, et al. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15989–94.
  301. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136:215-33. Review.
  302. Monk CE, Hutvagner G, Arthur JS. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. *PLoS One*. 2010;5:E13669
  303. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, Tamassia N, Mantovani A, Cassatella MA, Locati M. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:5282-7.
  304. Tam W, Hughes SH, Hayward WS, Besmer P. Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. *J Virol*. 2002;76:4275-86.
  305. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 2007;179:5082-9
  306. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:1604-9.
  307. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A, Frendewey D, Valenzuela D, Kutok JL, Schmidt-Suppran M, Rajewsky N, Yancopoulos G, Rao A, Rajewsky K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007;316:604-8.
  308. Bala S, Marcos M, Kodys K, Csak T, Catalano D, Mandrekar P, Szabo G. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem*. 2011;286:1436-44.
  309. McCoy CE, Sheedy FJ, Qualls JE, Doyle SL, Quinn SR, Murray PJ, O'Neill LA. IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *J Biol Chem*. 2010;285:20492-8.
  310. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 28;106(17):7113-8.
  311. Cremer TJ, Ravneberg DH, Clay CD, Piper-Hunter MG, Marsh CB, Elton TS, Gunn JS,

- Amer A, Kanneganti TD, Schlesinger LS, Butchar JP, Tridandapani S. MiR-155 induction by *F. novicida* but not the virulent *F. tularensis* results in SHIP downregulation and enhanced proinflammatory cytokine response. *PLoS One*. 2009;4:e8508.
312. An H, Xu H, Zhang M, Zhou J, Feng T, Qian C, Qi R, Cao X. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SHIP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity and PI-3K independent mechanism. *Blood*. 2005;105:4685-92.
313. Gabhann JN, Higgs R, Brennan K, Thomas W, Damen JE, Ben Larbi N, Krystal G, Jefferies CA. Absence of SHIP-1 results in constitutive phosphorylation of tank-binding kinase 1 and enhanced TLR3-dependent IFN-beta production. *J Immunol*. 2010;184:2314-20.
314. Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Büchse T, Krystal G. SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is upregulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol*. 2003;31:1170-81. Review.
315. Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, Margioris AN, Tsiglis PN, Tsatsanis C. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity*. 2009;31:220-31.
316. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316:608-11.
317. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:12481-6.
318. Recchiuti A, Krishnamoorthy S, Fredman G, Chiang N, Serhan CN. MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits. *FASEB J*. 2011;25:544-60.
319. Chassin C, Kocur M, Pott J, Duerr CU, Gütle D, Lotz M, Hornef MW. miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine. *Cell Host Microbe*. 2010;8:358-68.
320. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol*. 2008;180:5689-98.
321. Bhaumik, D. et al., *Aging* 2009;1:402–411.
322. Jones SW, Watkins G, Le Good N, Roberts S, Murphy CL, Brockbank SM, Needham MR, Read SJ, Newham P. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17:464-72.
323. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: Implication in innate immunity. *J Biol Chem*. 2009 Dec;284:34590-9
324. Boldin, M. P. et al., *J. Exp. Med*. 2011;208: 1189–1200.
325. Matthew R. Young, Arti N. Santhanam, Noriko Yoshikawa, and Nancy H. Colburn. Have Tumor Suppressor PDCD4 and its Counteragent Oncogenic miR-21 Gone Rogue? *Mol Interv*. 2010;10: 76–79.
326. Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell*. 2010;39:493-506.
327. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007;282:14328-36.
328. Ziyang, w. et al., *med. oncol*. 2010. in press.
329. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, Abdellatif M. MicroRNA-21 is a

- downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem.* 2010;285:20281-90.
330. Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2008;68:8164-72.
  331. Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition with Toll- like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 2005;17:338–344.
  332. Yoshioka, H., Yoshimura, A., Kaneko, T., Golenbock, D. T. & Hara, Y. Analysis of the activity to induce toll- like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated stimulation of supragingival plaque. *J. Periodontol.* 2008;79:920–928.
  333. Burns, E., Bachrach, G., Shapira, L. & Nussbaum, G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J. Immunol.* 2006;177:8296–8300.
  334. Gibson, F. C. 3rd, Ukai, T., Genco, C. Engagement of specific innate immune signaling pathways during *Porphyromonas gingivalis* induced chronic inflammation and atherosclerosis. *Front. Biosci.* 2008;13:2041–2059.
  335. Yan P, Yue J, Jiang H. Expression of ICAM-1/LFA-1 in the pocket area of adult periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1999;34:106-108.
  336. Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68,:140-3146.
  337. Warner RL, Bhagavathula N, Nerusu KC, Lateef H, Younkin C, Johnson KJ, Varani J. Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to proinflammatory mediators in vitro. *Exp Mol Pathol.*2004;76:189-195.
  338. Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, Raiden S, Geffner J. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur J Immunol* 2003;33:3164-3174.
  339. Galdiero M, de l'Ero GC, Marcatili A. Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. *Infect Immun* 1997;65:699-707.
  340. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760.
  341. Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:14-23.
  342. Gutiérrez Venegas, Gloria. Cardoso Jiménez, Patricia.Ácido lipoteicoico, receptores y mecanismos de trasducción. *REB.* Junio 2006;25:41-49
  343. Fischer, W.. Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids. *Handbook of lipid research.* 1990;6:123–234.
  344. Fischer, W., H. U. Koch, and R. Haas. Improved preparation of lipoteichoic acids. *Eur. J. Biochem.* 1983;133:523–530.
  345. Hellman J, Loiselle PM, Tehan MM, Allaire JE, Boyle LA, Kurnick JT, Andrews DM, Sik Kim K, Warren HS. Outer membrane protein A, peptidoglycan- associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by *Escherchia coli* bacteria into serum. *Infec and Immun* 2000;68:2566-2572
  346. Gutiérrez Venegas, Gloria. Cardoso Jiménez, Patricia.Ácido lipoteicoico, receptores y mecanismos de trasducción. *REB.* Junio 2006;25:41-49
  347. Cleveland, M. G., J. D. Gorham, T. L. Murphy, E. Tuomanen, and K. M. Murphy. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin- 12 through a

- CD14-dependent pathway. *Infect. Immun.*1996;64:1906–1912.
348. Sugiyama, A., R. Arakaki, T. Ohnishi, N. Arakaki, Y. Daikuhara, and H. Takada. Lipoteichoic acid and interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture. *Infect. Immun.* 1996;64:1426–1431.
  349. Takada, H., Y. Kawabata, R. Arakaki, S. Kusumoto, K. Fukase, Y. Suda, T. Yoshimura, S. Kokeyuchi, K. Kato, T. Komuro, N. Tanaka, M. Saito, T. Yoshida, M. Sato, and S. Kotani. Molecular and structural requirements of a lipoteichoic acid from *Enterococcus hirae* ATCC 9790 for cytokine-inducing, antitumor, and antigenic activities. *Infect. Immun.* 1995;63:57–65.
  350. 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.* 1999;67:1623–1632
  351. Gao JJ, Xue Q, Zuvanich EG, Haghi KR, Morrison DC. Commercial preparations of lipoteichoic acid conatian endotoxin that contibues to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect Immun* 2001;69:751-757.
  352. Gutiérrez-Venegas G, Cardoso-Jiménez P. Lipoteichoic acid promotes nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin via AKT in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 2011;11:1278-84
  353. Gutiérrez-Venegas G, Bando-Campos CG. The flavonoids luteolin and quercetagenin inhibit lipoteichoic acid actions on H9c2 cardiomyocytes. *Int Immunopharmacol.* 2010;10:1003-9
  354. Winkel-Shirley, B.. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology* 2001;126: 485-493
  355. Singleton VL. Flavonoids. *Advances in Food Research.* Academic Press, Nueva York. 1981;27:149-242.
  356. 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
  357. Hollman PCH y Katan MB: Absortion, Metabolism, and Bioavailabiliy of Flavonoids. En: *Flavonoids in Health and Disease.* Ed. Marcel Dekker, INC. New York, 1998, 22:483-522.
  358. Atoui Ak, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P: Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* 2005; 89: 27-36.
  359. Ames Bn, Shigenaga Mk, Hagen Tm: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 90: 7915-7922.
  360. Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Krok A. Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrung swiss* 1998;2:147-63.
  361. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56:317-33.
  362. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* 2000;16:91-8.
  363. Groot H de, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 1998;3:249-55.
  364. Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions* 1991;32:283-8.
  365. Lindahl M, Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation* 1997;21:347-56.
  366. Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res* 1999;13:393-6.

367. Davies KJA. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In: Rice-Evans C, Halliwell B, Lunt GG eds. Free radicals and oxidative stress: Environment, Drugs and Food Additives. 1995;1-35.
368. Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. In: Rice-Evans C, Halliwell B, Lunt GG, eds. Free radicals and oxidative stress: Environment, Drugs and Food Additives. 1995;73-101.
369. Vladimirov IA. Free radicals and Antioxidants. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 1998;7:43-51.
370. Trueba PG, Márquez HI, Martínez SB. Evaluación de la actividad antioxidante de la Gossypitrina a través de ensayos in vitro e in vivo. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana. 1997;10-14.
371. Ratty AK, Das NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol* 1988;39:69-79.
372. Koch HP, Loffler E. Influence of silymarin and some flavonoids on lipid peroxidation in human platelets. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1985;7:13-8.
373. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med* 1995;19:481-6.
374. Yoshino M, Murakami K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 1998;257:40-4.
375. Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology* 1995;109:1941-9.
376. Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AJ, Bonomo RP. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub>·-. *Free Radic Biol Med* 1991;11:1-8.
377. Morazzoni P, Malandrino S. Anthocyanins and their aglycons as scavengers of free radicals and antilipoperoxidant agents. *Pharmacol Res Comm* 1988;20:254.
378. Van Acquire SA, Van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:331-42.
379. Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* 1996;20:35-43.
380. Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, Simic MG. Reduction of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *J Chem Soc Perkin Trans* 1996;2:2497-504.
381. Jovanovic SV, Simic MG. Antioxidants in nutrition. *Ann NY Acad Sci* 2000;899:326-34.
382. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygen and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1994;16:845-50.
383. Cheng IF, Breen K. On the ability of four flavonoids, baicalein, gluteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals* 2000;1:77-83.
384. Nakayama T. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res* 1994;54:1991-3.
385. Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1210-8.
386. Dehmlow C, Erhard J, Groot H de. Inhibition of kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of Silibinin. *Hepatology* 1996;23:749-54.
387. Nishizuka Y: Studies and perspective of protein kinase C. *Science* 1986; 233: 305-312.
388. Nishizuka Y: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988;334:661-665
389. Nishizuka Y: Protein kinase and lipid signaling cellular responses. *FASEB J* 1995; 9: 484-

- 496.
390. Graziani Y, Cha Yoth R, Karny N, Feldman B, Levy J: Regulation of protein kinase activity by quercetin in Ehrlich Ascites tumor cells. *BiochimBiophys Acta* 1981; 28: 415-421.
  391. Gschwendt M, Horn F, Kittstein W, Marks F: Inhibition of the calcium- and phospholipid- dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin. *Biochem Biophys Res Comm* 1983; 117: 444-447.
  392. End DW, Look RA, Shaffer NL, Balles EA, Persico FJ: Non-selective inhibition of mammalian protein kinases by flavonoids in vitro. *Res Commun Chem Pathol Pharm* 1987; 56: 75-86.
  393. Hagiwara M, Inoue S, Tanaka T, Nunoki K, Ito M, Hidaka H: Differential effects of flavonoids asinhibitors of tyrosine protein kinase and serine/ threonine protein kinases. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 2987-2999.
  394. Ferriola PC, Cody V, Middleton E: Protein kinase C inhibition by plant flavonoids, kinetic mechanism and structure activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1617-1624.
  395. Picq M, Dubois M, Munarl-Silem Yprigent AF, Pacheco H: Flavonoid modulation of protein kinase C activation. *Life Sci* 1989; 44: 1563-1571.
  396. Graziani Y, Erikson E, Erikson RL: The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene producto in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 1983; 135: 583-589.
  397. Alexandrakis M, Singh L, Boucher W, Letourneau R, Theoflopoulos P, Theoharides TC: Differential effects of flavonoids on inhibition of secretion and on accumulation of secretory granules in rat basophile leukemia cells. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21: 379-390.
  398. Bird TA, Schule HD, Delaney PB, Sims JE, Thoma B, Dower SK: Evidence that MAP (mitogen activated protein) kinase activation may be a necessary but not sufficient signal for a restricted subset of responses in IL-1 treated epidermoid cells. *Cytokine* 1992; 4: 429-440.
  399. Rogers JC, Williams DL: Kaempferol inhibits myosin light chain kinase. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 164: 419-425.
  400. Jinsart W, Ternal B, Polya GM: Inhibition of rat liver cyclic AMP-dependent protein kinase by flavonoids. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1992; 373: 205-211.
  401. Rodney G, Swanson AL, Wheeler LM, Smith GN, Worrel CS: The effect of a series of flavonoids of hyaluronidase and some other related enzymes. *J Biol Chem* 1950; 183: 739-747.
  402. Carpenedo F, Bortignon C, Bruni A, Santl R: Effect of quercetin on membrane-linked activities. *Biochem Pharmacol* 1969; 18: 1495-1500.
  403. Lang DR, Racker E: Effects of quercetin on F1 inhibitor or mitochondrial ATPase and energy- linked reactions in submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta* 1974; 333: 180-186.
  404. Deters DW, Racker E, Nelson N, Nelson H: Partial resolution of the enzymes catalyzing photophos- phorylation. *J Biol Chem* 1975; 250: 1041-1047.
  405. Cantley LC, Hammes GG: Investigation of quer- cetin binding sites on chloroplast coupling fac- tor . *Biochemistry* 1976; 15: 1-8.
  406. Long gd, Decha Telet LR, O'Flaherty JT, MCall CE, Blass DA, Shirley PS, Parce JW: Effects of quercetin on magnesium-dependent adenosine triphosphatase and the metabolism of human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1981; 57: 561-566.
  407. Fewtrell CMS, Gomperts BD: Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells. *Nature* 1977; 265: 635-636.
  408. Zyma VL, Miroshnichenko NS, Danilov A VM, Engrin E: Interaction of flavonoid compounds with contractile proteins of skeletal muscle. *Gen Physiol Biophys* 1988; 7: 165-175.

409. Hirano T, Oka K, Akiba M: Effects of synthetic and natural flavonoids on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: Aspects of the structure-activity relationship and action mechanism. *Life Sci* 1989; 45: 1111-1117.
410. Pruzanki W, Vadas P: Phospholipase A2, A mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* 1991; 12: 143-144.
411. Lee TP, Ttaliano ML, Middleton E: Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. *Life Sci*. 1982; 31: 2765-2774.
412. Lanni C, Becker EL: Inhibition of neutrophil phospholipase A2 by p-bromophenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid, 5,8,11,14-eicotetraenoic acid and quercetin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 76: 214-217.
413. Gil B, Sanz MJ, Terencio M, Ferrandiz ML, Bustos G, Pa Y A M, ET AL: Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipase A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci* 1994; 54: PL333-PL338.
414. Lewis RA, Austen KF: The biologically active leukotrienes: Biosynthesis, metabolism, receptors, functions and pharmacology. *J Clin Invest* 1984; 73: 889-897.
415. Yamamoto S, Yoshimoto T, Furukawa M, Horie T, Watanabe-Kohno S: Arachinodate 5-lipoxygenase and its new inhibitors. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 349-352.
416. Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Hone T, Watanabe-Kohno S: Flavonoids: Potent inhibitors of arachinodate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Comm* 1983; 116: 612-618.
417. Loughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Houl T JR, Halliwell B: Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1673-1681.
418. Houl T JRS, Maroney MA, PA Y A M: Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods Enzimol* 1994; 234: 443-454.
419. Ruckstuhl M, Landry Y: Inhibition of lung cyclic AMP- and GMP- phosphodiesterases by flavonoids and other chromone-like compounds. *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 697-702.
420. Beretz A, Anton R, Cazena VE JP: The effects of flavonoids on cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: Cody V, Middleton E, Harborne JB. Eds. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationships*. New York. Alan R. Liss., 1986; 281-296.
421. Beretz A, Joly M, Stoclet JC, Anton R: Inhibition of 3',5' -AMP phosphodiesterase by flavonoids and xanthenes. *Planta Med* 1979; 36: 193-195
422. Nagai T, Miyaichi Y, Tomimori T, Yamada H: Inhibition of mouse liver sialidase by plant flavonoids. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 163: 25-31.
423. Nagai T, Miy Aichi Y, Tomimori T, Suzuki Y, Yamada H: Inhibition of influenza virus sialidase and anti-influenza virus activity by plant flavonoids. *Chem Pharm Bull* 1990; 38: 1329- 1332.
424. Nagai T, Miy Aichi, Tomimori T, Suzuki Y, Yamada H: In vivo anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase. *Antiviral Res* 1992; 19: 207-217.
425. Murad F: Discovery of some biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 1999; 38: 1856-1868.
426. Gnarr LJ: Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 1999; 38: 1882-1892.
427. Wandehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J: Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *TRENDS in Plant Science* 2001; 6(4): 177-182.
428. Feinstein DL, Galea E, Reis DJ: Suppression of glial iNOS expression by tyrosine kinase inhibitors. *Ann NY Acad Sci* 1994; 738: 325-328.

429. Soliman KF, Mazzi EA: In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. *Proc Exp Biol Med* 1998; 218: 390-397.
430. Chiesi M, Schw Aller R: Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem Pharmacol* 1995; 14: 495-501.
431. Li H, Xia N, Brausch I, Yao Y, Förstermann U: Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Up-Regulate Endothelial-Type Nitric-Oxide Synthase Gene Expression in Human Endothelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310: 926-932.
432. Huang Y, Chan NW, Lau CW, Yao XQ, Chan FL, Chen ZY : Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)-epicatechin. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1427: 322-328.
433. Wessler LM, Follmann E, Michaelis W, Duster-Hoft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V: A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem* 2004;279: 6190-6195.
434. Duarte J, Jimenez R, Villar IC, Perez-Vizcaino F, Jimenez J, Tamargo J: Vasorelaxant effects of the flavonoid chrystin in isolated rat aorta. *Planta Med* 2001; 67: 567-569.
435. Gugler R, Leschik M, Dengler HJ: Disposition of quercetin after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* 1975; 9: 229-234.
436. Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regera T F, Remesy C: Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 1998; 24: 331-336.
437. Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Arroyo-Cruz SR, Maldonado-Frías S. Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 2006;541:95-105
438. Gutiérrez-Venegas G, Jiménez-Estrada M, Maldonado S. The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:1199-210
439. Zhu G, Li C, Cao Z. Inhibitory effect of flavonoid baicalin on degranulation of human polymorphonuclear leukocytes induced by interleukin-8: potential role in periodontal diseases. *J Ethnopharmacol.* 2007;109:325-30.
440. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:64-70.
441. Lee YL, Hong CY, Kok SH, Hou KL, Lin YT, Chen MH, Wang CC, Lin SK. An extract of green tea, epigallocatechin-3-gallate, reduces periapical lesions by inhibiting cysteine-rich 61 expression in osteoblasts. *J Endod.* 2009;35:206-11
442. Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, Dobson VL. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat Res.* 1997;393:223-31.
443. Bok Yun Kang, Seung Hyun Kim, Daeho Cho and Tae Sung Kim. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages via decreased nuclear factor- $\kappa$ B DNA binding activity by myricetin, a naturally occurring flavonoid. *Archives of pharmacal research.* 2005;28:274-279
444. Lee YS, Choi EM. Myricetin inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammatory mediators in SW982 human synovial sarcoma cells. *Int Immunopharmacol.* 2010;10:812-4.
445. Hsu YL, Chang JK, Tsai CH, Chien TT, Kuo PL. Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:504-14.
446. Kumamoto T, Fujii M, Hou DX. Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. *Cancer Lett.* 2009;275:17-26.
447. Wang SJ, Tong Y, Lu S, Yang R, Liao X, Xu YF, Li X. Anti-inflammatory activity of

- myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves. *Planta Med.* 2010;76:1492-6.
448. HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res.* 2008;31:1303-11.
449. Bollen CM, Quireynen M. Microbiologic response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J Periodontol* 1996; 67: 1143–1158
450. Yazdankhah SP, Scheie AA, Høiby EA, Lunestad BT, Heir E, Fotland TØ, Naterstad K, Kruse H. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. *Microb Drug Resist.* 2006;12:83-90. Review
451. Gilbert P, Allison DG, McBain AJ. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2002;31:98S-110S. Review
452. Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control* 2000;28:184–96
453. Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR, the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:247-280
454. Denton GW. Chlorhexidine. In: Block SS (ed) *Disinfection,sterilization and preservation*, 5th edn. Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia. 2000;321–336
455. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92:446-50
456. J. M. Beitia, et. al. Urticaria aguda por clorhexidina. *Alergol Inmunol Clin* 2001; 16: 351-354
457. Mombelli A, Samaranayake LP. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. *Int Dent J.* 2004;54:3-14. Review.
458. D. T. Graves, “The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression,” *Clinical Infectious Diseases*, 1999;28:482–490.
459. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998; 160: 403–409.
460. Mbalaviele G, Anderson G, Jones A, De Ciechi P. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase prevents inflammatory bone destruction. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:1044–1053.
461. Cook R, Wu CC, Kang YJ, Han J. The role of the p38 pathway in adaptive immunity. *Cell Mol Immunol* 2007;4:253–259.
462. Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis* 1999;179:939–944.
463. Dean JL, Brook M, Clark AR, Saklatvala J. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* 1999;274:264–269.
464. Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, et al. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 1997;158:3165–3173.
465. Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, Lee JC, et al. SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L895–902.
466. Rossa C Jr. Liu M, Bronson P, Kirkwood KL. Transcriptional activation of MMP-13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase. *J Endotoxin Res* 2007;13:85–93.

467. Patil C, Rossa C Jr, Kirkwood KL. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:392–398.
468. Patil C, Zhu X, Rossa C Jr, Kim YJ, Kirkwood KL. p38 MAPK regulates IL-1beta induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol Invest* 2004;33:213–233.
469. Rossa C Jr, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. *Matrix Biol* 2005;24:478–488.
470. Kirkwood KL, Rossa C Jr. The potential of p38 MAPK inhibitors to modulate periodontal infections. *Curr Drug Metab.* 2009;10:55-67. Review.
471. A. Kotlyarov, A. Neininger, C. Schubert et al., “MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- $\alpha$  biosynthesis,” *Nature Cell Biology* 1999;1:94–97.
472. Q. Li, H. Yu, R. Zinna et al., “Silencing mitogen-activated protein kinase-2 arrests inflammatory bone loss,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011;336:633–642.
473. Delima AJ, Karatzas S, Amar S, Graves DT. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists. *J Infect Dis* 2002; 186: 511–516.
474. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol* 2008;79: 1592– 1600.
475. Herman S, Kronke G, Schett G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med* 2008; 14: 245–253.
476. Sims NA, Green JR, Glatt M, Schlicht S, Martin TJ, Gillespie MT, Romas E. Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2338–2346.
477. Graziani F, Cei S, Guerrero A, La Ferla F, Vano M, Tonetti M, Gabriele M. Lack of short-term adjunctive effect of systemic neridronate in non-surgical periodontal therapy of advanced generalized chronic periodontitis: an open label-randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 419–427.
478. Lane N, Armitage GC, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang HY, Jeffcoat M, Munoz T. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo- controlled study. *J Periodontol* 2005;76: 1113–1122.
479. Rocha M, Nava LE, Vázquez de la Torre C, Sánchez- Marin F, Garay-Sevilla ME, Malacara JM. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: a randomized, placebo-controlled trial. *J Periodontol* 2001; 72: 204–209.
480. Shinoda H, Takeyama S, Suzuki K, Murakami S, Yamada S. Pharmacological topics of bone metabolism: a novel bis-phosphonate for the treatment of periodontitis. *J Pharmacol Sci.* 2008;106:555-8. Review
481. Takaishi Y, Ikeo T, Miki T, Nishizawa Y, Morii H. Suppression of alveolar bone resorption by etidronate treatment for periodontal disease: 4- to 5-year follow-up of four patients. *J Int Med Res* 2003; 31: 575–584.
482. Takaishi Y, Miki T, Nishizawa Y, Morii H. Clinical effect of etidronate on alveolar pyorrhoea associated with chronic marginal periodontitis: report of four cases. *J Int Med Res* 2001; 29: 355–365.
483. Volpi R, Rossi F, Trisi P, Testori T, Berardi D, Perfetti G. Pharmacologic modulation of clodronate in local therapy of periodontal and implant inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007;20: 69–74.
484. Ficarra G, Beninati F, Rubino I, Vannucchi A, Longo G, Tonelli P, Pini Prato G. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates

- treatment. *J Clin Periodontol* 2005;32: 1123–1128.
485. Kunchur R, Goss AN. The oral health status of patients on oral bisphosphonates for osteoporosis. *Aust Dent J* 2008;53: 354–357.
  486. Fonseca JE, Santos MJ, Canhaõ H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 2009; 2: 538–542.
  487. Mogi M, Ootogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 894–898.
  488. Stroup GB, Lark MW, Veber DF, Bhattacharyya A, Blake S, Dare LC, Erhard KF, Hoffman SJ, James IE, Marquis RW, Ru Y, Vasko-Moser JA, Smith BR, Tomaszek T, Gowen M. Potent and selective inhibition of human cathepsin K leads to inhibition of bone resorption in vivo in a nonhuman primate. *J Bone Miner Res* 2001;16: 1739–1746.
  489. Deal C. Future therapeutic targets in osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21: 380–385.
  490. Mira E, Marñes S. Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of statins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009; 9: 237–247.
  491. Lindy O, Suomalainen K, Mäkelä M, Lindy S. Statin use is associated with fewer periodontal lesions: a retrospective study. *BMC Oral Health* 2008; 8: 16–22.
  492. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, Spolidorio DM, Rossa C Jr, Spolidorio LC. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2009; 44: 479–488.
  493. Seto H, Ohba H, Tokunaga K, Hama H, Horibe M, Nagata T. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2008; 43: 261–267.
  494. Vaziri H, Naserhojjati-Roodsari R, Tahsili-Fahadan N, Khojasteh A, Mashhadi-Abbas F, Eslami B, Dehpour AR. Effect of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *J Periodontol* 2007; 78: 1561–1567.
  495. Saxlin T, Suominen-Taipale L, Knuutila M, Alha P, Ylöstalo P. Dual effect of statin medication on the periodontium. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 997–1003.
  496. Pischon, N., Heng, N., Bernimoulin, J. P., Kleber, B.M, Willich, S. N. & Pischon, T. Obesity, inflammation, and periodontal disease. *Journal of Dental Research* 2007;86, 400–409.
  497. Jenzsch, A., Eick, S., Rassoul, F., Purschwitz, R. & Jentsch, H. Nutritional intervention in patients with periodontal disease: clinical, immunological and microbiological variables during 12 months. *British Journal of Nutrition* 2009;101, 879–885.
  498. Tonetti MS, Chapple IL; Working Group 3 of Seventh European Workshop on Periodontology. Biological approaches to the development of novel periodontal therapies--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38:114-8
  499. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, et al. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1995;270:27489–94.
  500. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, et al. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7686–9.
  501. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:18623
  502. Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med*. 1999;5:810–16.
  503. Williams DH, Wilkinson SE, Purton T, et al. Ro 09-2210 exhibits potent anti-proliferative effects on activated T cells by selectively blocking MKK activity. *Biochemistry*. 1998;37:9579–85.
  504. Zhao A, Lee SH, Mojena M, et al. Resorcylic acid lactones: naturally occurring potent and selective inhibitors of MEK. *J Antibiot*. 1999;52:1086–94.
  505. Mori T, Wang X, Jung JC, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic

- brain injury: in vitro and in vivo effects. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:444–52.
506. Slomiany BL, Slomiany A. Role of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase cascades in gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *IUBMB Life.* 2001;51:315–20.
  507. Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, et al. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;279:1453–61.
  508. Bianchi M, Ulrich P, Bloom O, et al. An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol Med.* 1995;1:254–66.
  509. Bianchi M, Bloom O, Raabe T, et al. Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanylylhydrazone. *J Exp Med.* 1996;183:927
  510. Brugge J, Hung MC, Mills GB. A new mutational AKT activation in the PI3K pathway. *Cancer Cell* 2007;12: 104–7.
  511. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8: 187–98.
  512. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8: 627–44.
  513. Park HY, Kim GY, Choi YH. Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor- $\kappa$ B and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *Int J Mol Med.* 2012;30:204–10.
  514. Luo LJ, Liu F, Lin ZK, Xie YF, Xu JL, Tong QC, Shu R. Genistein regulates the IL-1 beta induced activation of MAPKs in human periodontal ligament cells through G protein-coupled receptor 30. *Arch Biochem Biophys.* 2012;522:9–16.
  515. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003;74:391–401. Review.
  516. Nakamura I, Jimi E. Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1. *Vitam Horm.* 2006;74:357–70. Review.
  517. Jimi E, Nakamura I, Ikebe T, Akiyama S, Takahashi N, Suda T. Activation of NF- $\kappa$ B is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem.* 1998;273:8799–805.
  518. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:282–90.
  519. Gutiérrez-Venegas G, Arreguín-Cano JA, Arroyo-Cruz R, Villeda-Navarro M, Méndez-Mejía JA. Activation of ERK1/2 by protein kinase C- $\alpha$  in response to hydrogen peroxide-induced cell death in human gingival fibroblasts. *Toxicol In Vitro.* 2010;24:319–26.

## Acrónimos

---

AA: Ácido araquidónico  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
AP-1: Proteína activadora 1  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
ATF3: Factor de transcripción dependiente de AMPc  
BIC: Clúster de integración de células B  
BIS: Bisindolilmaleimida (inhibidor de PKC)  
CD14: Clúster de diferenciación 14  
CD36: Clúster de diferenciación 36  
CDs: Células Dendríticas  
COX: Ciclooxygenasa  
CpG: Regiones con alta frecuencia de citocina y guanina  
CXCL: Quimiocinas  
DAG: Diacilglicerol  
dsRNA: ARN de doble cadena  
ERK ½: Cinasa regulada por señales extracelulares 1/2  
ICAM-1: Moléculas de adhesión intracelular-1  
IFN $\gamma$ : Interferon- $\gamma$   
IKK: Cinasa I $\kappa$ B  
IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$   
IL-8: Interleucina-8  
IRAK: Cinasa asociada al receptor de interleucina-1  
IRF: Factor regulador de interferon  
JNK: Cinasa terminal-N c-Jun  
LBP: Lipopolisaccharide binding protein.  
LFA-1: Ligando para la función linfocítica asociada con el antígeno 1.  
LO: Lipoxigenasa  
LPS: Lipopolisacárido  
LRR: Repeticiones ricas en Leucina  
LTA: Ácido lipoteicoico  
MAPKKK: Cinasa cinasa MAPK  
MD-2: Antígeno linfocítico 96  
MMP: Metaloproteinasas  
MyD88: Factor de diferenciación mieloide 98  
NF- $\kappa$ B: Factor nuclear- $\kappa$ B  
NO: Óxido nítrico  
OPNi: Precursor de osteopontina  
p38: MAP cinasa p38  
pDC: Células dendríticas plasmocitoides  
PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGs: Prostaglandinas  
PIP<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato  
PKC: Proteína cinasa C  
PMNs: Células polimorfonucleares  
RHIM: Motivo de interacción homotípica Rip

siRNA: ARN pequeños inhibidores  
ssRNA: ARN de cadena sencilla  
TAB2: Proteína de unión a TAK1  
TAK1: Cinasa activada 1.  
TBK1: Proteína cinasa serina/treonina 1  
TGF $\beta$ : Factor de crecimiento transformante- $\beta$   
TIMP: Inhibidores de metaloproteinasas  
TIR: Dominio homólogo al receptor IL-1/Toll  
TIRAP: Proteína adaptadora contenida en el dominio del receptor de IL-1/Toll  
TLR: Toll like receptor  
TNF: Factor de necrosis tumoral  
TRAF: Factor asociado con el receptor de TNF  
TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF  
TRIF: Dominio que contiene el adaptador inductor de IFN- $\beta$   
Ubc13: Enzima Ubiquitina Conjugada 13  
Uev1A: Variante de enzima de conjugación de ubiquitina