



Universidad Autónoma del Estado de México

**INMUNOEXPRESIÓN DE ERK, JNK, p38 E I κ B α A NIVEL
INTESTINAL POR LA INGESTA CRÓNICA DE EDULCORANTES
COMERCIALES Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO PERIODONTAL
EN RATONES DE LA CEPA BALB/c**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA

P.C.D CARLOS MANUEL ABASCAL SHERWELL SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. IRAZÚ CONTRERAS GARCÍA



TOLUCA, MÉXICO.

OCTUBRE, 2017

FO

Facultad de Odontología

"Todo está conectado, pero lo genial es encontrar la conexión"

Sidney Parnes

"Existir es cambiar; cambiar es madurar; madurar es recrearse por siempre..."

Henri Bergson

Para mi madre y mi hermana. Por ser mi fuerza, mi apoyo, y mi más grande fuente de inspiración. Gracias por la vida que me han dado la oportunidad de vivir.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	6
1.- INTRODUCCIÓN.....	7
2.- ANTECEDENTES.....	8
2.1.- Edulcorantes.....	8
2.1.1.- Generalidades y clasificación.....	8
2.1.2.- Sacarosa.....	10
2.1.3.- Sucralosa.....	10
2.1.4.- Stevia.....	12
2.2.- MAP cinasas (MAPK).....	13
2.2.1.- Clasificación y funciones biológicas.....	13
2.2.2.- ERK.....	15
2.2.3.- p38.....	16
2.2.4.- JNK.....	18
2.3.- NF- κ B.....	19
2.3.1.- Funciones biológicas.....	20
2.4.- Enfermedad periodontal y vías de señalización pro-inflamatorias.....	21
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4.- HIPÓTESIS.....	25
4.1.- Hipótesis alterna.....	25
4.2.- Hipótesis nula.....	25
5.- JUSTIFICACIÓN.....	26
6.- OBJETIVO GENERAL.....	27

7.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
8.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
8.1.- Diseño de estudio.....	28
8.2.- Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	28
8.3.- Procedimientos.....	28
8.3.1.- Sacrificio de los ratones.....	29
8.3.2.- Extracción de proteínas totales de tejido.....	29
8.3.3.- Cuantificación de proteínas.....	29
8.3.4.- Ensayo de Western Blot.....	30
8.3.4.1.- Preparación de geles de acrilamida y buffer de corrida.....	30
8.3.4.2.- Electroforesis.....	30
8.3.4.3.- Transferencia húmeda de la membrana.....	30
8.3.4.4.- Bloqueo de la membrana.....	30
8.3.4.5.- Incubación con anticuerpos.....	31
8.3.4.6.- Inmunodetección (relevado de la membrana).....	31
8.3.5.- Extracción y fijación de tejidos bucales.....	31
8.3.6.- Descalcificación tisular con EDTA.....	31
8.3.7.- Procesamiento de tejidos: deshidratación, aclaramiento e infiltración.....	32
8.3.8.- Inclusión en parafina.....	32
8.3.9.- Microtomía.....	32
8.3.10.- Tinción con hematoxilina y eosina.....	33
8.3.11.- Obtención de imágenes por microscopía.....	33
9.- RESULTADOS	34

9.1.- Vías de señalización.....	34
9.2.- Hallazgos histopatológicos.....	34
10.- DISCUSIÓN.....	41
11.- CONCLUSIONES.....	44
12.- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	44
13.- REFERENCIAS.....	45
14.- ANEXOS.....	48

RESUMEN

La obesidad es un problema de salud pública asociado con alto consumo de alimentos de alto contenido energético, que predispone a comorbilidades crónico-degenerativas. Una estrategia para su prevención con respuesta favorable del consumidor ha sido la introducción de edulcorantes no nutritivos a la dieta. La falta de evidencia sobre las interacciones moleculares entre edulcorantes y mucosas después del consumo crónico, ha generado hipótesis que afirman la relación de la sucralosa con la elevada prevalencia de enfermedad inflamatoria intestinal en países desarrollados.

Objetivos: Establecer un perfil de interacciones moleculares posterior al consumo crónico de edulcorantes no nutritivos en ratones BALB/c, y determinar sus efectos a nivel molecular sobre el epitelio intestinal y tejido periodontal.

Material y Métodos: Estudio experimental prospectivo con ratones BALB/c, que evaluó inmunoexpresión de proteínas totales y fosforiladas de ERK, JNK, p38 e I κ B α en mucosa duodenal de ratones de 8 semanas de edad expuestos a consumo crónico de edulcorantes no nutritivos. Se extrajeron maxilares superiores de cada ratón para evaluar cambios histopatológicos relacionados con el consumo crónico de edulcorantes.

Resultados: El análisis densitométrico de bandas de Western Blot en ratones machos y hembras, mostró incremento de la expresión de proteínas totales y fosforiladas de ERK, JNK, p38 en ratones suplementados con sucralosa y glucósido de esteviol, en comparación con los grupos control. El análisis estadístico semicuantitativo de unidades arbitrarias densitométricas no mostró diferencias significativas. El estudio histopatológico mostró aumento de la celularidad, aumento de vascularidad y agrupamiento celular en la periferia del órgano dentario en los grupos expuestos a sucralosa y glucósido de esteviol.

Conclusiones: El presente estudio evidenció que el consumo crónico de estas sustancias genera posibles cambios pro-inflamatorios a nivel intestinal, basados en la tendencia a la alta en la expresión de ERK, JNK, p38 e I κ B α totales y fosforiladas y cambios celulares a nivel periodontal.

1.- INTRODUCCIÓN

La obesidad representa un problema de salud a nivel mundial, cuya prevalencia e incidencia continúa en aumento. Hoy en día, México ocupa el segundo lugar de prevalencia mundial de obesidad, después de Estados Unidos de América. Estas cifras representan un problema de salud pública prioritario que exige la puesta en marcha de una política nacional que reconozca el origen multifactorial del problema (Secretaría de Salud y Asistencia, 2013). Muchos factores se encuentran asociados dentro de su complejidad, pero no existe duda de que uno de los factores fundamentales en su patogenia se encuentra representado por la ingesta de alimentos con alto contenido energético. Reconocida como uno de los factores con mayor contribución al desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles, el manejo de la obesidad repercute enormemente sobre los gastos destinados a la salud en los países desarrollados. Es por ello que se requiere la planeación de nuevas estrategias preventivas y terapias con mayores beneficios y menores costos económicos, que permitan una reducción efectiva y segura del peso corporal. Es evidente que las soluciones más viables deben ser encontradas, y los enfoques dietéticos serán fundamentales. Dentro de estos enfoques dietéticos, uno de ellos es el uso de edulcorantes no calóricos que fungan como sustitutos de azúcar, y le permiten a los consumidores disfrutar de sus alimentos sin los efectos adversos de su consumo. Sin embargo, la ingesta crónica de edulcorantes es un tema de preocupación en la comunidad médica, debido a la falta de conocimiento sobre las interacciones celulares y moleculares que se generan asociada a su ingesta, y su posible relación con el desarrollo de estados inflamatorios crónicos que puedan predisponer al individuo al desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. Por otro lado, la ingesta de edulcorantes es una herramienta actual utilizada por servidores de la salud bucodental para la prevención de la caries dental, aunque desde el punto de vista periodontal, no se han observado los efectos que estos puedan tener sobre las estructuras de soporte periodontal. Por ello vamos a describir a detalle la definición de edulcorantes, los diferentes tipos disponibles, sus características, y la evidencia disponible sobre su posible participación en estados mórbidos a nivel intestinal y periodontal. De igual forma, analizaremos a detalle las vías de señalización de las MAP cinasas y el factor de transcripción NF- κ B, que se abordará más adelante en el diseño experimental y que se cree que pueden estar implicadas en las interacciones de los edulcorantes con las células del organismo, activando procesos biológicos fundamentales para la salud y la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1.- Edulcorantes

2.1.1.- Generalidades y Clasificación

Como resultado de los efectos negativos sobre la salud relacionadas con el consumo de azúcar, se ha incrementado el consumo de edulcorantes no nutritivos como una alternativa preventiva y terapéutica ante el aumento de peso relacionado con las dietas hipercalóricas. El consumo de comidas que contienen edulcorantes no nutritivos ha incrementado en personas de todas las edades, estimando que un 28% de la población general los consume (Shankar *et al.*, 2013).

Actualmente, están disponibles una gran cantidad de edulcorantes, que se clasifican en: edulcorantes de alta-intensidad, bajos en calorías, de alta potencia y no nutritivos (Shankar *et al.*, 2013). Se sabe que estas sustancias son 30 a 13,000 veces más dulces que el azúcar de mesa (sacarosa) (**Tabla 1**). Esta capacidad le permite a los fabricantes la adición de pequeñas cantidades de estos a productos de consumo cotidiano y que son distribuidos como productos “libres de azúcar” o “sin calorías” (Shankar *et al.*, 2013). El principio fundamental del incremento en el consumo de edulcorantes es que los individuos con sobrepeso u obesidad pueden disfrutar diferentes comidas y bebidas sin el riesgo de ingerir calorías adicionales.

Desde su descubrimiento a principios del siglo XIX y su introducción al mercado en los años 50 y 60, ha surgido un gran debate respecto a sus beneficios y efectos adversos sobre la salud (Shankar *et al.*, 2013). La primera evidencia que refiere efectos de los edulcorantes sobre la salud, fue observada por la FDA (*Food and drug administration*) en 1970 después de la prohibición de un sustituto de azúcar de uso muy difundido llamado ciclamato, el cual demostró tener efectos carcinogénicos después de varios estudios en modelos animales (Weihrauch, 2004). Independientemente de los avances tecnológicos, la información científica sobre la seguridad de los edulcorantes y las cantidades establecidas como inofensivas para el consumo humano es escasa (Shankar *et al.*, 2013). La Academia de Dieta y Nutrición de EUA recomienda los edulcorantes no nutritivos para mejorar la palatabilidad de los alimentos, como apoyo a los consumidores en el aumento del consumo de ciertos alimentos que deben incluir en sus rutinas dietéticas (Shankar *et al.*, 2013). Para determinar mejor los efectos de los edulcorantes no nutritivos en la homeostasis de la glucosa, un estudio reciente investigó los efectos a corto plazo de la sucralosa en la homeostasis de la glucosa y el estado de hambre, comparada con agua, sucrosa y sucrosa combinada con sucralosa en preparación líquida. La cantidad de sucralosa usada en el estudio fue aproximada a la que se utiliza en refrescos comerciales convencionales. Se concluyó que la sucralosa puede ser un edulcorante inerte en lo que se refiere a evocación de señales de hambre y homeostasis de la glucosa en plazos cortos (Shankar *et al.*, 2013). Los edulcorantes no nutritivos sólo ayudarán a la pérdida

de peso si no hay ingesta compensatoria de azúcares y también es de preocupación su posible efecto en promover el apetito.

Nombre químico	Dulzura comparada con sacarosa al 5%	Tipo de edulcorante
Sacarosa	1	Edulcorante prototipo
Acesulfame-K (C ₄ H ₄ KNO ₄ S)	140x	Edulcorante de alta intensidad
Aspartamo (C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅)	200x	Edulcorante no calórico
Neotame (C ₂ OH ₃ ON ₂ O ₅)	11,000x	Edulcorante artificial
Rebaudiósido A (Stevia) (C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃)	250x	Edulcorante no calórico
Sacarina (C ₇ H ₅ NO ₃ S)	450x	Edulcorante no calórico
Sucralosa (C ₁₂ H ₁₉ Cl ₃ O ₈)	600x	Edulcorante muy intenso

Tabla 1. Tipos de edulcorantes no nutritivos y dulzura comparada con sacarosa. Modificado de Brown RJ, Rother KI. Non-Nutritive Sweeteners and their Role in the Gastrointestinal Tract. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2012 Aug;97(8):2597–605.

El manejo de la obesidad es multifactorial y no existe suficiente evidencia para identificar al uso de edulcorantes no nutritivos como una estrategia en el control de peso. Otros factores genéticos y asociados con el estilo de vida, pueden confundir

las influencias que promueven el aumento de peso corporal. De todos los alimentos ricos en calorías, pudiera ser que el consumo de alimentos y bebidas endulzadas pueden tener el mayor efecto adverso sobre la expresión de patrones genéticos relacionados con la obesidad.

2.1.2.- Sacarosa

La sacarosa, también llamada azúcar común o azúcar de mesa, es un disacárido formado por alfa- glucopiranos y beta- fructofuranosa. Cuando se digiere la sacarosa o cuando se la coloca en un medio ácido tiene un 50% de glucosa y un 50% de fructosa. El azúcar de mesa es el edulcorante más utilizado para endulzar los alimentos y suele ser sacarosa. En la naturaleza se encuentra en un 20 % del peso en la caña de azúcar y en un 15 % del peso de la remolacha azucarera, de la que se obtiene el azúcar de mesa. La miel también es un fluido que contiene gran cantidad de sacarosa parcialmente hidrolizada (Macdonald, 2016). Como se ha puntualizado previamente, existe un incremento en el interés sobre la posible asociación del alto consumo de azúcares refinadas con efectos nocivos sobre el metabolismo que incrementen el riesgo de enfermedad cardiovascular, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo II. A pesar de que la atención se ha enfocado en la sacarosa y la fructosa, se ha observado en ensayos aleatorizados que cualquier impacto sobre la salud parece ser un efecto relacionado con azúcares en general, más que específicamente un efecto relacionado directamente con la fructosa. Se ha sabido desde al menos 80 años que una baja ingesta de carbohidratos con alto consumo de grasas se asocia con una pobre tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Actualmente la mayor preocupación se enfoca en las azúcares de la dieta, y cómo el exceso en su consumo como una proporción del total de carbohidratos, puede llevar a la resistencia a la insulina e incrementar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo II. Desde hace muchos años se ha tenido la preocupación de los riesgos sobre la salud que representa la sacarosa y su componente, la fructosa. Uno de los mayores críticos de la sacarosa en la dieta fue John Yudkin, quien en su libro *“Pure, white and deadly”*, resumió la información científica disponible en los años sesenta y principios de los setenta y promovió su opinión expresada en el título del libro de que la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas fueron aportadas por un alto consumo de sacarosa (Macdonald, 2016). En tiempos recientes, la principal preocupación del consumo de fructosa es que su metabolismo promueve la síntesis hepática de lípidos y debido a que es metabolizada independientemente de la acción de la insulina en el hígado y cualquier localización, puede permitir la excesiva formación y deposición de grasa, resistencia a la insulina y otros componentes del síndrome metabólico (Macdonald, 2016).

2.1.3.- Sucralosa

Es un disacárido sintético que se forma por el reemplazo de tres grupos hidroxilo por átomos de cloro. El compuesto resultante es 600 veces más dulce que la

sacarosa. Fue descubierto en 1976, y en 1998 se le concedió la aprobación de la FDA para su uso como sustituto de azúcar en 15 categorías de alimentos y bebidas. Se distribuye con el nombre comercial de Splenda®, tiene un perfil de sabor muy similar al azúcar, y no provoca sabor desagradable después de su ingesta, que es un rasgo que se encuentra en muchos otros edulcorantes no nutritivos.

Splenda® es una combinación de sucralosa y maltodextrina (1% y 99% de peso seco respectivamente). Estudios con sucralosa radiomarcada han confirmado que aproximadamente el 85% de la sucralosa es eliminada sin modificación por las heces. El 15% restante, después del consumo por vía oral, es absorbido. La mayor parte se excreta en la orina, pero metabolitos menores, principalmente resultantes de la glucuronidación y no productos del metabolismo, también se encuentran presentes en la orina. Estos metabolitos representan 2-3% del consumo oral total (Spencer *et al.*, 2016). Ambos, la sucralosa (no modificada) y los conjugados glucuronizados son excretados en la orina sin bioacumulación. Su preferencia, comparada con otros edulcorantes está dada por su estabilidad en calor, estabilidad en un amplio rango de condiciones de pH, y su solubilidad en etanol, metanol y agua. La FDA recomienda un consumo diario aceptable de sucralosa de 5 mg/Kg/día (Spencer *et al.*, 2016; Abou-Donia *et al.*, 2008).

Diversos estudios han establecido un perfil de seguridad en su consumo, lo cual le permite ser usado en todos los grupos de edad, incluso durante el embarazo (Shankar *et al.*, 2013). Se encuentra en más de 4,000 productos de EUA y es usado como edulcorante en más de 80 países. A diferencia del azúcar de mesa, no promueve la incidencia de caries dental, y es por esto que en el año 2006 la FDA aprobó la difusión de su efecto anticariogénico (FDA, HHS, 2006). El perfil de seguridad de la sucralosa ha sido ampliamente revisado, y se ha reportado la carencia de efectos carcinogénicos y genotóxicos. Gracias a su falta de biorreactividad y acumulación en modelos humanos y animales, su uso a largo plazo es considerado como seguro (Shankar *et al.*, 2013).

Un estudio en particular refiere efectos adversos por el consumo de edulcorantes. Resultó controversial al encontrar efectos adversos en el tracto digestivo como consecuencia del consumo de Splenda®. Ratas alimentadas con Splenda® por doce semanas tuvieron un decremento significativo en la microbiota intestinal benéfica con repercusiones inmediatas como ganancia de peso, incremento del pH fecal por disminución de la producción de ácidos grasos de cadena corta por bacterias colónicas e incrementando la expresión de citocromos CYP3A4 y CYP2D1, lo cual puede afectar la biodisponibilidad de fármacos y nutrientes. Los hallazgos histopatológicos no se observaron en el grupo control, estos incluyeron infiltración linfocítica en epitelio intestinal, depleción leve de las células caliciformes, desorganización glandular, dilatación vascular con presencia de linfocitos intravasculares y cambios histopatológicos aparentemente relacionados con la edad como pérdida de mucina superficial, aunque estos últimos también se presentaron durante la recuperación en todos los grupos incluyendo controles. Agregado a ello, estos efectos ocurrieron incluso cuando las ratas fueron

alimentadas con sucralosa a dosis de 1.1 mg/Kg, que son dosis más bajas de las aprobadas por la FDA para el consumo humano (5 mg/Kg) (Abou-Donia *et al.*, 2008). Estos resultados fueron severamente criticados por un panel de expertos, quienes reportaron que el estudio es “deficiente en diferentes áreas críticas” y carece de “rigurosidad científica” (Brusick *et al.*, 2009).

El consumo de sucralosa por pacientes diabéticos se considera seguro debido a que no tiene efecto sobre el metabolismo de los carbohidratos. No modifica la tasa de absorción de glucosa en el intestino delgado, ni incrementa la respuesta glicémica a los niveles de hormonas incretinas como el péptido similar a glucagón-1 y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa en pacientes sanos después de infusión intraduodenal o intragástrica (Ma *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010). Así mismo, no estimula la secreción de insulina ni el llenado gástrico lento, manteniendo la normalidad en el metabolismo de la glucosa en la población estudiada (Ma *et al.*, 2009).

Se han reportado efectos directos sobre la salud por el consumo de sucralosa. Estudios de caso han identificado a la sucralosa como agente desencadenante de migraña (Hirsch, 2007; Patel *et al.*, 2006). Por otro lado, en un reporte hipotético sugiere que la sucralosa es el posible culpable en el incremento de la incidencia de enfermedad inflamatoria intestinal en canadienses por su acción inhibitoria sobre bacterias intestinales, función de barrera intestinal y proteasas digestivas (Qin, 2011). Dado el altísimo consumo mundial de sucralosa y su presencia en miles de productos alimentarios, en este mismo reporte, se hace un llamado para el estudio de la posible relación entre el consumo de sucralosa y el aumento en la incidencia de enfermedad inflamatoria intestinal, antes de que sea demasiado tarde (Qin, 2011).

2.1.3.- Stevia

Edulcorante natural, es un glucósido aislado de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni* y ha sido usado exitosamente en Japón como agente endulzante por más de 20 años (Chan *et al.*, 2000). Incluye varios compuestos con sabor dulce, con mayor cantidad de esteviósido y rebaudiósido A (Sclafani *et al.*, 2010). En el año 2000 se sugirió a stevia como una opción terapéutica en el tratamiento de la hipertensión arterial, después de demostrar sus efectos hipotensores, aunado a posibles incrementos de la sensibilidad a insulina y tolerancia a la glucosa (Chan *et al.*, 2000). Algunos estudios sugieren que los efectos hipotensores de stevia pueden ir asociados con incremento en la actividad de prostaglandinas (Chan *et al.*, 2000).

El consumo de stevia disminuye los niveles de insulina comparado con aspartame y sucrosa, sugiriendo que el uso de este en lugar de sacarosa podrá ser una manera de manejar la ingesta alimentaria y la saciedad (Anton *et al.*, 2010). Un estudio del 2010 reportó que individuos que consumen stevia tienen menor respuesta posprandial de la glucosa, comparados con aquellos que consumen aspartame y sucrosa. Estos hallazgos sugirieron vías promisorias para fabricantes

y compradores que compran y consumen productos con edulcorantes artificiales para el combate contra la obesidad y Diabetes Mellitus tipo II (Anton *et al.*, 2010).

A pesar de los datos disponibles sobre la seguridad de la ingesta de edulcorantes no nutritivos, es de preocupación la falta de información sobre sus interacciones moleculares a nivel intestinal, lo cual, como se mencionó previamente respecto al aumento en la incidencia de enfermedad inflamatoria intestinal en canadienses, puede ser un cabo suelto en la bioseguridad de estos productos. Debido a que las reacciones pro-inflamatorias en cualquier nivel orgánico son el resultado de interacciones moleculares que abarcan las vías de las MAP cinasas y NF- κ B, describiremos a detalle sus mecanismos de acción y funciones biológicas conocidas para integrarlas con el consumo de edulcorantes no nutritivos y sus efectos sobre el organismo a nivel intestinal y periodontal.

2.2.- MAP Cinasas (MAPK)

Ante la gran diversidad de estímulos extracelulares, las células requieren un modelo de respuesta que les permita llevar a cabo su función biológica y asegurar su supervivencia. Algunos de estos estímulos son los cambios ambientales incluyendo la respuesta a estímulos hormonales, estrés, mitógenos, cambios de temperatura, presión osmótica, entre muchos otros. La respuesta a esta amplia variedad de estímulos es mediada a través de la activación de factores de transcripción, los cuales inducen las respuestas celulares necesarias. Sin embargo, muchos agentes extracelulares no tienen la capacidad de atravesar la membrana celular para lograr la activación de los genes necesarios para emitir una respuesta. En vez de ello, estos agentes utilizan líneas de comunicación intracelulares, conocidas como vías de señalización, para transmitir sus señales a diversos blancos citoplasmáticos y nucleares. En muchos casos, estas vías operan a través de fosforilaciones secuenciales denominadas cascadas de proteínas cinasas. Este tipo de señalización, como veremos a continuación, es utilizado por la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (*mitogen-activated protein kinases; MAPK*). Entre otros, estas cascadas responden a diversos estímulos extracelulares y regulan varios procesos como proliferación celular, diferenciación, respuesta celular al estrés, y apoptosis (Keshet *et al.*, 2010).

2.2.1.- Clasificación y funciones biológicas

Las vías de señalización de las proteínas MAPK son módulos de señalización conservados en el proceso evolutivo, que juegan un papel fundamental en la transducción de señales extracelulares en respuestas intracelulares.

Las cascadas de señalización de MAPK han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas, y ha sido demostrada su función en diversos tipos celulares y condiciones biológicas. La transmisión de señales de estas cascadas, generalmente son iniciadas por la activación de una proteína G (usualmente la proteína Ras), o activando interacciones corriente arriba de la cascada por

proteínas adaptadoras (**Figura 1**). Posteriormente, las señales son transmitidas corriente abajo por proteínas cinasas citosólicas organizadas en tres o cinco niveles. Las cinasas en cada nivel fosforilan y activan las cinasas locales del nivel siguiente para permitir una rápida y regulada transmisión de la señal a varios blancos de la cascada. Tres de estos niveles, MAPKKK, MAPKK y MAPK son considerados como centrales, mientras que el nivel corriente arriba (MAPKKKK) y el nivel corriente abajo (MAPKAPK) no son siempre necesarios para la difusión de la señal (Keshet *et al.*, 2010).

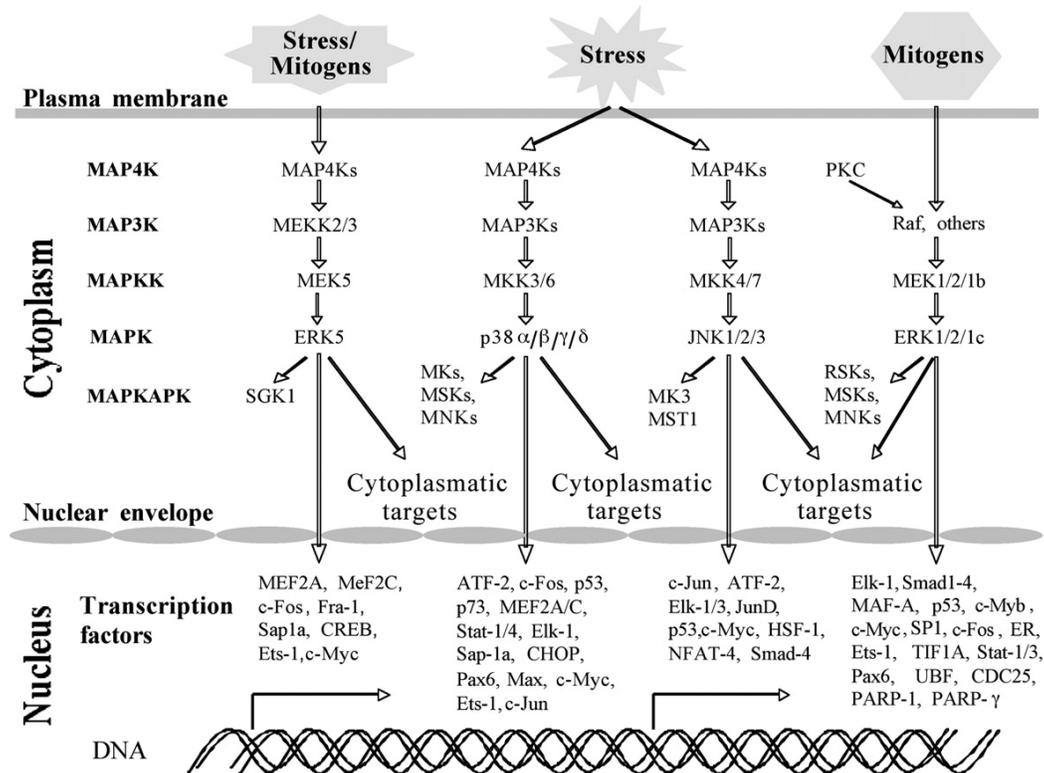


Figura 1. Representación esquemática de las cuatro vías mejor caracterizadas de MAPK. Tomado de: Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011 Sep;1813 (9):1619–33.

En mamíferos se han caracterizado 14 genes de MAPK que definen siete diferentes vías MAP. Las mejores caracterizadas de estas son la cinasa 1 reguladora de señal extracelular (ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinase 1*), la cinasa 1 c-Jun NH₂-terminal (JNK1, c-Jun NH₂-terminal kinase 1) 2/3, las vías p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ (Saba-El-Leil *et al.*, 2016) y ERK5 (Keshet *et al.*, 2010). Estas fueron denominadas de acuerdo a los componentes presentes en su nivel MAPK (**Figura 1**).

Cada una de las cascadas puede regular procesos celulares muy diferentes, y algunas veces superpuestos que difieren en sus actividades fisiológicas. ERK1/2

juega un rol importante en la proliferación y diferenciación celular, JNK y p38 son cascadas activadas en respuesta al estrés celular, y por ello sus componentes MAPK son denominadas proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs, *stress-activated protein kinases*); de igual forma, ERK5 parece responder a ciertos estímulos estresantes como señales mitogénicas (Keshet *et al.*, 2010). No obstante, dependiendo de la línea celular y el estímulo, las diferentes cascadas pueden regular funciones no canónicas e incluso opuestas. Por ejemplo, en raras ocasiones, ERK1/2 puede participar en la respuesta al estrés y apoptosis, mientras que JNK puede mediar la proliferación. La activación conjunta de las cascadas MAPK por una gran variedad de estímulos, indica que estas son importantes reguladores de esencialmente todos los procesos celulares estimulados e inducidos por señal extracelular. La mala regulación de las cascadas puede abrir paso a enfermedades como el cáncer, diabetes y activación de la respuesta inmune con su manifestación inflamatoria (Keshet *et al.*, 2010). Es por ello que el mejor entendimiento de la señalización y regulación de MAPK puede resultar en el diseño de mejores estrategias para el combate de enfermedades relacionadas con su alteración.

2.2.2.- ERK

La cascada ERK es activada por una variedad de agentes extracelulares, incluyendo factores de crecimiento, hormonas y factores estresantes que inducen procesos celulares que incluyen proliferación y diferenciación celular. Los factores extracelulares actúan a través de receptores tirosina cinasa (RTK, *tyrosine kinases receptors*), receptores acoplados a proteína G (GPCR, *G-protein coupled receptors*) y canales iónicos, entre otros. Estos receptores membranales transmiten la señal a la cascada ERK por una plétora de procesos de señalización, que en muchos casos involucra el reclutamiento de proteínas adaptadoras como Shc o Grb2 a los receptores activados o sus proteínas efectoras (Keshet *et al.*, 2010). Posteriormente, los adaptadores dirigen factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs, *guanine nucleotides exchange factors*) a las pequeñas proteínas de unión a GTP unidas a la membrana (Ras, Rap), realizando la conversión a su forma activa unida a GTP. Esto permite la transmisión de señal a los componentes del nivel MAPK3, los cuales son en su mayoría cinasas Raf (Raf-1, B-Raf y A-Raf), aunque también se han encontrado otros componentes, pero que operan en sistemas diferentes y muy particulares, con diferentes modos de regulación. Desde el nivel MAP3K, la señal es transmitida cascada abajo a través de los componentes de MAPKK, denominados MAPK/ERKinasas 1,2 (MEK1/2). Estos componentes MAPKK son activados a través de la fosforilación de residuos de serina en los motivos Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr en el bucle de activación de MEK (Ser 218 y 222 en MEK humana). Las MEKs son cinasas duales que han mostrado selectividad única hacia ERKs en el nivel MAPK (Keshet *et al.*, 2010). Se han aislado dos genes que codifican las ERKs, designados como ERK1 (MAPK3) y ERK2 (MAPK1). Estos codifican dos proteínas, p44 y p42, respectivamente. La activación de ERKs es mediada por la fosforilación de residuos Tyr y Thr por MEK, en el bucle de activación del motivo Thr-Glu-Tyr (Thr183 y Thr185 en ERK2 humana). Estas son Ser/Thr cinasas que fosforilan

cientos de sustratos en el citoplasma o en el momento de la translocación en el núcleo (Keshet *et al.*, 2010). La gran mayoría de los sustratos de ERKs son proteínas reguladoras incluyendo una o más MAPKAPKs. El nivel MAPKAPK incluye la cinasa ribosomal S6 (RSK), la cinasa activada por MAPK/SAPK (MSK), las cinasas 1 y 2 de señal asociada con MAPK (MNK1/2) y MAPKAP3/5, aunque las últimas también pueden ser activadas por p38. Finalmente, las proteínas cinasa como GSK3 y LKB1 han sido identificadas como sustratos de MAPKAPKs, pero no son consideradas como componentes integrales de la cascada (Keshet *et al.*, 2010).

Análisis *in vivo* de ratones mutados por ingeniería genética sugieren que ERK1 y ERK2 tienen funciones importantes en tejidos específicos. La inactivación de *erk2* durante el desarrollo de la cresta neural promueve anomalías craneofaciales y defectos cardíacos conotruncales, los cuales se exacerban con la depleción adicional de *erk1* (Saba-EI-Leil *et al.*, 2016). De manera similar, la deficiencia de *erk1* mejora el fenotipo anormal de neurogénesis en ratones knockout *erk2* específicos del sistema nervioso central. La depleción de los genes *erk1* y *erk2* en células hematopoyéticas acoplada con estudios de reconstitución con ERK1 y ERK2 catalíticamente activos o inactivos, también reveló que ERK1 y ERK2 desempeñan funciones cinasa dependientes en el mantenimiento de células madre hematopoyéticas y en la hematopoyesis en adultos (Saba-EI-Leil *et al.*, 2016).

2.2.3.- p38

La cascada de MAPK p38 participa en respuestas celulares al estrés y en procesos como la respuesta inmune e inflamatoria. La actividad de esta cascada es inducida por varios factores estresantes y ligandos que operan en diferentes receptores, incluyendo receptores relacionados con apoptosis, GPCRs y RTKs. Adicionalmente, algunos de los estresantes físicos como calor y shock osmótico, que son algunos de los mejores activadores de la cascada de p38, muchas veces operan a través de maquinaria celular independiente de receptor que requiere cambios en la fluidez membranal u otros sistemas especializados de señalización.

Posteriormente, de manera muy similar a como lo mencionamos previamente con la cascada ERK, las señales son transmitidas por inducción de una compleja red de moléculas de señalización que resulta en la activación de pequeñas GTPasas como Rac y CDC42, o en algunas ocasiones por interacción con proteínas adaptadoras (Keshet *et al.*, 2010). Estos dos procesos inducen la activación de proteínas cinasas en el nivel MAPK4 o directamente en MAP3K de la cascada de p38 (**Figura 1**) (Keshet *et al.*, 2010). Los componentes de esta cascada son muy similares a aquellos presentes en la cascada JNK. En la cascada p38, las cinasas del nivel MAP3K son activadas por pequeñas GTPasas, pero como ya mencionamos, en algunas condiciones pueden hacerlo MAP4Ks o activarse directamente por proteínas adaptadoras. El largo número de cinasas en MAP3K transmiten sus señales a un número más pequeño de MAPKKs, fosforilándolas en residuos Ser y Thr en el motivo Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr del bucle de activación.

Las principales MAPKK de la vía p38 son MKK6 y MKK3, aunque MKK4 y MKK7 también pueden estar involucradas (Keshet *et al.*, 2010).

El siguiente nivel de la vía está compuesto por los productos de cuatro genes MAPKs. Estos incluyen: p38 α (SAPK2a), p38 β (SAPK2b), y p38 γ y δ . Los genes de p38 expresan varias alternativas de formas empalmadas, llevando el número de isoformas del grupo a diez, todas las cuales son activadas por fosforilación de los residuos Tyr y Thr en el motivo Thr-Gly-Tyr del bucle de activación (Thr180 y Tyr182 de p38MAPK α humana). A pesar de que alrededor del 60% de p38s comparten mecanismos de activación y especificación de sustratos, la identidad diferente de sus secuencias y la sensibilidad a inhibidores indican que pueden subdividirse en dos grupos: p38 α + p38 β y p38 γ + p38 δ . No obstante, no está claro si estos subgrupos tienen funciones fisiológicas diferentes (Keshet *et al.*, 2010).

Una vez que estas p38 han sido activadas, transmiten una señal a los componentes del nivel MAPKAPK, estos son MAPKAPK2, MAPKAPK3, MANK1/2, MSK1/2 y MK5/PARK, o moléculas reguladoras de fosforilación como PLA₂, proteínas de choque térmico, factores de transcripción ATF2, ELK1, CHOP, MEF2C, entre otros. A diferencia de ERK1/2, las p38 pueden encontrarse en núcleo y citoplasma, y su translocación después del estímulo parece ser unidireccional.

El grupo de Ángel Nebreda del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas en Madrid, España usó una combinación de abordajes genéticos para contestar la pregunta de la especificidad de las isoformas de p38 α y p38 β . Su trabajo sugiere un rol específico de p38 α en el desarrollo placentario después de observar defectos placentarios resultantes de la deficiencia de p38 α que no podía ser rescatado mediante la expresión de un alelo *knock-in* de p38 bajo el control transcripcional del promotor de p38 endógeno. Por otro lado, varios fenotipos embrionarios incluyendo defectos en el desarrollo cardiaco, espina bífida, y anencefalia fueron observados en embriones con deficiencia compuesta de p38 α y p38 β , pero estuvieron ausentes en deficiencias génicas individuales, indicando que las dos isoformas pueden compensar el defecto de la otra en estas situaciones (del Barco Barrantes *et al.*, 2011). Estos resultados mostraron funciones superpuestas de ambas isoformas, sugiriendo roles funcionales de ambas.

Los otros dos miembros de MAPK p38 también exhiben funciones solapadas. La deficiencia génica de una isoforma p38 γ o p38 δ no altera el fenotipo en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la disrupción de ambas isoformas dio a conocer un papel clave en regeneración tisular, respuesta inmune innata, inflamación y tumorigénesis. El papel de p38 γ y p38 δ en la respuesta inflamatoria fue documentado en varios modelos experimentales en ratones como shock séptico inducido por lipopolisacáridos, falla hepática aguda y modelos de artritis inducida por colágeno; asimismo, en modelos de cáncer asociado con inflamación crónica como cáncer asociado a colitis y carcinogénesis química cutánea de dos pasos (del Barco Barrantes *et al.*, 2011).

2.2.4.- JNK

La cascada JNK tiene un rol importante en la respuesta a citocinas, respuesta celular al estrés ambiental, en inducir apoptosis, y se ha definido como específico de estímulo y de tejido (Weston *et al.*, 2007), y se sospecha su función en muchos otros procesos celulares aún no dilucidados. Al igual que la vía de p38, esta cascada responde a receptores relacionados con estrés y apoptosis, GPCRs y RTKs. Estos receptores o los cambios membranales independientes de receptor e inducidos por estrés, transmiten la señal a proteínas adaptadoras que por sí solas pueden inducir la activación de las cinasas del nivel MAP4K, y algunas veces del MAP3K de la cascada JNK.

Alternativamente, los receptores membranales pueden activar una red de interacciones protéicas que eventualmente inducirán la activación de proteínas adaptadoras (TRAF) o la activación de pequeñas GTPasas (Rac, CDC42). Estos dos procesos transmiten la señal activando a MAP4K, o algunas veces directamente al nivel de cinasas MAP3K. Las cinasas en el nivel MAP4K incluyen a GCK, GLK, GCKR, HOK y otras cinasas parecidas a Ste20, las cuales son compartidas con la vía p38 y pueden fosforilar y activar las cinasas en el nivel MAP3K. De nuevo, la mayoría de las MAP3Ks con compartidas con la vía p38, aunque ASK2, LZK1, MLK1 y MEKK4 han sido reportadas como exclusivas de la cascada JNK (Keshet *et al.*, 2010). Posteriormente, las MAP3Ks activadas transmiten la señal a cinasas del nivel MAPKK, que son MKK4 y MKK7. MKK7 parece expresar un número particularmente grande de isoformas empalmadas con diferentes actividades. Como las otras MAPKKs, MKK4 y MKK7 con activadas por fosforilación del motivo Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr (Ser198, Thr202 en MKK7), y se vuelven capaces de transmitir la señal al nivel JNK. Tres genes (JNK1-3, SAPK1s) codifican las proteínas JNK que son traducidas de un total de diez alternativas de transcritos de JNK empalmados (Keshet *et al.*, 2010). Todas estas son traducidas en proteínas de 46 o 54 kDa. Las JNKs p46 pequeñas son JNK1 α 1, JNK1 β 1, JNK2 α 1, JNK2 β 1 y JNK3 α 1. Las proteínas p54 son JNK1 α 2, JNK1 β 2, JNK2 α 2, JNK2 β 2 y JNK3 α 2. El bucle de activación de las JNK contiene un residuo Pro en la posición Xaa del motivo Thr-Xaa-Tyr, y como con las otras MAPKs, los dos residuos Thr y Tyr deben ser fosforilados para ser activados (Thr183 y Tyr185 en JNK2 humana). Solamente una MAPKAPK, MAPKAPK3 está reportada como un componente de la vía MAPK.

Son pocos los blancos citosólicos descritos para JNKs, mientras que esta cascada parece ser un regulador mayor de procesos nucleares, en particular de la transcripción. Por lo tanto, después de su activación, como las otras MAPKs, JNKs se transloca hacia el núcleo donde se asocia con factores de transcripción como c-Jun, ATF, Elk1, activándolos y promoviendo su función (Keshet *et al.*, 2010).

2.3.- NF- κ B

La familia de proteínas NF- κ B está conformada por cinco miembros bien caracterizados en mamíferos que consisten de p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2). Estas proteínas se encuentran en estado inactivo como homodímeros o heterodímeros en el citoplasma celular, unidos a proteínas de la familia I κ B (Inhibidores de NF- κ B) (Gosh *et al.*, 2012). La familia de proteínas NF- κ B se caracteriza por la presencia de un dominio N-terminal de 300 aminoácidos con homología con Rel (RHD), el cual es responsable de la dimerización, la interacción con I κ Bs y la unión al ADN (Gosh *et al.*, 2012). Los miembros de la familia I κ B actúan deteniendo la función de los dímeros de NF- κ B, y se definen por la presencia de cinco a siete repeticiones de anquirina C-terminales. Las células de mamíferos contienen ocho miembros establecidos de I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , BCL-3, I κ B-NS y las proteínas precursoras p100 y p105. Típicamente, las proteínas I κ B funcionan previniendo la unión de los dímeros NF- κ B al ADN. Por ejemplo, I κ B α o I κ B β se unen a los dímeros p65/50 o p65/c-Rel, enmascarando la secuencia de localización nuclear (NLS) de p65, que a pesar de la presencia de una NLS de p50, resulta en un estado estacionario de localización citoplasmática (Gosh *et al.*, 2012). La cascada de NF- κ B típicamente opera a través de dos grandes vías: canónica y no canónica. La activación de la vía canónica ocurre corriente abajo de muchos estímulos incluyendo LPS y citocinas pro-inflamatorias como TNF o IL-1 (Rinkenbaugh *et al.*, 2016). Después de su activación, el inhibidor del complejo de la cinasa κ B (IKK), que consiste de las subunidades IKK α , IKK β y IKK γ (NEMO), fosforila a I κ B α , permitiendo su ubiquitinización y degradación proteasómica. La pérdida de I κ B α permite la acumulación nuclear de NF- κ B y su unión al ADN, promocionando la transcripción de sus genes diana, incluyendo factores anti-apoptóticos, citocinas como IL-6 y factores de proliferación como ciclina D1 (Rinkenbaugh *et al.*, 2016). Un grupo de genes diana incluye reguladores negativos de la señalización de NF- κ B, tales como A20 y I κ B α . Produciendo estos componentes, NF- κ B genera un lazo de retroalimentación negativa para agregar otra dimensión de control de esta vía. La vía no canónica es activada a través de señales como BAFFR, CD40 o LT β R. En ésta, p110 actúa como molécula I κ B, manteniendo a RelB en el citoplasma. La vía no canónica permite la estabilización de la cinasa inductora de NF- κ B (NIK). NIK activa los dímeros IKK α , los cuales posteriormente fosforilan a p100. La fosforilación de p100 permite su división en p52, produciendo un dímero RelB-p52 activo que se dirige hacia el núcleo y regula la transcripción génica (Rinkenbaugh *et al.*, 2016). La **Figura 2** muestra la vía de activación de NF- κ B.

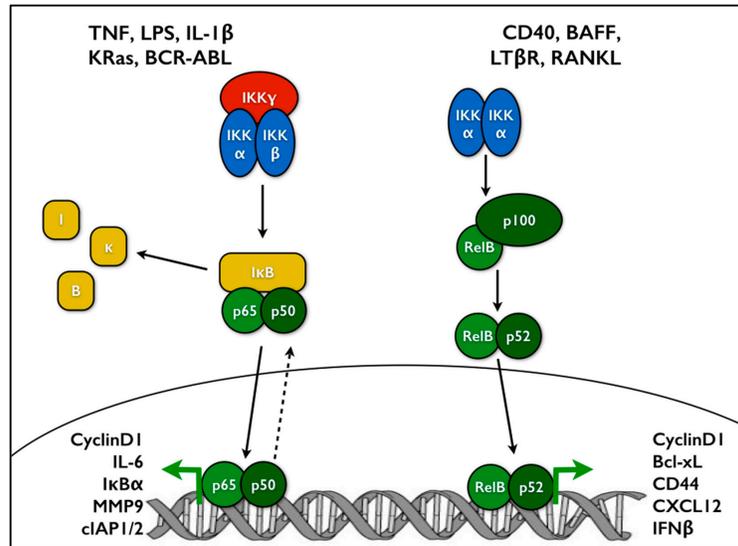


Figura 2. Vía canónica y no canónica de activación de NF-κB (Tomado de: Rinkenbaugh A, Baldwin A. The NF-κB Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells*. 2016 Apr 6;5(2):16.)

2.3.1.- Funciones biológicas de NF-κB

Los primeros estudios genéticos que estudiaron la vía de NF-κB, revelaron un papel crucial de p65 en proveer protección contra la apoptosis durante la señalización de TNF. Ratones con falta de p65 exhiben letalidad asociada a necrosis hepática en los días 15 y 16 de gestación. La apoptosis hepática mostró ser el resultado de la señalización de TNF en el desarrollo hepático, demostrando también que la cruce de ratones negativos para *Tnf* y *Tnfrsf1a* salvaba a estos de la letalidad embrionaria y reveló que p65 juega un papel importante en la respuesta inmune innata. En contraste, ratones con defecto de p50 no muestran defectos en el desarrollo, demostrando que p50 no es esencial para la inducción de genes anti-apoptóticos, pero en lugar de ello exhibían respuesta inmune humoral defectuosa. Células B con falta de p50/p105 no responden eficientemente a lipopolisacáridos (LPS), subrayando el papel del dímero p65/p50 en la señalización de la vía de TLR. Ratones con falta de p52 muestra defectos en la arquitectura esplénica y el desarrollo de las placas de Peyer, enfatizando la importancia de la vía no canónica en la linfo-organogénesis.

La proteína c-Rel forma homodímeros y heterodímeros con p50 y p65. Aunque la deficiencia de c-Rel no puede generar una respuesta humoral productiva, hay evidencia que sugiere que en algunas circunstancias hay redundancia funcional entre c-Rel y p65. Como resultado, ratones con falta de c-Rel, que no pueden inducir la expresión génica, pero pueden formar dímeros, generan un fenotipo más severo. Estos mutantes de c-Rel desarrollan médula ósea hipoplásica e hiperplasia de órganos linfoides secundarios, sugiriendo funciones de c-Rel en la activación de células B. También se ha demostrado un rol esencial de c-Rel en el desarrollo de células T reguladoras (Rinkenbaugh *et al.*, 2016). La pérdida de RelB

resulta en inflamación multi-orgánica, así como defectos severos en la inmunidad adaptativa. Ratones con falta de RelB tienen deficiencias en la respuesta inmune celular asociadas con defectos en las células medulares del timo y la función de las células dendríticas. Este fenotipo se muestra exagerado cuando se bloquea también a p50, mostrando la cooperación entre p50 y RelB en la regulación de genes anti-inflamatorios (Rinkenbaugh *et al.*, 2016). La importancia de RelB en la linfo-organogénesis está bien definida. Los animales con knockout de RelB carecen de placas de Peyer, secundario a defectos en la señalización de LT β R. La vía no canónica con RelB es responsable de los defectos del desarrollo de las células epiteliales medulares del timo, un proceso que depende de CD40 y RANKL (Rinkenbaugh *et al.*, 2016). Mientras que el papel de la vía no canónica ha sido bien descrito en el contexto de la linfo-organogénesis, la vía canónica también es activada por miembros de la familia TNFR y contribuye al desarrollo y organización de órgano linfoides. A pesar de que NF- κ B no es único en los diferentes pasos del desarrollo leucocitario y su activación, sí es esencial en el desarrollo de tejidos especializados para el desarrollo y activación linfocitaria (Rinkenbaugh *et al.*, 2016).

2.4 Enfermedad periodontal y vías de señalización pro-inflamatorias

Las enfermedades periodontales constituyen un grupo de patologías de carácter infeccioso, que afectan a los tejidos de soporte de los dientes, encía, ligamento periodontal y hueso alveolar. La gingivitis afecta a los tejidos blandos de la encía y es potencialmente reversible, pudiendo presentarse en cualquier edad de la vida con una distribución generalizada. Las periodontitis se extienden a zonas más profundas, como el ligamento periodontal y el hueso alveolar, afectando la estabilidad de los órganos dentarios en su relación con el hueso alveolar. Ambos casos, generalmente sin resultado de la infección persistente y el proceso inflamatorio en respuesta a la presencia de patógenos periodontales (por ejemplo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*) (Lamster *et al.*, 2016). La periodontitis crónica severa es la sexta enfermedad más frecuente en el mundo y la principal causa de discapacidad ajustada por años de vida entre las enfermedades de la cavidad bucal. Es más frecuente en hombres, especialmente aquellos en condiciones de pobreza y fumadores crónicos (Lamster *et al.*, 2016).

La placa dentobacteriana, algunos productos microbianos, la respuesta inmune, factores ambientales y conductuales son importantes contribuyentes para el incremento del riesgo de enfermedad periodontal. La presencia de patógenos es necesaria en la mayoría de los casos, pero no suficiente para su desarrollo. En el estado fisiológico, donde hay factores de riesgo no modificables, el huésped responde apropiadamente a las acumulaciones bacterianas. Sin embargo, algunos modificadores de la enfermedad como el tabaquismo y diabetes mellitus, modifican la respuesta inflamatoria. Tanto la inmunidad humoral como celular se encuentran activadas, y se cree que es la respuesta inflamatoria la responsable de la destrucción tisular que caracteriza a las enfermedades periodontales (Lamster *et al.*, 2016). Posterior a la producción excesiva de citocinas, interleucinas y otros

mediadores inflamatorios incluyendo metaloproteinasas de la matriz (MMPs), la respuesta global es responsable de la pérdida de tejidos no mineralizados del periodonto y la resorción de la cresta de hueso alveolar (Lamster *et al.*, 2016). En el entorno periodontal, los constituyentes bacterianos, incluyendo LPS de patógenos gramnegativos pueden iniciar pérdida de hueso inflamatoria. Los LPS pueden estimular la expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6 y el ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL) a través de la activación de la respuesta inmune innata y de células no inmunes como los fibroblastos gingivales. La producción de citocinas inflamatorias resulta de la activación de cascadas de señales inductoras de cinasa y factores de transcripción (Travan *et al.*, 2013).

En la enfermedad periodontal los macrófagos, monocitos y fibroblastos, producen IL-1 β , TNF- α , PGE₂ e IL-6, y se ha encontrado su significancia en los sitios activos de enfermedad comparada con individuos sanos o sitios sin daño periodontal. Estas citocinas dirigen la cascada de fenómenos destructivos en el tejido periodontal e inician la producción de una serie de enzimas y mediadores, incluyendo MMPs y prostaglandinas. Además, las citocinas pro-inflamatorias de manera directa o indirecta reclutan osteoclastos a través de la vía dependiente e independiente de RANKL, resultando en un daño óseo irreversible (Travan *et al.*, 2013). Los LPS inician la cascada de señalización de la respuesta inmune innata a través de la interacción con las proteínas de superficie CD14, así como receptores tipo Toll (TLRs), específicamente TLR-2 y TLR-4. La expresión de ambos TLRs está incrementada en los tejidos periodontales afectados, sugiriendo que estos receptores tienen una capacidad incrementada para la expresión corriente abajo de citocinas pro-inflamatorias. La señalización de TLR-4 activa las vías dependientes de MyD88 para la activación subsecuente de la cinasa asociada a interleucina 1R (IRAK), factor-6 asociado con el receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6) y el factor NF- κ B, requerido para la inducción de citocinas. También las vías dependientes de TRAF-6 son requeridas para el reclutamiento de diferentes proteínas adaptadoras y la activación de cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Travan *et al.*, 2013).

Los factores de transcripción NF- κ B controlan la expresión de varios de los muchos mediadores presentes en la inflamación periodontal, incluyendo IL-1, IL-1, TNF- α y MMPs (Travan *et al.*, 2013). Como mencionamos en párrafos anteriores, las MAPK fosforilan varios blancos intracelulares, incluyendo factores de transcripción (AP-1 y CHOP) y proteínas de unión al RNA, las cuales regulan la expresión de genes inflamatorios en el nivel transcripcional y postranscripcional (Travan *et al.*, 2013). Los genes diana corriente debajo de la señalización de MAPK, incluyen mediadores de la inflamación como IL-1, IL-6, TNF- α , COX-2 y MMPs. Modelos preclínicos de enfermedad periodontal indican que existe una fuerte correlación entre la activación de las MAPKs, la inflamación y la pérdida de hueso alveolar. En un estudio reciente, se obtuvieron datos que indicaban la correlación positiva entre p38 y ERK con la severidad de la enfermedad, donde únicamente p38 fosforilado se correlacionó a su vez con parámetros clínicos de progresión de la enfermedad (Travan *et al.*, 2013). No obstante, hasta la fecha no

se ha establecido un vínculo entre la expresión sistémica de estos marcadores (enfermedades crónico degenerativas), con el aumento en el riesgo de enfermedad periodontal.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es un problema de salud pública que se asocia con el consumo de alimentos con alto contenido energético y que predispone a los individuos a la adquisición de enfermedades crónicas no transmisibles a través del aumento de producción de marcadores pro-inflamatorios, modificando el metabolismo celular y promoviendo el sedentarismo, la falta de productividad y una menor calidad de vida. Múltiples estrategias se han propuesto para hacer frente a su elevada prevalencia, una de las cuales ha sido la introducción de edulcorantes no energéticos a las rutinas y modificaciones dietéticas. Hay una cantidad diversa de edulcorantes no nutritivos disponibles para libre consumo, cuyo éxito se asocia con el bienestar producido por su sabor dulce y el beneficio de su bajo contenido energético. Esto ha llevado a una difusión alarmante en su consumo, lo cual ha llevado a la interrogante de la seguridad en el consumo prolongado y a veces excesivo de estos productos, y las interacciones celulares y moleculares que tiene con el organismo después de su ingesta a nivel bucal e intestinal, dado que estos sitios representan el primer contacto después de la ingesta de alimentos, y que puedan proporcionar un punto de partida sólido para estudios posteriores que busquen su participación en la patogénesis de diferentes estados patológicos. Es por ello que nuestro estudio se centra sobre las posibles interacciones de estos productos sobre las vías de señalización de las MAPK y NF- κ B, cuyas vías de señalización corriente abajo son el prelude de los mecanismos iniciales del proceso de inflamación. Esto nos lleva a la interrogante del posible efecto del consumo crónico de edulcorantes no nutritivos sobre la activación de la vía de las MAPK y NF- κ B a nivel intestinal, y su repercusión sobre el estado de salud a nivel intestinal y periodontal.

4.- HIPOTESIS

4.1.- Hipótesis alterna

La ingesta crónica de sacarosa, sucralosa y stevia incrementa la actividad de vías de señalización proinflamatorias en intestino delgado dependientes de la expresión de integrantes proteicos de la señalización de MAPKs y NF- κ B, y promueve daño periodontal en cavidad bucal de ratones BALB/c.

4.2.- Hipótesis nula

La ingesta crónica de sacarosa, sucralosa y stevia no incrementa la actividad de vías de señalización proinflamatorias en intestino delgado dependientes de la expresión de integrantes proteicos de la señalización de MAPKs y NF- κ B, y no promueve daño periodontal en cavidad bucal de ratones BALB/c.

5.- JUSTIFICACIÓN

México representa uno de los primeros lugares en obesidad y obesidad infantil, mayormente debido al consumo de dietas hipercalóricas, para lo cual, una de las estrategias adoptadas para esta problemática ha sido el reemplazo de azúcares refinadas por edulcorantes no nutritivos de venta libre. La recomendación de su consumo por parte de servidores de la salud y de la salud bucal, basándose en sus bajos efectos sobre la homeostasis hormonal y lesiones cariosas, es de preocupación al no contar con bases rígidas sobre su bioseguridad en pacientes sanos y enfermos, tanto en el ámbito de la salud sistémica como de la salud periodontal. Esto ha provocado su uso indiscriminado coadyuvado por la falta de información científica de los efectos a largo plazo y su impacto sobre el metabolismo celular y la salud sistémica. La puesta en marcha del TLCAN detonó el consumo de edulcorantes no nutritivos de tipo artificial, desplazando al azúcar en un segmento importante del mercado mexicano, lo cual exacerbó el consumo de estos productos, creciendo a una tasa anual promedio de 10.7%, y que actualmente ocupan el 5.5% del consumo de edulcorantes. Esto ha permitido que los edulcorantes no nutritivos hayan logrado consolidarse en más de un cuarto del mercado de edulcorantes en México. Así mismo, la falta de información disponible sobre las interacciones moleculares entre los edulcorantes y el epitelio intestinal después de su consumo crónico ha creado controversia en algunos países, lo cual se ve reflejado en estudios hipotéticos que afirman la relación de la sucralosa con la elevada prevalencia de enfermedad inflamatoria intestinal en algunos países desarrollados. Por ello, nuestro estudio busca establecer un perfil de interacciones moleculares pro-inflamatorias después del consumo crónico de edulcorantes no nutritivos en ratones BALB/c, y poder determinar sus efectos a nivel molecular sobre el epitelio intestinal y tejidos periodontales.

6.- OBJETIVO GENERAL

Establecer un perfil de la expresión de cascadas de señalización pro-inflamatorias en intestino por efecto a la ingesta crónica de edulcorantes y su relación con el estado periodontal.

7.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la expresión de las proteínas totales y fosforiladas ERK1/2, JNK y p38 en intestino delgado de ratones suplementados con edulcorantes por 6 semanas.
- Analizar la expresión de la proteína total y fosforilada I κ B α en intestino delgado de ratones suplementados con edulcorantes por 6 semanas.
- Describir los hallazgos histológicos con tinción de hematoxilina-eosina en tejido periodontal de ratones suplementados con edulcorantes por 6 semanas.

8.- MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Diseño de Estudio

Tipo de estudio: Experimental, prospectivo y comparativo

Universo de trabajo: Ratones machos y hembras de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad.

Método de muestreo: No probabilístico, por conveniencia.

Tamaño de muestra: 32 ratones BALB/c machos y hembras de 8 semanas de edad.

Se formaron 4 grupos de estudio por sexo conformados de la siguiente manera:

Grupo control (Agua simple)	4 ratones macho y 4 ratones hembra
Grupo Glucósidos de esteviol (1%)	4 ratones macho y 4 ratones hembra
Grupo Sucralosa (1%)	4 ratones macho y 4 ratones hembra
Grupo Sacarosa (10%)	4 ratones macho y 4 ratones hembra

Para el grupo sacarosa se utilizó 10 g/100mL de solución acuosa, lo cual es equivalente a 2 cucharaditas de azúcar de mesa. Para los grupos Glucósidos de esteviol y Sucralosa, se utilizará un sobre de 1 g/100mL de solución acuosa. La concentración de las tres soluciones tiene la finalidad de equiparar el sabor dulce entre los grupos de estudio y proporcionar una cantidad similar de edulcorante a la que utilizan habitualmente los seres humanos. La administración del edulcorante fue por 6 semanas a partir de la semana 8 de edad.

8.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Criterios de inclusión: Ratones BALB/c machos y hembras de 8 semanas de edad. Peso de 22 a 25 g.

Criterios de exclusión: Ratones que al inicio del estudio se encuentren enfermos o por debajo del peso indicado.

Criterios de eliminación: Ratones que presenten alguna enfermedad o mueran durante el estudio.

8.3 Procedimientos.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Neuroquímica de las instalaciones de la Facultad de Medicina, y en el laboratorio de Histopatología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. Los ratones se criaron en el bioterio ubicado dentro de la misma Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura regulada de 22° C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se siguieron las especificaciones

técnicas para la producción, cuidado y uso de animales en laboratorio, según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Los ratones tuvieron agua y alimento *ad libitum*. La dieta para roedores fue completa en su contenido de proteína, carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales (LabDiet 5001). A las 8 semanas de edad, se formaron los grupos experimentales, los cuales bebieron en su agua de uso diario el edulcorante adicionado durante 6 semanas. Se evaluaron diariamente y a la misma hora los siguientes parámetros: Cantidad de agua ingerida por los ratones de cada grupo experimental y control. Se midieron semanalmente el peso corporal de los ratones de cada grupo experimental y control, desde el inicio hasta el final del tratamiento y se cuantificaron los gramos de alimento consumidos por los ratones de cada grupo, experimental y control.

8.3.1 Sacrificio de los ratones

Una vez obtenidos los grupos experimentales, los ratones se pesaron y sedaron vía peritoneal con una solución de 50 μ L de pentobarbital sódico por cada 25 g de peso del ratón. De manera inmediata, se realizó punción cardiaca para obtener las muestras de sangre, las cuales se colocaron en tubos de 1.5 mL para su posterior manejo. Se realizó la extracción del primer tercio del intestino delgado (duodeno) y el maxilar superior en conjunto con la mucosa gingival, palatina y órganos dentarios.

8.3.2 Extracción de las proteínas totales de tejido

La extracción de proteínas totales del duodeno se llevó a cabo utilizando de 100 a 500 μ L de buffer de lisis, el cual fue completado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se homogeneizó el tejido con la ayuda de un émbolo de jeringa de 1 mL. Una vez homogeneizado el tejido, se procedió a agregar nuevamente buffer de lisis. La muestra se incubó en hielo durante 45 min, agitando en vortex cada 15 min. Al haber transcurrido los 45 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min. Finalmente, se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y etiquetado.

8.3.3 Cuantificación de proteínas

La concentración de la fracción soluble de proteína se determinó con el ensayo colorimétrico de Bradford (Bio-Rad). Para la curva estándar se utilizó albumina bovina (BSA) (2 mg/mL) a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 y 1.2 mg/mL.

Se preparó el reactivo Bradford con agua destilada, a una solución de 1:4; se utilizó lo correspondiente a 200 μ l del reactivo por pozo, a 4° C. En una placa de 96 pozos se agregó 5 μ L de los estándares de BSA, por duplicado, dejando los dos primeros pozos como blanco (solo mezcla Bradford). Posteriormente, se

agregó 1 μL de muestra por duplicado y se usó el buffer de lisis como control negativo. A cada pozo se le agregó 200 μL de la mezcla de Bradford y la absorbancia será leída a 590 nm. Una vez obtenida la concentración de proteína de cada muestra de tejido del duodeno, ésta se ajustó a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se agregó buffer de carga (SLB, *simple loading buffer*) para completar un volumen final de 100 μL de muestra. Se calentaron las muestras 5 min a 95° C y se incubaron 5 min en hielo (4° C).

8.3.4 Ensayo de Western blot (Anexo 1)

8.3.4.1 Preparación de geles de acrilamida y buffer de corrida.

Se ensambló la cámara de electroforesis y se llenó con el buffer de corrida frío. Se limpiaron las placas de vidrio con etanol al 70% y toallas de papel. Una vez ensambladas las placas en los casetes, se llenaron con el gel de corrida. Una vez polimerizado, se colocó gel de apilamiento e inmediatamente el peine. Al polimerizar el gel de apilamiento, se removió el peine. En el primer pozo de izquierda a derecha se agregaron 2 μL de marcador de peso molecular (Thermo-Fisher-Scientific). A partir del segundo pozo, se cargaron 60 μg de proteína.

8.3.4.2 Electroforesis

Una vez colocadas las muestras en los pozos en el gel, se dejaron correr a un voltaje constante de 100 mV, hasta que el frente de corrida llegó al fondo del gel. Cuando la migración de proteínas terminó, se separaron los geles de las placas de vidrio; se cortó el gel de apilamiento y el gel de corrida se remojó en buffer de transferencia por 1 min.

8.3.4.3 Transferencia húmeda de la membrana

Se transfirió el gel a una membrana de transferencia fluoruro de polivinilideno (PVDF). Se cortó la membrana al tamaño del gel. Se dispuso de 6 papeles filtro gruesos que se utilizaron como filtros. Se hidrató la membrana en metanol absoluto por 30 segundos y después se enjuagó con el buffer de transferencia 1 o 2 minutos. El sándwich de transferencia se preparó de la siguiente manera, de abajo para arriba: En la placa negra se colocaron la esponja, 3 papeles filtro, el gel, la membrana de PVDF, 3 papeles filtro y por último la esponja. Se cerró el casete y se colocó en la cámara con el buffer de transferencia. Se dejó transferir a 60 mA (constante), toda la noche. Una vez completa la transferencia, se sacó la membrana y se enjuagó con triamortiguada salina con 0.1% de Tween-20 (TBST).

8.3.4.4 Bloqueo de la membrana

Con la finalidad de reducir los lugares de unión no específicos al anticuerpo, se procedió a bloquear el resto de los sitios activos de la membrana PVDF con una

solución albumina bovina al 1% en TBST durante 1 hr o toda la noche a 4 °C en agitación suave.

8.3.4.5 Incubación con anticuerpos

Para la evaluación de la expresión de proteínas de interés, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios del fabricante Cell signaling Technology ®: pERK (No. de catálogo 9911), ERK (#9102), pJNK (#9251), JNK (#9252), pp38 (#9216), p38 (#9218), plkB α (#9241) e I κ B α (#9242) diluidos en BSA al 5%, en una dilución 1:750, los cuales fueron incubados a 4°C en agitación suave durante toda la noche. Una vez realizado este proceso de incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST durante 5 minutos.

Posteriormente, se procedió a incubar el anticuerpo secundario. En este caso se utilizó el anticuerpo anti-conejo diluido en BSA al 1%, en una dilución 1:2000. La incubación se realizó a temperatura ambiente, durante 2 hr en agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TBST. Para llevar a cabo el control de carga se utilizó un anticuerpo anti-actina.

8.3.4.6 Inmunodetección (revelado de la membrana)

La membrana se colocó en una solución de revelado (150 μ L de DAB al 0.5% en PBS 1X y 30 μ L de H₂O₂). Se colocó en agitación suave hasta la aparición de las bandas. Para inactivar la reacción, se lavó con agua bidestilada.

8.3.5 Extracción y fijación de tejidos bucales

De manera adjunta al procedimiento de extracción de proteínas totales, se obtuvieron los tejidos bucales del ratón con la extracción del maxilar.

La extracción se realizó después de la disección roma de tejidos cutáneos con pinza Adson y bisturí y posterior corte de maxilar con tijeras iris rectas. El tejido se fijó en formaldehído al 10% previo a su procesamiento histopatológico.

8.3.6 Descalcificación tisular con EDTA

Después de una adecuada fijación, se lavó el tejido con agua destilada. Se colocó en una solución de EDTA al 20% para una adecuada descalcificación. El tiempo variaba de 4 a 5 días manteniendo la muestra en movimiento, permitiendo el flujo de la solución sobre el hueso. El cambio de la solución se realizó cada dos días.

El proceso terminó cuando el hueso se encontraba suave, lo cual se evaluó con un instrumento punzante. Al término de éste, la muestra se lavó con agua destilada y estuvo lista para su procesamiento.

8.3.7 Procesamiento de tejidos: Deshidratación, Aclaramiento e infiltración

Se procedió a la remoción de la mayor cantidad de agua posible del tejido para su posterior inclusión en parafina. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo de acuerdo al esquema corto de preparación de muestras y fragmentos pequeño de tejido del laboratorio de histopatología del CIEAO, que constó de los siguientes pasos secuenciales:

1. Se enjuagó brevemente la muestra con agua corriente. De ser necesario, colocaba el alcohol al 80%.
2. Se colocó en alcohol al 95% y se realizaron tres cambios de 15 a 20 min cada uno.
3. Se cambió a alcohol absoluto y se realizaron tres cambios de 15 min cada uno.
4. Se colocó en una solución de partes iguales de alcohol absoluto y xileno durante 15 min.
5. Se colocó en xileno y se realizaron dos cambios de 15 min cada uno.
6. Se colocó en parafina, se realizaron tres cambios de 15 min cada uno.
7. Se cambió a parafina al vacío de 15 a 20 min.
8. Inclusión.

8.3.8 Inclusión en parafina

Usando pinzas calentadas en mechero Bunsen, se removió a caja una procesadora que contenía el tejido impregnado del área de espera en parafina. Se seleccionó el molde adecuado de acuerdo con el tamaño de la muestra y se llenó parcialmente con parafina. Se recalentaron las pinzas para remover el tejido de la cajilla y colocarlo en el fondo del molde. Se transfirió el molde del plato caliente al plato frío. La cera formó una capa delgada en el fondo del molde. Suavemente se oprimieron las superficies del tejido que se cortaron contra la capa sólida que lo mantuvo en la posición horizontal deseada. Se llenó el molde y la cajilla de inclusión con parafina y se enfrió lentamente colocando el molde en la placa fría de la consola de inclusión. La parafina se solidificó en aproximadamente 15 min; el molde fue separado de la cajilla de inclusión. El tejido y la cera solidificada permanecieron juntos formando un bloque de parafina listo para su corte.

8.3.9 Microtomía

Los cortes se realizaron con un micrótopo rotatorio, para la obtención de cortes de 4 micrómetros de grosor. La rueda de mano se giró lenta y uniformemente para la creación de una cinta de tejido. La cinta se colocó en la superficie del baño de flotación. El baño de flotación estuvo conformado por 20 mL de solución de ácido clorhídrico al 1% y 4 L de agua corriente, a una temperatura de 4 grados por debajo del punto de fusión de la parafina. La cinta se colocó en el baño de flotación suavemente para eliminar arrugas y aire atrapado. La cinta se retiró del baño sumergiendo un portaobjetos previamente rotulado por debajo de ella.

Los portaobjetos se dejaron escurrir verticalmente por varios minutos antes de colocarlos en una placa caliente a una temperatura de 37°C, donde permanecieron durante un día completo, previo al proceso de tinción.

8.3.10 Tinción con Hematoxilina y Eosina

Se procedió a la preparación de la solución stock de hematoxilina de Mayer y eosina-floxina de acuerdo con la dosificación de reactivos previamente estandarizada (**Anexo 2**).

Procedimiento de tinción

Se procedió a desparafinizar las láminas en soluciones decrecientes de alcohol al 100 hasta el 80% y se les hidrató al llegar al agua. Se tiñeron en la solución de hematoxilina de Mayer por 15min. Se lavaron en agua corriente tibia por 15 min y posteriormente se colocaron en agua destilada. Se colocaron en etanol al 80% por 2 min. Se procedió a deshidratarlas y aclararlas a través de dos cambios cada uno de etanol al 95%, etanol absoluto y xileno, cada uno por dos minutos. Se montaron con medio resinoso.

8.3.11 Obtención de imágenes por microscopía

Se procedió al montaje de laminillas en microscopio de campo claro (Leica ICC50 E) y se observaron con objetivos 5X, 40X y 100X. Se realizó la descripción histopatológica y se obtuvieron fotografías digitales de cada corte.

9.- RESULTADOS

9.1.-Vías de señalización

Para establecer el posible efecto de la suplementación con edulcorantes sobre la vía de señalización de las MAPK, la cual está involucrada en la progresión de estímulos proinflamatorios, se analizó la expresión de las formas totales y fosforiladas de ERK1/2, JNK y p38 en tejido intestinal de ratones de la cepa BALB/c suplementados con edulcorantes durante un período de 6 semanas.

El análisis densitométrico de las bandas de inmunexpresión de proteínas obtenidas por Western Blot en ratones machos, demostró incremento de la expresión de JNKt y pJNK en ratones suplementados con sucralosa y glucósido de esteviol, en comparación con el grupo control, aunque en el análisis semicuantitativo y estadístico de la densidad de las bandas no se encontraron diferencias significativas en la comparación de grupos. La expresión de ERKt y pERK se vio incrementada en todos los grupos incluyendo el grupo control, aunque de igual forma no se encontraron diferencias significativas en la comparación de grupos. En el caso de p38t y pp38, la expresión se vio aumentada en el grupo suplementado con stevia y muy reducida en el grupo de sacarosa, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) en el grupo de stevia en la comparación de grupos (**Figura 3**).

Por otro lado, en el grupo de hembras, la expresión de JNKt y pJNK se vio incrementada en todos los grupos en comparación con el grupo control, aunque no se encontraron diferencias significativas en la comparación de grupos. La expresión de ERKt y pERK se mostró incrementada en todos los grupos en comparación con el grupo control, aunque no se hallaron diferencias significativas en la comparación de grupos. Finalmente, la expresión de p38t y pp38 se vio incrementada notablemente en comparación con el grupo control, a excepción de pp38 en el grupo de sacarosa, el cual mostró baja expresión en comparación con el control; en ninguno de los casos se hallaron diferencias significativas en la comparación de grupos (**Figura 4**). La expresión de I κ B α total y fosforilada no fue valorable debido a la baja expresión que mostraba la proteína en el análisis de Western Blot, lo cual no permitió incluirla en el análisis estadístico; sin embargo, la **Figura 5** muestra un blot con baja expresión proteica en todos los grupos experimentales.

9.2.-Hallazgos histopatológicos

Para determinar los cambios celulares en tejido periodontal de ratones de la cepa BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales y sacarosa, se procedió al sacrificio de ratones previamente suplementados durante un período de 6 semanas, a los cuales se les realizó la disección cuidadosa de maxilares, los cuales fueron procesados para tinción de Hematoxilina-Eosina.

Los hallazgos encontrados muestran una tendencia muy clara hacia el aumento en la cantidad de células del tejido mesenquimático periodontal subyacente al órgano dentario (**Figura 6 y 7**), en cuya periferia se observa un aumento en la agrupación celular en todos los grupos experimentales a excepción del grupo de hembras sacarosa, que muestra aumento de la cantidad de células, pero no la tendencia a la agrupación (**Figura 6-H, Figura 7-P**). Así mismo, los grupos experimentales muestran dilatación capilar, producto del aumento del flujo sanguíneo e indicativo de lesión inicial de gingivitis. Asimismo, los grupos de machos sucralosa y glucósido de esteviol presentaron alteraciones en morfología celular, presencia de figuras mitóticas y leve infiltrado inflamatorio inespecífico.

Figuras:

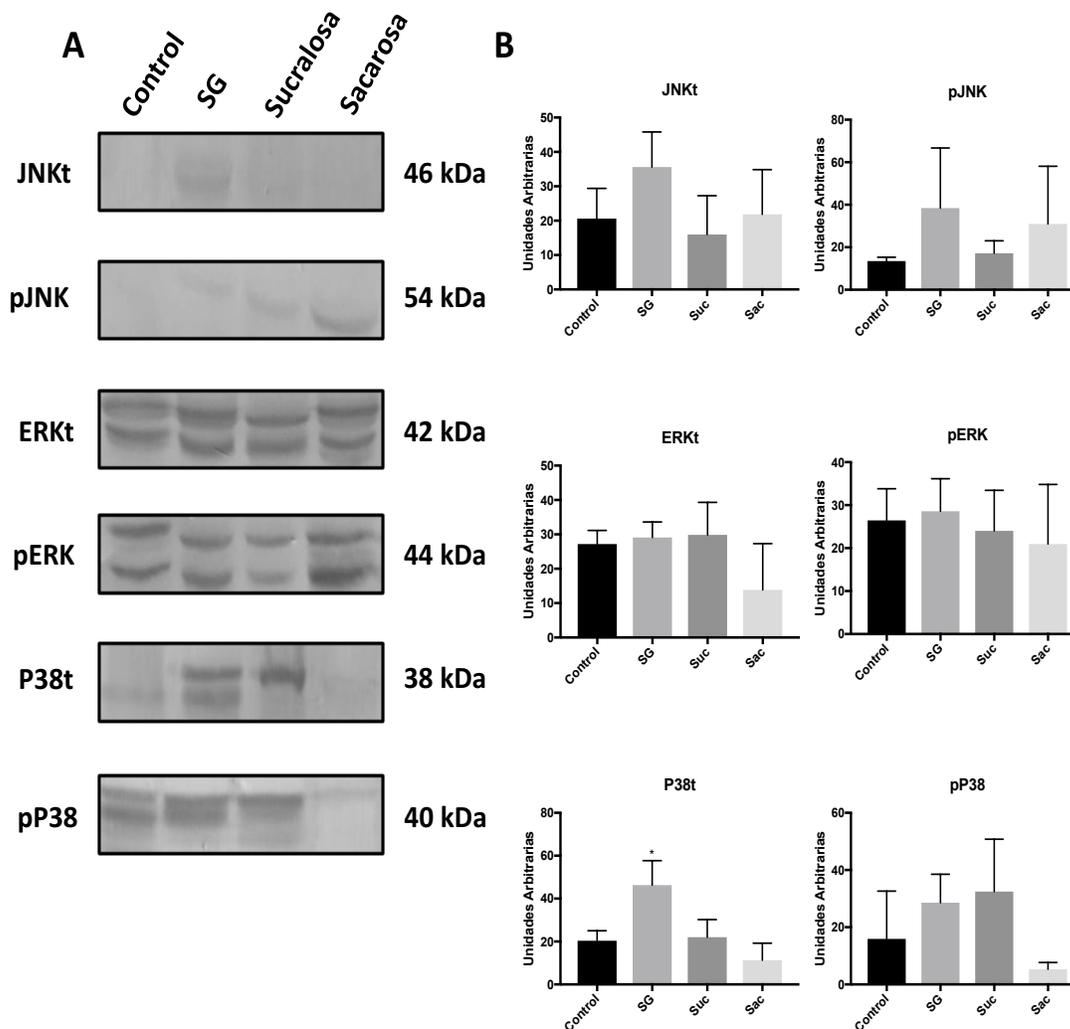


Figura 3. Expresión de JNK, ERK y p38 en intestino delgado de ratones macho suplementados con edulcorantes. (A) Los extractos de proteínas totales obtenidos al final del estudio fueron usados para evaluar las formas totales y fosforiladas de JNK, ERK y p38 en ratones machos mediante la técnica de Western Blot. $n=4$, se muestra un experimento representativo de cuatro. (B) Análisis de densitometría (media \pm E.E) expresado en unidades arbitrarias. Se aplicó la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes. * $p<0.05$ comparado con el grupo control.

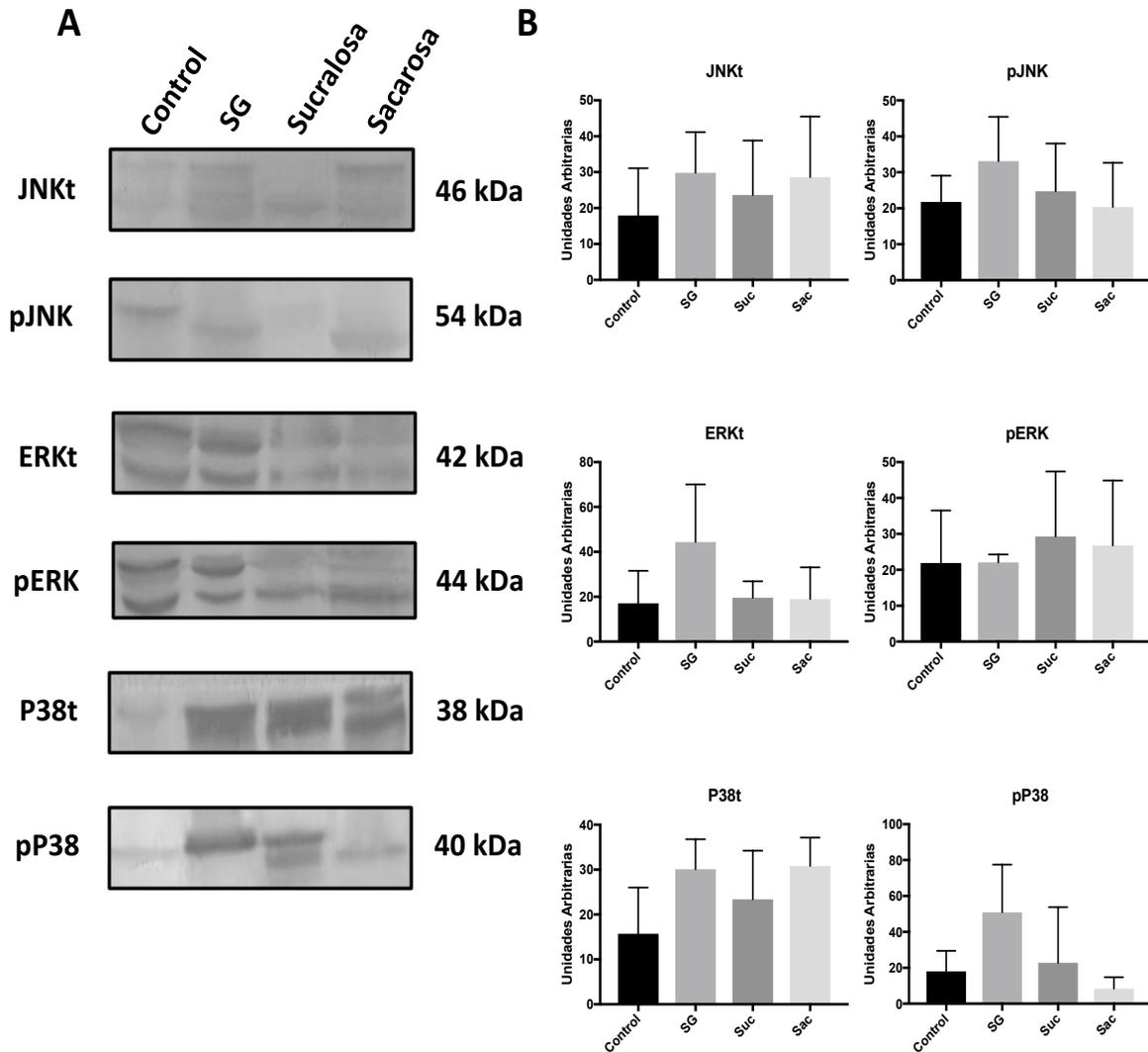


Figura 4. Expresión de JNK, ERK y p38 en intestino delgado de ratones hembra suplementados con edulcorantes. (A) Los extractos de proteínas totales obtenidos al final del estudio fueron usados para evaluar las formas totales y fosforiladas de JNK, ERK y p38 en ratones machos mediante la técnica de Western Blot. $n=4$, se muestra un experimento representativo de cuatro. (B) Análisis de densitometría (media \pm E.E) expresado en unidades arbitrarias. Se aplicó la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes.

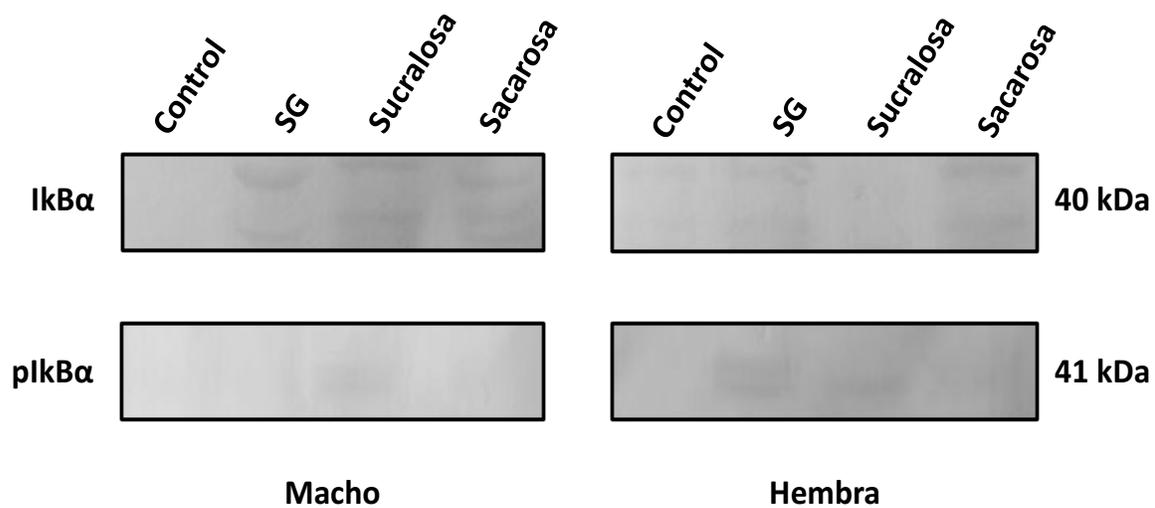


Figura 5. Expresión de IκBα en intestino delgado de ratones macho y hembra suplementados con edulcorantes. Se muestra un experimento.

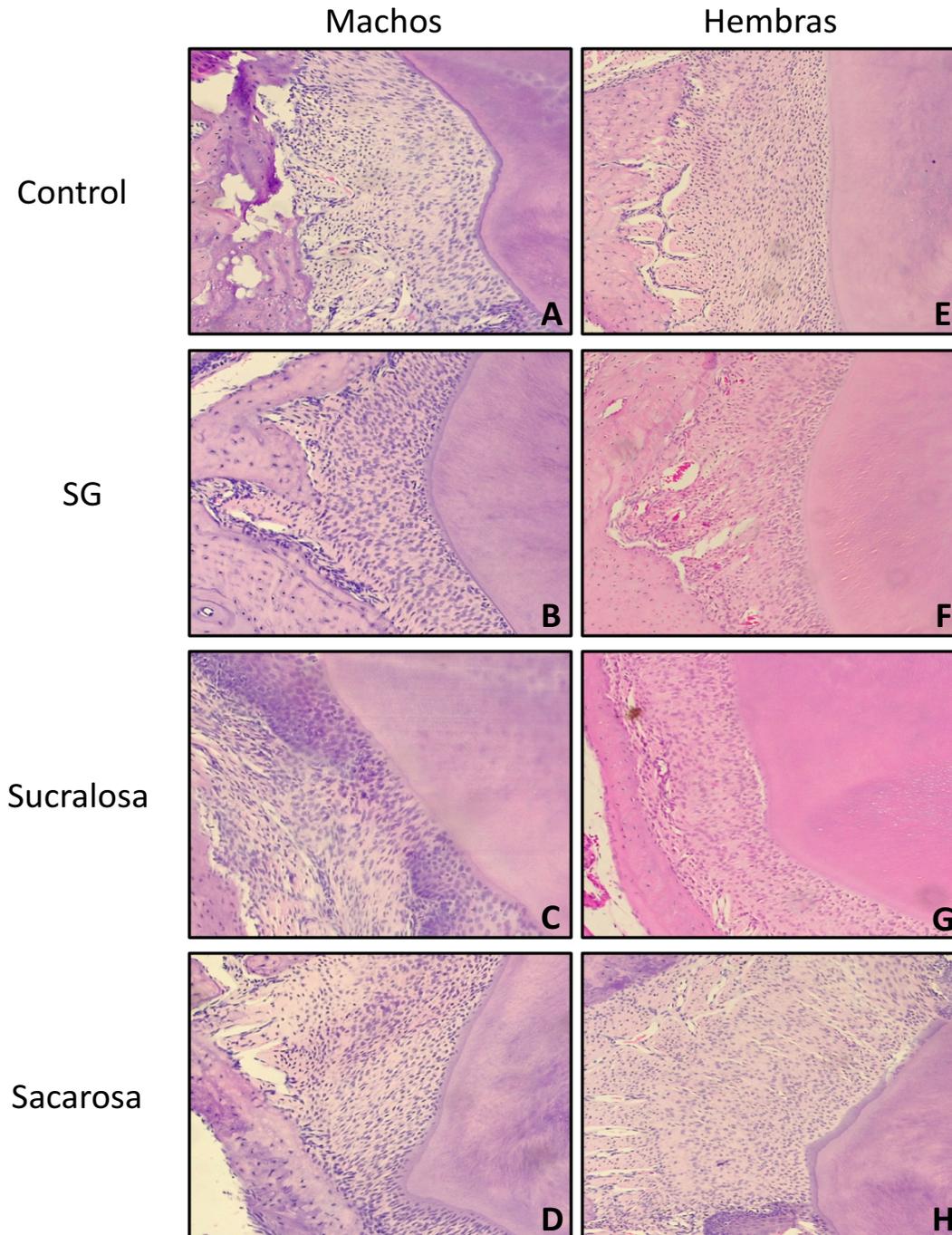


Figura 6. Tinción de Hematoxilina-Eosina de cortes sagitales comparativos de maxilar de ratón de la cepa BALB/c con magnificación 40X. Se aprecia el tejido periodontal del roedor que consiste en tejido mesenquimático rico en fibroblastos y fibras colágeno y hueso periodontal. Se nota la ausencia de raíz dentaria, rasgo característico de los órganos dentarios de ratones. Aumento de la celularidad en el tejido mesenquimático de todos los grupos (**Fig. B-H**). En los grupos de glucósido de esteviol y sucralosa se observa el mayor aumento en la celularidad tanto en machos como en hembras (**Fig. B-H**). Todos los grupos muestran tendencia a la agrupación celular en la periferia del órgano dentario (**Fig. B-G**), la cual no es observable con claridad únicamente en el grupo de hembras sacarosa (**Fig. H**).

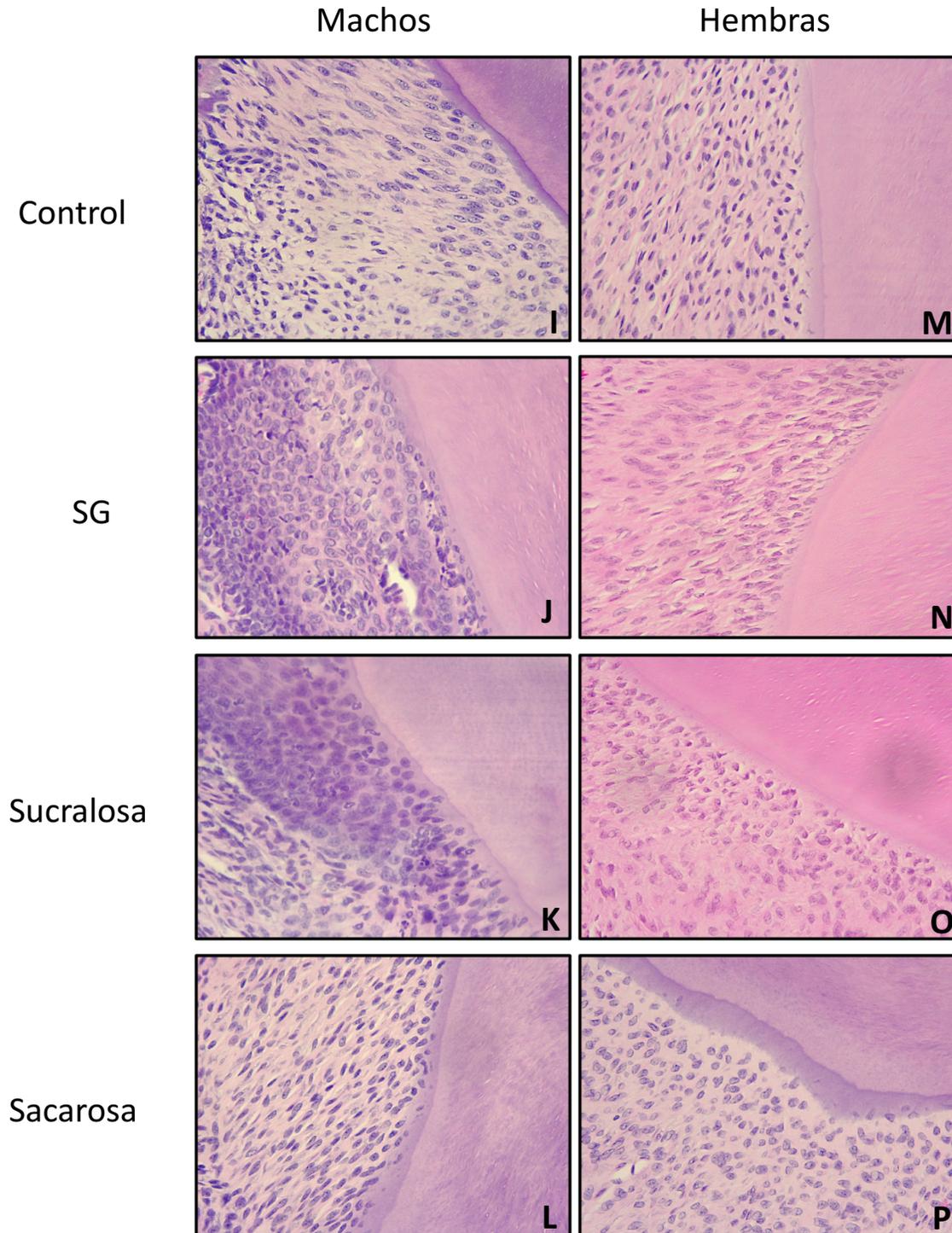


Figura 7. Tinción de Hematoxilina-Eosina de cortes sagitales comparativos de maxilar de ratón de la cepa BALB/c con magnificación 100X. Magnificación de las imágenes mostradas en la Figura 6. Se observan los rasgos previamente descritos de aumento de la celularidad en el tejido mesenquimático de los grupos experimentales, tendencia a la agrupación celular en la periferia del órgano dentario (**Fig. J-O**), así como la falta de esta última en el grupo de hembras sacarosa (**Fig. P**).

10.- DISCUSIÓN

La obesidad y la enfermedad periodontal son problemas de salud pública cuya prevalencia e incidencia denotan la falta de acciones de confrontación en su patogenia, dentro de lo que se incluyen prevención general y específica, así como tratamiento de las comorbilidades existentes que pueden ser consecuencia de ellas o sólo estar asociadas. La carencia de evidencia científica sobre el uso prolongado de edulcorantes comerciales ha permitido que estos formen parte integral de la dieta cotidiana de países desarrollados con el objetivo de disminuir los efectos deletéreos del consumo de sacarosa en pacientes sanos y aquellos portadores de enfermedades crónicas degenerativas. El uso de edulcorantes no nutritivos en las dietas occidentales en respuesta a la asociación de la obesidad con el alto consumo de hidratos de carbono y su estrecha relación con enfermedades crónicas degenerativas, ha recibido una respuesta favorable por parte de la población debido a sus efectos endulzantes, sin involucrar la respuesta bioquímica y fisiopatológica que genera el alto consumo de sacarosa. Sin embargo, el consumo crónico de edulcorantes comerciales no ha recibido la atención suficiente por parte de la comunidad científica en relación a los efectos biológicos que se generan en el consumo prolongado en pacientes sanos y en crónicos degenerativos. Aunado a esto, se ha incrementado la publicación de estudios hipotéticos en países desarrollados que relacionan el consumo prolongado de sucralosa con el aumento en la incidencia de enfermedad inflamatoria intestinal (Qin, 2011). Lo anterior ha guiado nuestro estudio a evaluar efectos crónicos de edulcorantes en ratones de la cepa BALB/c, dentro del cual hemos observado tendencias que aportan evidencia de efectos biológicos no antes reportados con el consumo prolongado de estas sustancias.

El análisis de inmunoexpresión de proteínas pro-inflamatorias reveló una tendencia al aumento en la expresión de JNK, ERK, y p38 totales y fosforiladas, en mucosa duodenal en ratones experimentales tanto machos como hembras, expuestos a sucralosa, glucósido de esteviol y sacarosa. Estas proteínas pertenecen a la familia de MAP cinasas (MAPK), las cuales son un grupo heterogéneo de moléculas implicadas en complejos modelos de señalización acoplados a proteína G, que se mantienen conservadas desde el punto de vista evolucionista (Keshet *et al.*, 2010). Los componentes JNK, ERK y p38 se activan en respuesta a diferentes tipos de estímulo y generan respuestas diversas dependiendo del tipo celular. ERK juega un rol importante en los estímulos de proliferación y diferenciación celular, JNK y p38 se activan en respuesta a estrés celular y ERK5 responde a estímulos mitogénicos (Keshet *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en la inmunoexpresión no revelan diferencias estadísticamente significativas respecto a nuestros grupos controles, pero si muestran tendencias al aumento de expresión en todos los grupos experimentales. En la comparación de grupos experimentales se nota el aumento de la celularidad en el tejido mesenquimático de todos los grupos en comparación con el grupo control (**Fig. B-H**). En los grupos de glucósido de esteviol y sucralosa se observa el mayor aumento en la celularidad tanto en machos como en hembras (**Fig. B-H**). Todos los grupos muestran tendencia a la agrupación celular en la periferia del órgano dentario en comparación con el control (**Fig. B-G**), la cual no

es observable con claridad únicamente en el grupo de hembras sacarosa (**Fig. H**). En la **Figura 7** también se observan los rasgos previamente descritos de aumento de la celularidad en el tejido mesenquimático de los grupos experimentales, tendencia a la agrupación celular en la periferia del órgano dentario (**Fig. J-O**), así como la falta de esta última en el grupo de hembras sacarosa (**Fig. P**). También se aprecia pleomorfismo celular en el grupo de machos sucralosa, presencia de figuras mitóticas en el mismo grupo, así como presencia de infiltrado leucocitario inespecífico en el grupo de machos sucralosa y en los machos suplementados con glucósido de esteviol (**Fig. J y K**).

La expresión de ERK se ve aumentada en todos nuestros grupos. ERK desempeña funciones específicas en diferentes tipos de tejido, dentro de los cuales la función aumentada en la hematopoyesis funge como una de las más destacadas, así como su nula o baja expresión que repercute en el desarrollo craneofacial (Saba-El-Leil, *et al.*, 2016). La participación en la hematopoyesis de la sobre activación de ERK puede suponer una elevación en la formación de precursores linfoides y eritroides, exacerbando la respuesta celular a estímulos extracelulares, y fomentando el mantenimiento o incremento de la respuesta inflamatoria. De igual forma, los hallazgos histopatológicos craneofaciales en los grupos experimentales, mostraron aumento de la celularidad mesenquimal, lo cual puede relacionarse con la función mitogénica de ERK en los tejidos derivados de la cresta neural, como el macizo facial.

La participación de p38 en la respuesta inmunitaria e inflamatoria la convierte en un eslabón requerido para la evaluación de los efectos biológicos del consumo prolongado de edulcorantes debido a la demostración de que la disrupción de dos isoformas de p38 genera cambios perjudiciales en la regeneración tisular, respuesta inmune innata, procesos inflamatorios y tumorigénesis. De igual forma, varios modelos de cáncer asociado a colitis y carcinogénesis química han involucrado en su biología la disrupción de isoformas de p38 (del Barco Barrantes *et al.*, 2011), lo cual se entrecruza con la hipótesis de la participación de sucralosa en el aumento en la incidencia de enfermedad inflamatoria intestinal en Canadá (Qin, 2011), y con la tendencia que muestran nuestros resultados en la expresión elevada de p38 en su forma total y fosforilada en los grupos suplementados con glucósido de esteviol y sucralosa. JNK es parecida en su respuesta a p38 y es estimulada por receptores relacionados con estrés y apoptosis y se acopla a receptores tirosina cinasa y acoplados a proteína G. A pesar de que se han identificado pocos blancos citosólicos para JNK, se ha descrito como una molécula inductora de apoptosis (Keshet *et al.*, 2010). Esto último concuerda con la inmunoexpresión de JNK en todos nuestros grupos experimentales, en los cuales se observa baja expresión, con tendencia a un ligero aumento en el grupo suplementado con sucralosa, lo cual vuelve a corresponder con los hallazgos histopatológicos que muestran aumento de la celularidad del tejido mesenquimático subyacente al órgano dentario en todos los grupos experimentales, que podemos asociar a la baja expresión de JNK, una molécula pro-apoptótica.

La asociación tan estrecha de la enfermedad periodontal con procesos

inflamatorios sistémicos como los observados en la obesidad, diabetes mellitus y enfermedades autoinmunitarias, permite la relación de marcadores proinflamatorios en vías de señalización que convergen en lesiones tisulares comunes en todos estos procesos, que a pesar de generarse en tejidos diferentes, son producto de la activación de los mismos sustratos. Travan *et al.*, reportaron la correlación positiva de p38 y ERK con la severidad de la enfermedad periodontal, lo cual establece un punto de convergencia de la expresión de estas moléculas en tejidos periféricos con posibles efectos a nivel periodontal. Esta idea surge gracias a la falta de vinculación entre la expresión sistémica de estos marcadores con la enfermedad periodontal y los hallazgos en nuestro estudio, así como la evidencia disponible que establece que los genes diana corriente debajo de la señalización de MAPK favorece la transcripción de mediadores inflamatorios como IL-1, IL-6, TNF- α , COX-2 y MMPs, estableciendo la correlación entre la activación de las MAPKs, la inflamación y la pérdida de hueso alveolar (Travan *et al.*, 2013). Debido a las diferencias morfológicas y funcionales entre el epitelio intestinal y el tejido del surco gingival, resultaría controversial comparar los cambios tisulares de los hallazgos histopatológicos de nuestro estudio con la inmunoexpresión de proteínas proinflamatorias a nivel intestinal basándonos en diferencias o similitudes de los mecanismos de absorción de ambas mucosas y sus repercusiones en las modificaciones químicas de los edulcorantes y sus efectos finales a nivel molecular. Sin embargo, el torrente sanguíneo funge como un medio de diseminación del edulcorante absorbido a nivel intestinal, que puede generar cambios en tejidos periféricos como el tejido periodontal aunado a los posibles efectos locales que el edulcorante podría generar sobre la mucosa del surco gingival.

A pesar de la falta de diferencias significativas en el estudio cuantitativo del análisis de bandas de Western Blot, la tendencia creciente de la expresión de ERK, JNK y p38 en su forma total y fosforilada en mucosa duodenal, y los hallazgos histopatológicos en el tejido mesenquimático adyacente al órgano dentario de los grupos experimentales, permite crear un punto de convergencia de posibles reacciones inflamatorias sistémicas con efectos a nivel periodontal por el consumo crónico de edulcorantes comerciales. Asimismo, se valida parcialmente nuestra hipótesis alterna sobre el efecto tisular a nivel intestinal y periodontal de la activación de la vía de las MAPKs, ERK, p38 y JNK en ratones de la cepa BALB/c expuestos al consumo crónico de edulcorantes comerciales.

11.- CONCLUSIONES

El presente estudio ha evidenciado que el consumo crónico de estas sustancias genera posibles cambios pro-inflamatorios a nivel intestinal, confirmando sospechas hipotéticas de la literatura científica que los relacionan con el aumento en la incidencia de enfermedad inflamatoria intestinal. De igual forma se encontró un punto de convergencia entre la expresión sistémica de ERK, JNK y p38 y cambios histopatológicos a nivel periodontal en ratones de la cepa BALB/c, lo que genera nuevos paradigmas para evaluaciones futuras de los efectos biológicos del consumo de edulcorantes en la salud y la enfermedad.

12.- PERSPECTIVAS FUTURAS

Los hallazgos en nuestro estudio aportan evidencia sobre posibles interacciones entre el consumo de edulcorantes no nutritivos de manera crónica con la estimulación de vías proinflamatorias en mucosas intestinal y tejido periodontal. Lo anterior nos orienta a seguir la búsqueda de posibles marcadores moleculares de inflamación en mucosas de modelos animales de consumo crónico de edulcorantes. Nuestro estudio puede seguir el mismo curso, incluyendo análisis de inmunohistoquímica de las muestras obtenidas en maxilares de ratón, así como también expandir el análisis de inmunoexpresión a otros tejidos como tejido renal, en donde el análisis de inmunohistoquímica también podría aportar evidencia sobre el efecto de los edulcorantes en esta localización. Todo lo anterior nos aportará la evidencia necesaria para correlacionar el consumo crónico y extendido de edulcorantes con sus efectos sistémicos a largo plazo, y poder validar las hipótesis existentes hasta el momento, que relacionan el consumo de estos productos con enfermedades autoinmunitarias.

13.- REFERENCIAS

1. Estrategia contra el sobrepeso y obesidad. Secretaría de Salud. México. 2013. http://portal.salud.gob.mx/codigos/carrusel/salud_alimentaria.html# (Consultado el 2 de octubre de 2016)
2. Shankar P, Ahuja S, Sriram K. Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*. 2013 Nov;29(11-12):1293–9.
3. Weihrauch, M. R. (2004). Artificial sweeteners--do they bear a carcinogenic risk? *Annals of Oncology*, 15(10), 1460–1465.
4. Spencer, M., Gupta, A., Dam, L. V., Shannon, C., Menees, S., & Chey, W. D. (2016). Artificial Sweeteners: A Systematic Review and Primer for Gastroenterologists. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 22(2), 168–180.
5. Food and Drug Administration, HHS. (2006). Food labeling: health claims; dietary noncariogenic carbohydrate sweeteners and dental caries. Final rule. *Federal Register*, 71(60), 15559–15564.
6. Abou-Donia, M. B., El-Masry, E. M., Abdel-Rahman, A. A., McLendon, R. E., & Schiffman, S. S. (2008). Splenda Alters Gut Microflora and Increases Intestinal P-Glycoprotein and Cytochrome P-450 in Male Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(21), 1415–1429.
7. Brusick, D., Borzelleca, J. F., Gallo, M., Williams, G., Kille, J., Wallace Hayes, A., ... Burks, W. (2009). Expert Panel report on a study of Splenda in male rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55(1), 6–12.
8. Ma, J., Chang, J., Checklin, H. L., Young, R. L., Jones, K. L., Horowitz, M., & Rayner, C. K. (2010). Effect of the artificial sweetener, sucralose, on small intestinal glucose absorption in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104(06), 803–806.
9. Ma, J., Bellon, M., Wishart, J. M., Young, R., Blackshaw, L. A., Jones, K. L., ... Rayner, C. K. (2009). Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy subjects. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(4), G735–G739.
10. Hirsch, A. R. (2007). Migraine Triggered by Sucralose-A Case Report. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 47(3), 447–447.
11. Patel, R. M., Sarma, R., & Grimsley, E. (2006). Popular Sweetner Sucralose as a Migraine Trigger. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 46(8), 1303–1304.

12. Qin, X. (2011). What made Canada become a country with the highest incidence of inflammatory bowel disease: could sucralose be the culprit? *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien De Gastroenterologie*, 25(9), 511.
13. Sclafani, A., Bahrani, M., Zukerman, S., & Ackroff, K. (2010). Stevia and Saccharin Preferences in Rats and Mice. *Chemical Senses*, 35(5), 433–443.
14. Chan, P., Tomlinson, B., Chen, Y. J., Liu, J. C., Hsieh, M. H., & Cheng, J. T. (2000). A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50(3), 215–220.
15. Anton, S. D., Martin, C. K., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W. T., Geiselman, P., & Williamson, D. A. (2010). Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55(1), 37–43.
16. Saba-El-Leil, M. K., Frémin, C., & Meloche, S. (2016). Redundancy in the World of MAP Kinases: All for One. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4.
17. Keshet, Y., & Seger, R. (2010). The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. In R. Seger (Ed.), *MAP Kinase Signaling Protocols* (Vol. 661, pp. 3–38). Totowa, NJ: Humana Press.
18. del Barco Barrantes, I., Coya, J. M., Maina, F., Arthur, J. S. C., & Nebreda, A. R. (2011). Genetic analysis of specific and redundant roles for p38 and p38 MAPKs during mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12764–12769.
19. Ghosh S, Hayden MS. Celebrating 25 years of NF-κB research: Celebrating 25 years of NF-κB research. *Immunological Reviews*. 2012 Mar;246(1):5–13.
20. Rinkenbaugh A, Baldwin A. The NF-κB Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells*. 2016 Apr 6;5(2):16.
21. Lamster IB, Pagan M. Periodontal disease and the metabolic syndrome. *International Dental Journal* [Internet]. 2016 Nov [cited 2016 Dec 7]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/idj.12264>
22. Travan S, Li F, D'Silva NJ, Slate EH, Kirkwood KL. Differential expression of mitogen activating protein kinases in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013 Aug;40(8):757–64.

23. Macdonald IA. A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes. *European Journal of Nutrition*. 2016 Nov;55(S2):17–23.

24. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007 Apr;19(2):142–9.

25.- Perspectiva del azúcar de caña frente a la inclusión de edulcorantes artificiales. Nota informativa. SAGARPA/CONADESUCA. Febrero 2017.

26.- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011 Sep;1813 (9):1619–33.

ANEXOS

ANEXO 1: Fórmulas de soluciones para la preparación de geles de acrilamida.

ACRILAMIDA/BIS 30%, 2.67%

- 146 gr de acrilamida (Nota: Altamente neurotóxica, utilizar doble guante y cubrebocas) [Sigma – Aldrich].
- 4 gr de N´N metilene-bis-acrilamida [Sigma – Aldrich]

Disolver en 300 mL de agua destilada, mezclar bien y completar a 500 mL. Filtrar la solución con gasa.

Almacenar en frasco ámbar o envolver en papel aluminio y almacenar a 4°C

GEL DE CORRIDA 30%.

	7.5%	10%	12%
Agua destilada	4.8 mL	4 mL	3.3 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL	100 µL
Acrilamida/bis 30%, 2.67	2.5 mL	3.3 mL	4.0 mL
APS 10%	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	25 µL	25 µL	25 µL
Volumen total	10 mL	10 mL	10 mL

- Tris 1.5 M pH 8.8
 - 18 gr de Tris base. Disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 8.8 y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Lauril Sulfato de Sodio 10% (SDS 10%) [Sigma – Aldrich].
 - 10 gr de SDS, disolver en 70 mL de agua, evitando hacer espuma, completar a 100 mL con agua destilada.
- Persulfato de Amonio 10% (APS 10%) [Sigma – Aldrich].
 - 1 gr de Persulfato de Amonio en 10 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.

GEL DE APILAMIENTO 4%

	4%
Agua destilada	6.1 mL
Tris 0.5 M pH 6.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida/bis 30%,2.67	1.33 mL
APS 10%	100 µL

TEMED	25 μ L
Volumen Total	10 mL

- Tris 0.5 M pH 6.8
 - 6 gr de Tris base. Disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 6.8 y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Lauril Sulfato de Sodio 10% (SDS 10%) [Sigma – Aldrich]
- gr de SDS, disolver en 70 mL de agua, evitando hacer espuma, completar a 100 mL con agua destilada.
- Persulfato de Amonio 10% (APS 10%) [Sigma – Aldrich].
 - 1 gr de Persulfato de Amonio en 10 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.

BUFFER DE CORRIDA (RUNNING BUFFER) 5X.

- 15 gr de Tris base [Sigma – Aldrich].
- 72 gr de glicina [Sigma – Aldrich].

Disolver en 700 mL de agua destilada y completar 1 L, filtrar con gasa doble. Almacenar a T° ambiente.

BUFFER DE CORRIDA 1X

- 200 mL de buffer de corrida 5X.
- 10 mL de SDS 10%
- 790 mL de agua destilada.

ANEXO 2: Fórmulas de soluciones para procedimiento de tinción

HEMATOXILINA DE MAYER

- 50 g de alumbre de amonio
- 1000 mL de agua destilada
- 1 g de cristales de hematoxilina
- 0.2 g de yodato de sodio
- 1 g de ácido cítrico
- 50 g de hidrato de cloral

EOSINA-FLOXINA

- 1 g de eosina Y hidrosoluble mezclada con 100 mL de agua destilada (Stock de eosina).
- 1 g de floxina B mezclada con 100 mL de agua destilada (Stock de floxina).
- 100 mL de solución stock de eosina.
- mL de solución stock de floxina.
- 780 mL de etanol al 95%.
- 4 mL de ácido acético.