



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

CARACTERIZACION DEL EFECTO DE LOS
LIPOPOLISACARIDOS Y LA EXOTOXINA
PURIFICADA DEL *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DE
FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

GUADALUPE CAROLINA BARAJAS TORRES



APOYADO POR DGAPA, PROYECTO IN224398, MEXICO, D. F. 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

CARACTERIZACION DEL EFECTO DE LOS
LIPOPOLISACARIDOS Y LA EXOTOXINA
PURIFICADA DEL *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DE
FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

GUADALUPE CAROLINA BARAJAS TORRES



APOYADO POR DGAPA, PROYECTO IN224398, MEXICO, D. F. 2000

AGRADECIMIENTOS

- Con el mayor agradecimiento a la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por el apoyo y tiempo compartido en la elaboración de este trabajo.
- Al Dr. Javier Portilla Robertson por sus muy acertadas asesorías.
- A la Dirección General de Asuntos de Personal de la UNAM por el financiamiento para el proyecto IN224398.
- A nuestra casa de formación e invaluable patrimonio, la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

- Con el mayor agradecimiento a la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por el apoyo y tiempo compartido en la elaboración de este trabajo.
- Al Dr. Javier Portilla Robertson por sus muy acertadas asesorías.
- A la Dirección General de Asuntos de Personal de la UNAM por el financiamiento para el proyecto IN224398.
- A nuestra casa de formación e invaluable patrimonio, la Universidad Nacional Autónoma de México.

D E D I C A T O R I A

**Dedicado con todo cariño a mis
mejores amigos y más grandes amores:
mi mamá, David, Romina y Luis.**

D E D I C A T O R I A

**Dedicado con todo cariño a mis
mejores amigos y más grandes amores:
mi mamá, David, Romina y Luis.**

INDICE

	Pag.
1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	2
3. Antecedentes.....	3
4. Introducción.....	4
4.1 Parodonto.....	4
4.1.1 Encía.....	5
4.1.2 Hueso alveolar.....	6
4.1.3 Cemento.....	7
4.1.4 Ligamento Parodontal.....	8
4.2 Enfermedad parodontal.....	9
4.3 Etiología y clasificación de la enfermedad periodontal.....	10
4.4 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	12
4.4.1 Características de la bacteria.....	12
4.4.2 Exotoxina de A.a.....	13
4.5 Lipopolisacáridos.....	14
4.5.1 Historia.....	14
4.5.2 Estructura química.....	17
4.5.3 Clasificación por serotipos de A.a.....	18
4.5.4 Actividad biológica.....	19
4.5.5 Serotipos de A.a.....	19
4.6 Fibroblastos gingivales humanos.....	20
5. Planteamiento del problema.....	22
6. Justificación.....	23
7. Objetivos.....	24
8. Hipótesis.....	24
9. Materiales y métodos.....	26
9.1 Aislamiento de la bacteria.....	26
9.2 Medios de cultivo.....	26
9.3 Identificación de la bacteria por pruebas bioquímicas.....	26
9.4 Cultivo de fibroblastos gingivales humanos.....	27
9.5 Aislamiento de LPS.....	27
9.6 Extracción de la toxina.....	28
10. Resultados.....	28
11. Conclusiones.....	33
12. Discusión.....	34
13. Anexos.....	35
Anexo I Obtención de la bacteria.....	35
Anexo II Medio de agar sangre.....	35
Anexo III Medio de Agar chocolate.....	36
Anexo IV Medio TSBV.....	36
Anexo V Tinción de Gram.....	37
Anexo VI Aislamiento de LPS.....	37
Anexo VII Determinación de proteínas por Lowry.....	38
Anexo VIII Electroforesis.....	39
Anexo IX Tinción con plata.....	40
14. Bibliografía.....	41

INDICE

	Pag.
1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	2
3. Antecedentes.....	3
4. Introducción.....	4
4.1 Parodonto.....	4
4.1.1 Encía.....	5
4.1.2 Hueso alveolar.....	6
4.1.3 Cemento.....	7
4.1.4 Ligamento Parodontal.....	8
4.2 Enfermedad parodontal.....	9
4.3 Etiología y clasificación de la enfermedad periodontal.....	10
4.4 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	12
4.4.1 Características de la bacteria.....	12
4.4.2 Exotoxina de A.a.....	13
4.5 Lipopolisacáridos.....	14
4.5.1 Historia.....	14
4.5.2 Estructura química.....	17
4.5.3 Clasificación por serotipos de A.a.....	18
4.5.4 Actividad biológica.....	19
4.5.5 Serotipos de A.a.....	19
4.6 Fibroblastos gingivales humanos.....	20
5. Planteamiento del problema.....	22
6. Justificación.....	23
7. Objetivos.....	24
8. Hipótesis.....	24
9. Materiales y métodos.....	26
9.1 Aislamiento de la bacteria.....	26
9.2 Medios de cultivo.....	26
9.3 Identificación de la bacteria por pruebas bioquímicas.....	26
9.4 Cultivo de fibroblastos gingivales humanos.....	27
9.5 Aislamiento de LPS.....	27
9.6 Extracción de la toxina.....	28
10. Resultados.....	28
11. Conclusiones.....	33
12. Discusión.....	34
13. Anexos.....	35
Anexo I Obtención de la bacteria.....	35
Anexo II Medio de agar sangre.....	35
Anexo III Medio de Agar chocolate.....	36
Anexo IV Medio TSBV.....	36
Anexo V Tinción de Gram.....	37
Anexo VI Aislamiento de LPS.....	37
Anexo VII Determinación de proteínas por Lowry.....	38
Anexo VIII Electroforesis.....	39
Anexo IX Tinción con plata.....	40
14. Bibliografía.....	41

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1 Corte histológico del parodonto e imagen del tejido gingival	2
Fig. 2 Imagen al microscopio electrónico de las fibras de colágeno.....	8
Fig. 3 Imagen de periodontitis juvenil generalizada.....	9
Fig. 4 Imagen de Peter L. Panum.....	14
Fig. 5 Imagen de Robert Koch.....	15
Fig. 6 Imagen de Eugenio Centanni.....	16
Fig. 7 Imagen de Florence Siebert.....	16
Fig. 8 Estructura química de los lipopolisacáridos.....	17
Fig. 9 Estructura química del colágeno.....	21
Fig. 10. Imagen con microscopio electrónico de las colonias de A.a.....	28
Fig. 11 Gráfica 1. Efecto de la toxina sobre la proliferación celular de FGH.....	30
Fig. 12 Gráfica 2. Efecto de la toxina sobre la proliferación celular de FGH.....	30
Fig. 13. Gráfica 3. Efecto de la LPS sobre la proliferación celular de FGH.....	31
Fig 14 Gráfica 4. Efecto del LPS sobre la proliferación celular de FGH.....	31
Fig. 15 Gráfica 5.Efecto de la toxina el LPS sobre la proliferación celular de FGH.....	31

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1 Corte histológico del parodonto e imagen del tejido gingival	2
Fig. 2 Imagen al microscopio electrónico de las fibras de colágeno.....	8
Fig. 3 Imagen de periodontitis juvenil generalizada.....	9
Fig. 4 Imagen de Peter L. Panum.....	14
Fig. 5 Imagen de Robert Koch.....	15
Fig. 6 Imagen de Eugenio Centanni.....	16
Fig. 7 Imagen de Florence Siebert.....	16
Fig. 8 Estructura química de los lipopolisacáridos.....	17
Fig. 9 Estructura química del colágeno.....	21
Fig. 10. Imagen con microscopio electrónico de las colonias de A.a.....	28
Fig. 11 Gráfica 1. Efecto de la toxina sobre la proliferación celular de FGH.....	30
Fig. 12 Gráfica 2. Efecto de la toxina sobre la proliferación celular de FGH.....	30
Fig. 13. Gráfica 3. Efecto de la LPS sobre la proliferación celular de FGH.....	31
Fig 14 Gráfica 4. Efecto del LPS sobre la proliferación celular de FGH.....	31
Fig. 15 Gráfica 5.Efecto de la toxina el LPS sobre la proliferación celular de FGH.....	31

1. ABREVIATURAS.

A.a.	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
LPS.	Lipopolisacáridos
KDO	Azúcar componente de los lipopolisacáridos
FGH	Fibroblastos gingivales humanos
TSBV	Medio de tioglicolato, bacitracina y vancomicina

2. RESUMEN

Es un hecho confirmado que del 86--91% de la población mexicana padece alguna forma de enfermedad periodontal antes de los 45 años. El inicio de esta enfermedad posee manifestaciones clínicas fácilmente identificables como inflamación interpapilar, edema y el subsecuente sangrado. Esta condición inflamatoria facilita la acumulación de placa dentobacteriana y permite su migración a través del surco gingival, es ahí en donde las bacterias anaerobias encuentran un ambiente propicio para su desarrollo. Después de las alteraciones en la encía, el ligamento parodontal es el elemento siguiente en el daño periodontal, la síntesis de colagenasas, hialuronidasas, leucotoxinas y factores de coagulación producidos por las bacterias anaerobias, aunado a la irritación mecánica producida por la placa provocan migración apical del ligamento, exponiendo al cemento y al hueso a diversos factores en la cavidad bucal.

El A.a. es un microorganismo identificado plenamente en los procesos de periodontitis juvenil y periodontitis del adulto, es una bacteria anaerobia perteneciente al grupo de gram negativas por lo que en sus componentes de membrana se encuentran moléculas tóxicas denominadas lipopolisacáridos, los cuales actúan como mitógenos de las células B, activan la resorción osteoclastica *in vitro* y causan daño al tejido conjuntivo, especialmente a los fibroblastos (células encargadas de la síntesis de fibras de colágena). Además de lo anterior estas bacterias poseen la capacidad de sintetizar moléculas proteínicas que causan daño a los macrófagos y actúan como leucotoxinas; hechos que colocan al A.a. como una bacteria relevante en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

El alto grado de incidencia de esta enfermedad obliga al cirujano dentista a identificar los mecanismos que originan alteraciones en el parodonto. En el presente trabajo se enfatiza la importancia de las exotoxinas y endotoxinas producidas por el A.a, bacteria clave en el desarrollo de periodontitis juvenil y periodontitis del adulto; realizando estudios del daño causado por estas moléculas a los FGH, elementos decisivos en la estructura parodontal.

Nuestros resultados muestran que los lipopolisacáridos promueven una disminución en la proliferación de FGH, así mismo una toxina extraída del medio de crecimiento de A.a. por precipitación con sulfato de amonio inhibe de forma irreversible la proliferación de los mismos. Mediante la incorporación de [³H] timidina en los FGH se determinó que el pre tratamiento con lipopolisacáridos y su posterior tratamiento con la toxina extraída del medio aumentan las acciones inhibitorias sobre la proliferación celular, y en otra serie de resultados se encontramos que estos agentes promueven alteraciones morfológicas aunque las células permanecen vivas varias por semanas después de haber sido tratadas.

En conclusión determinamos que A.a es un microorganismos capaz de promover la disminución de la proliferación celular y causar alteraciones morfológicas en los fibroblastos gingivales humanos por lipopolisacáridos y exotoxinas.

3. ANTECEDENTES

Los primeros inicios en la identificación de bacterias bucales fueron realizados por el microbiólogo Robert Koch, quien describió a las primeras bacterias bucales, cuando en una de sus cartas en 1863 escribe "Mis dientes no están limpios del todo, sino que se adhiere o crece entre algunos de mis frontales y de mis muelas, una reducida materia blanca. Al examinar ésta estimé, que se trataba de una cantidad innumerable de animáculos..."^{1,2}

Años después se identificaron estos microorganismos y se dieron los primeros pasos para la identificación de toxinas bacterianas por el investigador Albert Von Haller (1708 –1777), quien reconoció que ante la inyección intravenosa de fluidos putrefactos como carne o pescado en estado de descomposición, los animales experimentaban estados febriles y otras manifestaciones de enfermedad.

Hacia 1890 Pierre Paúl Emile Roux y Alexander Yersin en el Instituto Pasteur en París manifestaron que las toxinas eran de naturaleza proteínica y el concepto de que todas las toxinas bacterianas eran proteínas fue aceptado durante muchos años.³

Con el desarrollo de técnicas de tinción bacteriana como la de Gram se puso de manifiesto el hecho de que las bacterias no poseían los mismos componentes de membrana, y que la estructura de las bacterias gram negativas era mucho más compleja. Esto proporcionó un impulso para el descubrimiento de las endotoxinas y exotoxinas y la creencia de que todas las toxinas bacterianas eran proteicas fue erradicada, conociéndose entonces la naturaleza toxica de los lipopolisacáridos, componentes de la membrana externa de las bacterias gram negativas y la síntesis de productos tóxicos que liberaban al medio externo.

Las investigaciones y la recopilación bibliográfica más novedosa acerca de los lipopolisacáridos han sido realizadas por Helmmunt Brade, quien describe de forma detallada la estructura química, los efectos biológicos y otros muchos datos de importancia de las endotoxinas bacterianas.⁴

Estas bases químicas y biológicas han permitido a investigadores como Genco, relacionar a las bacterias con características presentes en la enfermedad periodontal, y elaborar una clasificación de las enfermedades periodontales de acuerdo a las características clínicas, a la edad del paciente y a la población microbiana de placa dentobacteriana que acompaña a la enfermedad. Permitiendo entonces identificar a las bacterias gram negativas y a sus productos tóxicos como patógenos importantes en la periodontitis.⁵

Con todos estos avances ha sido posible establecer las bases para la comprensión de los mecanismos dañinos de las bacterias, integrando en conjunto los efectos tóxicos que causan los lipopolisacáridos y las toxinas proteicas liberadas al medio.

4. INTRODUCCION.

4.1 PARODONTO.

El diente totalmente erupcionado posee un conjunto de elementos que le proporcionan soporte, nutrición, protección y sensibilidad dentro de la cavidad bucal durante el desarrollo de los actos de oclusión y masticación.⁶ Este grupo de elementos es nombrado en su conjunto parodonto y en su descripción más básica se encuentra compuesto por cuatro elementos fundamentales: encía, hueso alveolar, cemento y ligamento parodontal. (Fig.1)

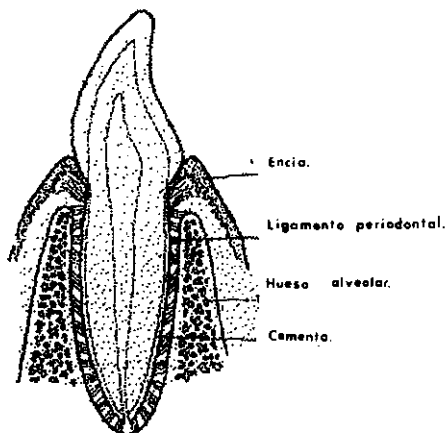


Fig.1 Corte histológico vestibulolingual que muestra los elementos del tejido periodontal (superior) y tejido gingival sano de un varón de 21 años (inferior). Tomado de Hoag, P.L. y Pawlak E.A. Fundamentos de Periodoncia 4a ed. The Mosby Company.

4.1.1 Encía.

La encía es la parte de la mucosa bucal que cubre los procesos alveolares y rodea los cuellos dentarios. Se encuentra dividida por una línea imaginaria llamada hendidura gingival en encía libre y encía insertada. La encía libre se localiza desde el fondo del surco gingival hasta la superficie gingival visible opuesta a él, la encía insertada se extiende desde este punto hasta la unión mucogingival, continuándose sin demarcación con la membrana mucosa del carrillo, labio y piso de boca.⁷

Las encías poseen epitelio queratinizado con papilas de tejido alta y ricamente vascularizadas, lo que le confiere el color rosado. La lámina propia es una capa de tejido conectivo denso que sirve como medio de inserción para todos los grupos de fibras. La encía se forma de gruesas fibras de colágeno que se continúan con el periostio del alveolo puesto que no existe submucosa. Recibe aporte sanguíneo de vasos supraperiosticos derivados de las arterias lingual, mentoniana, bucal y palatina.⁸

La porción de la encía coronal a la cresta alveolar posee numerosas fibras colágenas que en su mayoría se encuentran distribuidas al azar por todo el tejido conectivo, sin embargo otras se encuentran organizadas en fascículos con orientaciones precisas y directas. Las cuales con una finalidad práctica han sido llamadas de acuerdo al trayecto que trazan, recibiendo nombres como: circulares, dentogingivales, dentoperiósticas, interpapilares, miocirculares, intergingivales, transgingivales y transeptales.

El surco gingival es la parte de la encía que se encuentra formada en su parte blanda por la cara interna de la encía libre y en su parte dura por la superficie dental próxima al cuello dentario⁹. Diversos estudios han demostrado que existe flujo de líquido histico a través del epitelio del surco debido probablemente a permeabilidad vascular.^{10,11}

Bajo un punto de vista clínico la encía sana tiene que cumplir con ciertos requerimientos cualitativos que son: color rosa pálido en comparación con el rojo de la mucosa bucal aunque puede variar significativamente con las características raciales; puede o no presentar un puntilleo que simula la superficie de la cáscara de una naranja, siendo menos sobresaliente en la niñez que en la edad adulta; la papila debe tener forma de cuchillo con punta redondeada; el margen de la encía debe describir un trayecto ondulado de acuerdo a la posición de los dientes; debe encontrarse resistente y firmemente adherida a los tejidos duros, la encía marginal aunque móvil debe estar adaptada a la superficie del diente, todo esto aunado a la ausencia de inflamación y hemorragia.^{12,13, 14}

4.1.2 Hueso alveolar.

Es la parte de los maxilares que forma alvéolos en los cuales se encuentran incluidas las raíces dentarias. El hueso alveolar se encuentra constituido 65% de material inorgánico (hidroxiapatita depositada sobre y entre las moléculas de colágena) y 35% de material orgánico (colágena tipo I alojada en una sustancia fundamental de glucoproteínas, proteoglicanos, sialoproteínas y lípidos).

Como los osteoblastos secretan matriz orgánica a el hueso, al principio carece de sales minerales y se denomina tejido osteoide. A medida que este material es producido algunos osteoblastos quedan incluidos en él, llamándose entonces osteoclastos.¹⁵

Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas que pueden tener mas de 12 núcleos. En general se encuentran en depresiones en forma de bahía en el hueso denominadas lagunas de Howship. En el hueso compacto estas láminas óseas están dispuestas fundamentalmente forma céntrica rodeando canales longitudinales de hueso denominados conductos de Havers, que forman los sistemas de Havers u osteonas.^{16, 17}

Pueden diferenciarse dos partes en el proceso alveolar: la primera consiste en una lámina de hueso que rodea la raíz del diente y presta inserción a las fibras principales del ligamento parodontal y se conoce como hueso alveolar. La segunda parte es el hueso que rodea al hueso alveolar propiamente dicho y da soporte al alvéolo y se denomina hueso alveolar de sostén. Este último contiene dos partes:

- 1) Láminas corticales, las cuales consisten de hueso compacto y forman la tabla interna y externa de los procesos alveolares.
- 2) Hueso esponjoso, que llena el área entre estas laminas.

El hueso que forma la pared interna del alvéolo se encuentra perforado por muchos orificios pequeños que llevan ramas de nervios intraalveolares y vasos sanguíneos hacia el ligamento parodontal. Los espacios medulares del proceso alveolar pueden contener médula hematopoyética, aunque por lo común contienen médula grasa. En el proceso condilar, en el ángulo de la mandíbula y en otros focos aislados se encuentra médula hematopoyética.^{18, 19}

Las láminas corticales se continúan con las capas compactas del cuerpo maxilar y la mandíbula y son generalmente mucho mas delgadas en la maxila que en la mandíbula, sobre todo en las áreas furcales,

El hueso fasciculado es aquel en el cual están ancladas las fibras principales del ligamento periodontal. Se caracteriza por la cicatrización de las fibras en la sustancia intercelular y contiene mayor cantidad de fibras que el hueso laminar.²⁰ Dado que contiene más sales de calcio por unidad de área que otros tipos de tejido óseo estas áreas aparecen como radiopacas en las radiografías.²¹

4.1.3 Cemento.

Es un tejido duro cuya sustancia intercelular se calcifica y se deposita en capas alrededor de la dentina. El cemento contiene 45 % de sustancia inorgánica (calcio y fosfato en forma de hidroxiapatita), 55% de material orgánico (colágena tipo I y proteoglucanos) y agua.

El cemento se conforma por fibras colágenas empacadas en forma densa con otras fibras adyacentes que son la continuación de las fibras colágenas del ligamento periodontal.²²

De manera general el cemento ha sido clasificado en cemento celular y cemento acelular. El cemento acelular es transparente, amorfo y contiene mucho más calcio que el cemento celular, rodea casi toda la raíz del diente a excepción de tercio apical en donde se encuentra el cemento celular. El cemento celular posee los mismos componentes orgánicos e inorgánicos que el cemento acelular con algunas diferencias en su organización.

El cemento tiene su máximo espesor en el ápice lo cual contribuye a la longitud de la raíz, y es delgado al máximo en la unión cemento-adamantina. Ocasionalmente el cemento se extiende durante un breve trecho hasta la pared interna de la dentina. Las fibras colágenas del ligamento parodontal se continúan dentro del cemento y se denominan fibras de Sharpey, que constituyen la porción sustancial orgánica del cemento. Cuando el cemento se mantiene relativamente delgado las líneas de Sharpey son capaces de atravesarlo en todo su interior; con aposición ulterior del mismo una gran parte de las fibras queda incorporada en el cemento. El cemento no puede restitirse como el hueso pero si puede continuar su crecimiento por aposición de nuevas capas.²³

4.1.4 Ligamento parodontal.

El ligamento parodontal es un sistema tejido conectivo en donde fibras colágenas conectan el hueso alveolar con el cemento de las raíces dentarias, las fibras se disponen como elementos conectores que se extienden en el cemento como fascículos paralelos de fibras colágenas de tipo I y III, poseen además proteínas de matriz extracelular como proteoglicanos y fibronectina.²⁴

Las fibras de Sharpey están incluidas fundamentalmente en el cemento y el hueso alveolar y se extienden a través del ligamento periodontal, lo cual le permite sostener al diente en el orificio radicular y al mismo tiempo le permite cierta amortiguación. (Fig. 2)

A través de ligamento cruzan vasos sanguíneos, linfáticos y elementos nerviosos, que aportan al ligamento nutrición, sensibilidad, propiocepción y localización de estímulos de la masticación. Dentro de su estructura posee elementos celulares conformados como cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos, células epiteliales y fibroblastos.

Las fibras del ligamento parodontal poseen una clasificación en grupo de acuerdo a la dirección que cursan, de esta forma encontramos a:

- Grupo de la cresta alveolar: van del cuello dentario a la cresta alveolar.
- Grupo horizontal: van del diente al hueso alveolar.
- Grupo oblicuo: van del cemento al alveolo.
- Grupo apical: van del ápice al hueso.²⁵



Fig. 2 Imagen con el microscopio electrónico de las fibras de colágeno. En la parte inferior a la derecha se observan las microfibrillas de colágeno cortadas en sentido longitudinal, formando fibrillas de colágeno paralelas. Las fibras están cortadas transversalmente en el extremo inferior a la izquierda de la imagen. (Tomada de Genneser. Histología. Segunda edición)

4.2 ENFERMEDAD PARODONTAL.

Las enfermedades que afectan al parodonto ocurren en un ambiente bucal de complejidad poco común, ya que abarcan un grupo variado de tejidos especializados que degeneran progresivamente. Los primeros estadios de enfermedad periodontal se presentan como ligeras alteraciones de la encía, lo que se denomina gingivitis, que es el padecimiento parodontal más frecuente y se define como la inflamación de la encía por excesiva acumulación de placa dentobacteriana en el margen gingival. Su diagnóstico temprano se manifiesta por las siguientes características clínicas: cambio de color de la encía, de rosa coral a rojo o rojo azulado, cambio de forma (de delgado y con borde afilado a edematoso e inflamado), cambio de textura por pérdida del puntilleo gingival, además de hemorragia y exudado. Histológicamente existe inflamación por infiltración de células inflamatorias en el tejido conectivo, aumento de espacios intercelulares e infiltración de células inflamatorias en el epitelio de unión.²⁶

Los estadios avanzados de gingivitis crean medios favorables para el progreso en la destrucción de los tejidos de soporte del órgano dentario que se denomina periodontitis. La periodontitis es un estado de inflamación de la encía, caracterizado por la migración apical o pérdida del ligamento parodontal.

A diferencia de la periodontitis juvenil que afecta a 0.35 – 1% de la población de adolescentes y adultos jóvenes, la mayoría de las formas de periodontitis se desarrolla durante los primeros decenios de la vida, avanza hacia el tercero o cuarto, en donde su incidencia aumenta de modo significativo.²⁷ (Fig.3)



Fig. 3 Periodontitis generalizada
(Tomado de Hoag, P.L. y Pawlak E.A. Fundamentos de Periodoncia 4a ed. The Mosby Company)

4.3 ETIOLOGÍA Y CLASIFICACION DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL-

Después de una higiene bucal adecuada solo existen unas pocas bacterias en el margen gingival, al transcurrir las primeras ocho horas de abstinencia de alimentos existen 10^2 bacterias por mm^2 de superficie dentaria y en un día la cantidad de bacterias puede llegar a multiplicarse de 100 a 1000 veces.²⁸

La acumulación de bacterias a lo largo del margen gingival durante 3-4 días da como resultado la inflamación del margen gingival, conocido como gingivitis, esta condición crea nuevas oportunidades para el crecimiento de bacterias y comienza una modificación continua en la composición de la comunidad microbiana oral. En la primera fase de la gingivitis se establecen cocos y bacilos gram + y gram -, en la segunda fase se establecen elementos filamentosos y en la tercera espirilos y espiroquetas. Una vez establecida la gingivitis se registra un incremento en la cantidad de bacterias anaerobias en relación con las anaerobias facultativas. Por lo que se considera a la placa dentobacteriana como el principal factor etiológico en el desarrollo de la enfermedad periodontal.^{29, 30}

Sin embargo existen formas de enfermedad periodontal cuyo origen es de tipo inflamatorio u otros estados patológicos del periodonto en el que la placa dentobacteriana y los microorganismos comprendidos en ella juegan un papel mínimo, como es el caso de enfermedades parodontales producidas por atrofia gingival, traumatismo oclusal primario, fibromatosis por idantoinatos, entre otras.

De acuerdo al grado de destrucción del parodonto, la periodontitis se divide en tres fases principales:

Periodontitis inicial. La profundidad de la bolsa periodontal es de 4 mm y existe una ligera pérdida de la inserción del tejido conectivo y el hueso alveolar.

Periodontitis moderada. Es una destrucción acrecentada de los tejidos parodontales en donde existe una notable pérdida del soporte óseo acompañada en ocasiones por movilidad dentaria.

Periodontitis avanzada. Es una progresión considerable de la periodontitis con pérdida mayor del soporte alveolar y aumento de la movilidad dentaria.

Existe además una clasificación basada en las características clínicas, la edad del paciente y las bacterias que colonizan la placa. Diversos estudios han demostrado que las diferentes formas de enfermedad parodontal se relacionan con las distintas cualidades de las placas dentales y se cree que las bacterias específicas son la causa del origen y el progreso de las enfermedades del periodonto

A continuación se presenta una tabla con los principales microorganismos subgingivales relacionados con enfermedades periodontales.³¹

ENFERMEDAD	MICROORGANISMOS.
Gingivitis ulcero necrosante aguda	<i>Bacteroides intermedius</i> <i>Espiroquetas</i>
Periodontitis del adulto	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Bacteroides forsythus</i> <i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Especies Eubacterium</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Wolinella recta</i>
Periodontitis juvenil localizada	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Especies de bacteroides</i>
Periodontitis juvenil generalizada	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Bacteroides gingivales</i> <i>Bacteroides intermedius</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Neisseria</i>
Periodontitis refractaria	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Bacteroides forsythus</i> <i>Bacteroides gingivalis</i> <i>Bacteroides intermedius</i>
Periodontitis relacionada con diabetes Sacarina insulinodependiente.	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Vibrios anaerobios</i> <i>Campylobacter</i> <i>Capnocytophaga</i>
Periodontitis relacionada con diabetes sacarina no insulinodependiente.	<i>Bacteroides gingivales</i> <i>Bacteroides intermedius</i> <i>Especies de Fusobacterium</i>

Tomado de Genco. Parodontia. 1998.

4.4 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Actinobacillus:

Actino (estrella). Se refiere a la morfología interna de las colonias, ya que en medios de cultivo sólidos presentan esta forma.

Bacillus (bacilo). Designa la forma celular del microorganismo.

Actinomycetemcomitans: Significa junto a actinomyces, ya que la primera vez que fue aislado se encontró en lesiones de actinomicosis cervical junto con actinomyces israelí.³²

Clasificación taxonómica de la bacteria.

Reino	Monera
Familia	Pasteurellaceae
Genero	Actinobacillus
Especie	actinomycetemcomitans

4.4.1 Características de la bacteria.

Actinobacillus actinomycetemcomitans se ha reconocido como un parásito estrictamente humano que en algunas condiciones pertenece a la flora bucal habitual. Es una bacteria de forma bacilar o cocobacilar que mide de 0.3µm – 0.5µm por 0.6µm – 1.2µm. Estructuralmente se trata de una bacteria que ocasionalmente puede expresar factores de adherencia como cápsulas y fimbrias dependiendo del medio en que se encuentre, es además fermentadora de azúcares y su nicho bucal primario dentro de la cavidad oral es la placa dentobacteriana.

A la tinción de Gram se reconoce como una bacteria Gram negativa, la cual se clasifica por medio de más de 150 antígenos somáticos tipo O, conocidos como lipopolisacáridos; más de 100 antígenos tipo K termolábiles, y más de 50 antígenos tipo H o flagelares.³³

Corresponde a las bacterias anaerobias facultativas, las cuales son capaces de obtener energía y crecer oxidativamente utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones (respiración aerobia), o bien pueden crecer bajo condiciones de anaerobiosis obteniendo energía por vías fermentativas, usando compuestos orgánicos como aceptores finales de electrones.

Produce diversos factores de virulencia entre los que se encuentran factores de destrucción tisular como endotoxinas lipopolisacáridas, una colagenasa que daña al tejido conectivo gingival y un factor que evita la cicatrización. Sintetiza también diversos factores que le permiten evitar los mecanismos de defensa del huésped, dentro de ellos el principal es una leucotoxina, un factor termolábil que puede destruir los leucocitos polimorfonucleares e inhibir la quimiotaxis en el sitio de infección.³⁴

4.4.2 EXOTOXINA DE *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Los mecanismos patógenos del *Actinobacillus actinomycetemcomitans* no son bien comprendidos aún, lo que se sabe con certeza es que este microorganismo produce una variedad de potentes factores de virulencia entre los que incluyen leucotoxinas de la familia de las citolisinas.

La leucotoxina de A.a. exhibe una única especificidad citolítica que destruye los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, mientras que los fibroblastos, eritrocitos, plaquetas y células epiteliales son resistentes a esta lisis.

En general los mecanismos de la leucotoxina median la lisis celular, involucrando la rápida formación de cationes que forman poros y conducen a la lisis osmótica.

La leucotoxinas son expresadas por 4 genes operones, que se han designado en orden transcripcional como: *ltxC*, *ltxA*, *ltxB* y *ltxD*.

El gene estructural *ltxA* codifica las leucotoxinas, un péptido de 116 kDA, que exhibe entre el 40 y 50 % de identidad como α , hemolisina de *E. Coli* y la leucotoxina de *P. haemolítica*. Los tres genes restantes *ltxB*, *ltxC*, y *ltxD* son requeridos para la activación y el transporte de la leucotoxina

La primera translación del producto del gene es activada por el producto del gene *ltxC*. La toxina activada es entonces transportada por una señal péptido independiente, mecanismo para el cual se requiere el producto de los genes *ltxB* y *ltxD*.

El producto del gene *ltxA* se divide en 4 regiones o dominios. 1) el dominio N-terminal, 2) el centro dominio, 3) un dominio de repetición, 4) el dominio terminal.

La translocación de la leucotoxina del citoplasma de la bacteria hacia la membrana celular es dependiente de los productos de los genes *ltxB* y *ltxD*.

Los nucleótidos y secuencias de aminoácidos exhiben una fuerte homología hacia genes *b*, encontrados en otras especies de bacterias incluyendo la secuencia de α - hemolisina de *E. Coli* y *P. haemolítica*. También es significativa la homología entre genes de mamíferos, que codifican a proteínas para la resistencia a múltiples drogas, la porción carboxilo de la molécula es homóloga a grupos de proteínas procarióticas y eucarióticas con funciones de transporte de azúcares, vitaminas y oligopéptidos a través de la membrana celular y muchos genes que regulan difusión celular y la reparación del DNA, indican que el *ltxB* es parte de una familia de supergenes que se encargan del transporte de proteínas.³⁵

4.5 LIPOPOLISACÁRIDOS

4.5.1 HISTORIA.

Muchos han sido los conocimientos obtenidos a través del tiempo acerca de las toxinas bacterianas, los inicios de estas investigaciones comenzaron con los estudios realizados por el investigador Albert Von Haller (1708 –1777), quien reconoció que ante la inyección intravenosa de fluidos putrefactos como carne o pescado en estado de descomposición, los animales experimentaban manifestaciones de enfermedad.

Años después el profesor alemán de patología Dane Peter L. Panum (Fig.4) considerado como el pionero de las investigaciones de endotoxinas bacterianas realizaba diversos estudios intentando purificar el principio activo de potentes venenos que se obtenían a partir de materia orgánica en estado de descomposición, de sus trabajos pudo resumir lo siguiente:

1. El veneno producido por materia putrefacta no es volátil, y es conocido como un producto final de la putrefacción o fermentación.
2. Las toxinas que se producen de lo anterior son resistentes al calor y a diferentes formas de enzimas, son insolubles en alcohol y solubles en agua.
3. Esta materia puede ser diferente a la vida de los microorganismos y podría ser el origen o la causa de las alteraciones que producen.

Las ideas de Panum fueron continuadas por Ernest von Bergma, un profesor alemán quien definió a la sustancia responsable de la intoxicación por elementos putrefactos como SEPSINA, desgraciadamente sus trabajos fueron interrumpidos por la guerra franco – prusiana.³⁶



Fig. 4 Peter L. Panum
(1820 – 1885)

En 1884 Robert Koch reveló que muchas bacterias patógenas producen sustancias tóxicas, las cuales en forma aislada inducen reacciones fatales como las observadas durante infecciones bacterianas severas (Fig. 5).

Fue también Robert Koch quien describió a las primeras bacterias bucales, cuando en una de sus cartas en 1863 escribe: "Es mi hábito por las mañanas frotar mis dientes con sal, y un montadientes. No obstante mis dientes no están limpios del todo, sino que se adhiere o crece entre algunos de mis frontales y de mis muelas, siempre que los inspecciono con un espejo de aumento, una reducida materia blanca, que es tan espesa como si fuera una pasta. Al examinar ésta estimé, aún cuando no pude discernir lo móvil que era, que se trataba de una cantidad innumerable de animáculos, que toda la gente que vive en los países bajos no son tantos como los animales vivientes que porto en mi propia boca."

Años después en 1890 la toxina de la difteria fue aislada por filtrados de cultivos que realizaban Pierre Paúl Emile Roux y Alexander Yersin en el Instituto Pasteur en París. Estos investigadores manifestaron que la toxina era de naturaleza proteínica y el concepto de que todas las toxinas bacterianas eran proteínas fue aceptado durante muchos años.³⁷



Fig. 6 Robert Koch (1843-1910) sentado al Frente del microscopio con Richard Pfeiffer (1858 - 1945), en el descubrimiento de la endotoxina.

Los primeros pasos en la caracterización de endotoxinas, fueron dados por el Italiano Eugenio Centanni (1863 –1948) (Fig. 6) director del Instituto General de Patología de la Universidad de Bolonga, en sus ensayos describe la preparación a la que el llamó pirotoxina bacterica, término que utilizó para los cultivos puros de bacterias.

La primera conferencia internacional dedicada a las endotoxinas bacterianas se llevó a cabo en Nueva York en 1952 y fue organizada por Florence Seibert (Fig 7). La segunda conferencia y la primera en Europa se llevó a cabo en Alemania en 1958 y fue organizada por Otto Weastphal. Estas conferencias pioneras fueron seguidas por muchas otras que aumentaron su frecuencia por lo menos a intervalos anuales con un incremento de científicos de todo el mundo, hasta que en el 1988 fue fundada la Sociedad Internacional de Endotoxinas (IES) y en 1994 el Journal of Endotoxin Research.^{36,39}



**Fig. 6 Eugenio Centanni
(1863 – 1948)**



**Fig. 7 Florence Seibert
(1897 – 1991)
Recibiendo un premio de
Eleanore Roosevelt (derecha)
en la Casa Blanca en 1944.**

4.5.2 ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS.

Todas las bacterias gram negativas poseen una membrana externa que actúa como una efectiva barrera de permeabilidad contra agentes nocivos externos, en donde el lipopolisacárido es considerado como la llave molecular para el funcionamiento de estas propiedades. Existen aproximadamente de 3 a 4 millones de moléculas de LPS por cada célula y funcionan no solo como una potente endotoxina, sino también como el mejor constituyente de la estructura de la membrana externa de las bacterias gram negativas, cubriéndola en aproximadamente el 75% de la superficie, el resto se encuentra cubierto por proteínas llamadas "porinas" que forman pequeños canales en las membranas plasmáticas de las células y permiten la difusión de pequeños compuestos hidrofílicos como mono y disacáridos que sirven de nutrientes y retienen efectivamente todos los compuestos grandes y los compuestos hidrofóbicos. (Fig. 8)

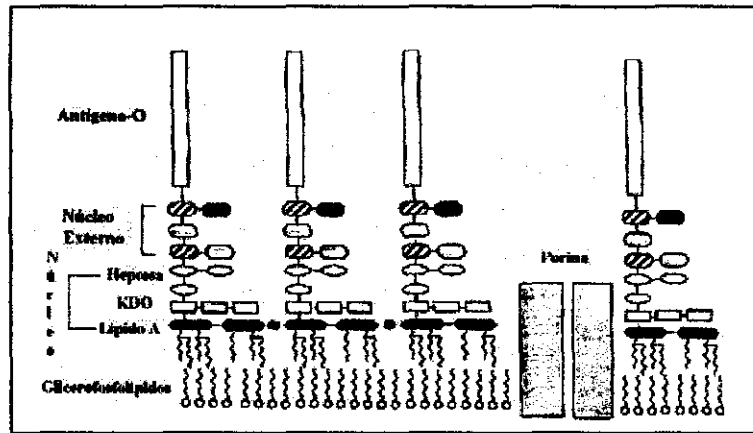


Fig. 8 Estructura de la superficie de las bacterias gram negativas. A la izquierda se describe de inferior a superior: la membrana de glicerosfosfolípidos considerada como una membrana interna, el centro compuesto por el lípido A y diversos azúcares como KDO y heptosas y finalmente una cadena de polisacáridos conocidos como antígeno O hacia la parte externa de la molécula.

Todos los lipopolisacáridos se encuentran localizados hacia la parte externa de una red formada por glicerosfosfolípidos y se componen de tres regiones genética y estructuralmente distintas que son:

- 1) Una porción lipídica conocida como lípido A que funciona como la porción tóxica.

2) Un centro interno oligosacárido que proporciona especificidad antigénica a las bacterias por serotipos y que comúnmente en casi todas las bacterias cuenta con dos azúcares inusuales: heptosa y KDO.

3) Finalmente una cadena de polisacáridos (como porción final hacia el exterior) conocida como antígeno O

Los grupos carboxilo del KDO, la heptosa y los residuos fosfato en el lípido A, convierten al lipopolisacárido en una molécula aniónica. Cationes divalentes como magnesio y calcio conectan a las moléculas de lipopolisacáridos horizontalmente a través de un puente iónico.

El alto orden estructural de los lipopolisacáridos puede establecerse por diversos factores:

- 1) La íntima interacción de moléculas lipopolisacáridos mediante cationes divalentes que forman un puente para las moléculas aniónicas del lipopolisacárido.
- 2) El efecto de un centro de dominio.
- 3) La ocurrencia de residuos fijos de ácidos grasos que es aproximadamente de 6 a 7 por cada molécula de lipopolisacárido para la unión con los glicerofosfolípidos.⁴⁰

4.5.3 Clasificación por serotipos de A.a. de acuerdo a su centro sacárido.

Existen 5 serotipos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. El serotipo b se encuentra fuertemente vinculado con el desarrollo de periodontitis juvenil localizada. Diversos estudios demuestran que el suero de pacientes con PJI contiene anticuerpos IgG que se encuentran encargados de reconocer las diversas formas de A.a., incluyendo las proteínas de membrana externa, leucotoxinas y LPS. El antígeno de serotipo b es el antígeno inmunodominante de A.a., es una molécula que ha demostrado resistencia a los tratamientos con calor (100 C, 45 minutos). Basado en análisis composicionales y estructurales se ha propuesto que este antígeno es un polímero lineal compuesto de unidades repetidas de disacáridos que contienen L ramnosa y D fructuosa en aproximadamente las mismas cantidades

4.5.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Los lipopolisacáridos promueven la resorción osteoclástica in vitro, actúan como mitógenos de los linfocitos B, producen necrosis tumoral hemorrágica en cualquier célula del cuerpo humano, pueden inhibir la síntesis proteica del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN) en células de tejido conjuntivo y epitelial, promueven también la liberación de inmunoglobulinas en particular de IgG que a su vez tiene la capacidad de activar la cascada de complemento, movilizar las células fagocitarias y promover el ataque membranolítico sobre organismos gram negativos susceptibles, incrementar la permeabilidad vascular y opsonizar. Las IgG comprenden distintas subclases que van de IgG1 a IgG4. En general los antígenos lipídicos inducen preferentemente la producción de IgG1 e IgG3, mientras que IgG4 solo es liberado tras una larga exposición a antígenos proteínicos.

El serotipo b, en particular el centro polisacárido, ha demostrado ser el mejor receptor para los anticuerpos IgG en el suero de pacientes con periodontitis juvenil. Se ha demostrado que IgG1 e IgG2 actúan como anticuerpos para el serotipo b.

4.5.5 Serotipos de A.a

El *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en especial el serotipo b se ha determinado como el antígeno inmunodominante y se encuentra fuertemente asociado con el desarrollo de periodontitis juvenil. Diversos estudios demuestran que el suero de estos pacientes contiene anticuerpos IgG que reconocen las diversas formas de los antígenos del A.a, incluyendo las proteínas de membrana externa, leucotoxinas y lipopolisacáridos. Al parecer el antígeno b no solo induce la liberación de IgG sino también de IgA e IgM. El antígeno b es una molécula resistente al calor y a la digestión con papaina.

4.6 FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

El fibroblasto es una célula fusiforme de origen mesenquimatoso, encargada de formar fibras de tejido conectivo y de la secreción de sustancias intercelulares como colágena tipo I y III. El aspecto del fibroblasto varía notablemente en los distintos tejidos dependiendo de su nivel de actividad. En el tejido conectivo maduro normal se observa en cortes coloreados con hematoxilina-eosina como células bastante grandes, achatadas o ahusadas con finas prolongaciones. Por lo general solo se observa un núcleo oval, algo achatado que contiene 1 o 2 nucléolos. Cuando los fibroblastos se encuentran en un estado inactivo son llamados por algunos autores fibrocitos.

Cuando posee un gran aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso notable se considera como un fibroblasto activo, de este modo adquiere aspecto de una célula glandular activa ocupada en la síntesis y secreción de componentes extracelulares.

Las fibras de colágeno son las fibras más frecuentes del tejido conectivo. Se encuentran formadas por fibras más finas llamadas fibrillas, compuestas a su vez por microfibrillas que son la unidad fibrilar del colágeno y se encuentran formadas por unidades menores de tropocolágeno, el cual a su vez se encuentra compuesto por 3 cadenas polipeptídicas denominadas cadenas alfa compuestas de dos aminoácidos, prolina e hidroxiprolina (Fig. 9). En las degradaciones patológicas de colágeno por el organismo, por ejemplo debida a resorción ósea aumentada, se lleva a cabo la excreción de cantidades importantes de hidroxiprolina por la orina.^{41, 42, 43}

Las fibras colágenas se encuentran suspendidas en una sustancia interfibrilar amorfa formada por compuestos proteoglucanos y glucosaminoglucanos, los cuales desarrollan una importante función en el mantenimiento de la fisiología del tejido. Estas fibras tienen la cualidad de ser flexibles con lo cual fortalecen al tejido conectivo y permiten un cierto grado de movimiento y resistencia a la tracción longitudinal. Las fibras colágenas representan alrededor del 50% del peso seco de todo el ligamento en dientes totalmente erupcionados. Al rededor del 90% de la colágena del ligamento es insoluble.

Las principales fibras gingivales y del ligamento periodontal se encuentran formadas por múltiples fascículos de colágena.⁴⁴

El ligamento periodontal posee dentro de su estructura elementos celulares conformados entre los que se encuentran los fibroblastos, que especialmente en este sitio contienen numerosas vacuolas que encierran fibras colágenas, lo que sugiere que los fibroblastos contribuyen a la eliminación de colágeno mediante endocitosis de fibras, por lo cual no solo son una fuente nueva de colágeno sino que también intervienen en la remodelación de las fibras.

Se puede concluir que para todos los elementos que conforman al parodonto los fibroblastos son de suma importancia, ya que son los secretores de la colágena que los conforma, protege y da resistencia.⁴⁵

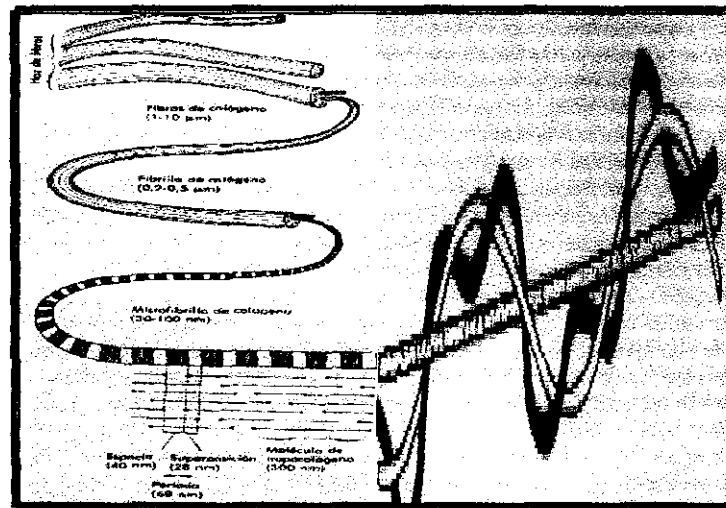


Fig. 9 A la izquierda de la ilustración se muestra un dibujo esquemático de la estructura del colágeno en el tejido conectivo, desde el haz de fibras hasta la composición molecular de las microfibrillas.

A la derecha se muestra la interpretación actual de la triple espiral de la molécula de colágeno. Con negro se muestra un segmento de una de las tres cadenas alfa que unidas forman la molécula. Las cadenas alfa se enrollan sobre su eje, mostrado en blanco, que a su vez se enrolla sobre el eje común de la molécula.

(Tomado de Gennesar. Histología. Segunda ed.)

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La clave para el éxito de la odontología se basa en el hecho de que todo tratamiento debe cimentarse sobre estructuras parodontales sanas, que permitan y garanticen la correcta funcionalidad y duración de restauraciones en la cavidad bucal. Es por ello que el alto grado de incidencia de la enfermedad periodontal obliga al cirujano dentista a la mejor comprensión de los mecanismos que originan alteraciones en el parodonto.

El *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es una bacteria de suma importancia en el desarrollo de la enfermedad periodontal especialmente en los procesos de periodontitis juvenil y periodontitis del adulto, este bacilo o coccobacilo posee diversos elementos tóxicos, como proteínas que sintetiza y transporta al exterior, además de compuestos formados por lípidos y azúcares que han recibido el nombre de lipopolisacáridos, los cuales han sido mencionados como agentes directos en el daño a los elementos que componen el parodonto.

Con la obtención de bacterias a partir de pacientes con enfermedad periodontal y aislamiento de fibroblastos gingivales a partir de pacientes sometidos a extracción dental o cirugía bucal, se procesarán las muestras hasta obtener lipopolisacáridos, exotoxinas y fibroblastos gingivales clonados para realizar un estudio del daño causado por estas moléculas a los fibroblastos gingivales humanos.

6. JUSTIFICACIÓN.

Es un hecho confirmado que el 86 – 91 % de la población mexicana padece alguna forma de enfermedad periodontal antes de los 45 años. El inicio de esta enfermedad posee manifestaciones clínicas fácilmente identificables como inflamación interpapilar, edema y sangrado. Esta condición inflamatoria facilita la acumulación de placa dentobacteriana y permite su migración a través del surco gingival, es ahí en donde las bacterias anaerobias encuentran un ambiente propicio para su desarrollo.

El *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es una bacteria identificada plenamente en los procesos de periodontitis juvenil y periodontitis del adulto, es anaerobia y pertenece a las bacterias gram negativas por lo que en sus componentes de membrana se encuentran moléculas tóxicas denominadas lipopolisacáridos, los cuales actúan como mitógenos de las células B , activan la resorción osteoclástica in vitro, propician la formación de complejos inmunes inadecuados, y causan daño a las células del tejido conjuntivo, especialmente a los fibroblastos (células encargadas de la síntesis de fibras colágenas). Además de lo anterior estas bacterias poseen la capacidad de sintetizar moléculas proteínicas que causan daño a los macrófagos y actúan como leucotoxinas. Todas estas características colocan al A.a como una bacteria relevante en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Con la finalidad de que el cirujano dentista comprenda ampliamente el desarrollo de los procesos que involucran a la enfermedad periodontal le es obligatorio conocer directamente los mecanismos y causas que involucran la destrucción del parodonto y buscar estrategias que permitan controlar esta enfermedad, reflejándose entonces en la mejoría de atención integral al paciente.

7. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los efectos de lipopolisacáridos y exotoxinas proteicas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sobre la proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtención de muestras de placa dentobacteriana a partir de pacientes con periodontitis juvenil.
- Aislamiento de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- Identificación de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mediante técnicas de tinción de Gram, pruebas bioquímicas y características macroscópicas y microscópicas.
- Determinación de los efectos de los lipopolisacáridos y exotoxinas proteicas sobre la proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos.

8. HIPOTESIS.

HIPOTESIS VERDADERA

- Si las endotoxinas lipopolisacáridas y las exotoxinas proteicas del *Actinobacillus actinomycetemcomitans* poseen un efecto sinérgico, entonces al ser expuestas a fibroblastos gingivales humanos aumentará su toxicidad.

HIPOTESIS NULA.

- Si las endotoxinas lipopolisacáridas y las exotoxinas proteicas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* no poseen un efecto sinérgico, entonces al ser expuestas a fibroblastos gingivales humanos no aumentará su toxicidad.

7. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los efectos de lipopolisacáridos y exotoxinas proteicas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sobre la proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtención de muestras de placa dentobacteriana a partir de pacientes con periodontitis juvenil.
- Aislamiento de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- Identificación de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mediante técnicas de tinción de Gram, pruebas bioquímicas y características macroscópicas y microscópicas.
- Determinación de los efectos de los lipopolisacáridos y exotoxinas proteicas sobre la proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos.

8. HIPOTESIS.

HIPOTESIS VERDADERA

- Si las endotoxinas lipopolisacáridas y las exotoxinas proteicas del *Actinobacillus actinomycetemcomitans* poseen un efecto sinérgico, entonces al ser expuestas a fibroblastos gingivales humanos aumentará su toxicidad.

HIPOTESIS NULA.

- Si las endotoxinas lipopolisacáridas y las exotoxinas proteicas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* no poseen un efecto sinérgico, entonces al ser expuestas a fibroblastos gingivales humanos no aumentará su toxicidad.

9. MATERIALES Y METODOS.

Equipo

- Jarra de anaerobiosis
- Mechero de gas
- Incubadora
- Autoclave
- Liofilizadora
- Asas para cultivo
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cámara de New Vawer
- Incubadora celular
- Contador de centelleo
- Fuente de poder
- Centrífuga
- Ultracentrífuga
- Vasos de precipitado
- Pipetas
- Micropipetas
- Matraces
- Cajas petri
- Vortex
- Viales
- Membranas para diálisis
- Refrigerador -70°C
- Microscopio óptico
- Esterilizador
- Lugol
- Safranina
- Fenol
- Agua bidestilada
- Desoxirribonucleasa
- Ribonucleasa
- Potasio dihidratado
- Albúmina sérica
- Acrilamida tris
- SDS
- Hemoglobina 2%
- TEMED
- Glicerol
- Carbonato de sodio
- Ácido acético
- Ferrocianuro de potasio
- Tiosulfato de sodio
- Metanol
- Suero de caballo
- Folín
- Vancomicina
- Bacitracina
- Extracto de levadura
- Arabinosa
- Lactosa
- Manitol
- Rafinosa
- Sorbitol
- Sucrosa
- Tetralosa
- Glucosa
- Fructuosa
- Galactosa
- Ribosa
- Esculina
- Indol
- Ureasa
- Buffer de corrida
- Azul de bromofenol

Reactivos.

- Medio agar sangre
- Medio agar chocolate
- Medio TSBV
- Medio de transporte para anaerobios Culture Stuart DIFCO
- Cristal violeta
- Sulfato de cobre pentahidratado

9.1 AISLAMIENTO DE *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

A fin de aislar *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se acude a la clínica integrada de la Facultad de Odontología y se identifica a pacientes diagnosticados con periodontitis juvenil y periodontitis del adulto, de cuyas bolsas periodontales se toman muestras para el aislamiento de la bacteria. (Anexo I).

9.2 MEDIOS DE CULTIVO.

El crecimiento de las bacterias se realiza en cultivos de agar sangre (ANEXO II) y agar chocolate (ANEXO III). El medio selectivo para su recuperación en agar soya tripticasa suplementado con bacitracina-vancomicina (TSBV) (ANEXO IV), el cual es especialmente útil cuando la bacteria se pretende recuperar de bolsas periodontales. Su incubación se realiza en una atmósfera aire/CO₂ 20:1 y a una temperatura de 37°C.

9.3 IDENTIFICACION DE LA BACTERIA

Para la identificación bacteriana se realizó la técnica de tinción de gram (Anexo V) y pruebas bioquímicas.

PRUEBA BIOQUIMICA.	REACCION.
CATALASA	+
OXIDASA	?
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	-
FORMACION DE ÁCIDOS A PARTIR DE CARBOHIDRATOS:	
Arabinosa	-
Lactosa	-
Maltosa	+
Manitol	D
Rafinosa	-
Sorbitol	-
Sucrosa	-
Xilosa	D
Glucosa	+
Fructuosa	+
Galactosa	D
Ribosa	?
HIDRÓLISIS DE ESCULINA	-
INDOL	-
UREASA	-
HIDRÓLISIS DE GELATINA	-

9.4 CULTIVO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron mediante la técnica de explante a partir encías sanas de pacientes que acudieron a la clínica de exodoncia y que ha sido descrito previamente en Nyrayanan, AS, Pager, R.C., Kuzan F. Collagens synthesized in vitro by diploid fibroblasts obtained from chronically inflamed human connective tissue. *Lab. Invest.* 1978; 39: 61-65 y en Bartold, PM, Page, RC. Isolation and characterization of proteoglycans synthesized by adult human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1987; 253: 399-412. Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2mM de glutamina, en presencia de antibióticos y antimicóticos (GIBCO).

9.5 AISLAMIENTO DE LIPOPOLISACARIDO.

Para la obtención del lipopolisacárido se siguió la técnica de Westphal[†] (Anexo VI).

9.6 EXTRACCIÓN DE EXOTOXINA PROTEICA.

La extracción de la toxina se realizó de acuerdo a lo reportado por Helgenland. (Helgenland, K and Nordby, O. Cell cycle-specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. 1993; *J. Periodont.* 28: 261-265). Se incubó la bacteria por 72 horas, las bacterias se separaron del medio de cultivo por centrifugación (8,000 g por 30 min. a 4°C). El medio fue concentrado a 10x in a Millipore Pellicon Cassette System con un filtro de 10 000 mw, se añadió sulfato de amonio a 60% de saturación y la solución se dejó toda la noche en hielo. El precipitado se colectó por centrifugación (20 000 g por 10 min.) y la pastilla se lavó con sulfato de amonio 60% y se dializó con solución salina toda la noche a -20°C. Se cuantificó proteína mediante la técnica de Lowry (ANEXO VII) y se visualizó el precipitado mediante la técnica de electroforesis (ANEXO VIII)[‡] y tinción con plata (Anexo IX).

[†]Forma parte de la tesis de licenciatura para obtener el grado de Químico Farmacobiólogo de la alumna Patricia Román Álvarez.

[‡] La extracción de la toxina la realizó el Químico Farmacobiólogo Luis Arturo Contreras-Marmolejo como parte de tesis de licenciatura para obtener el título de Cirujano Dentista.

10. RESULTADOS

Se purificó la bacteria a partir de un paciente con periodontitis y se observó que macroscópicamente el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* forma colonias pegajosas de aspecto liso o rugoso. Las colonias lisas son de tono gris o azul amarillento, ligeramente convexas y de superficie reluciente. Observadas microscópicamente a 100x en cultivos recientes las bacterias tienen forma de cocos y los cultivos viejos presentan formas bacilares. Después de tres a cinco días las colonias tienen aspecto de estrella de 3 a 6 picos. (Fig. 10)

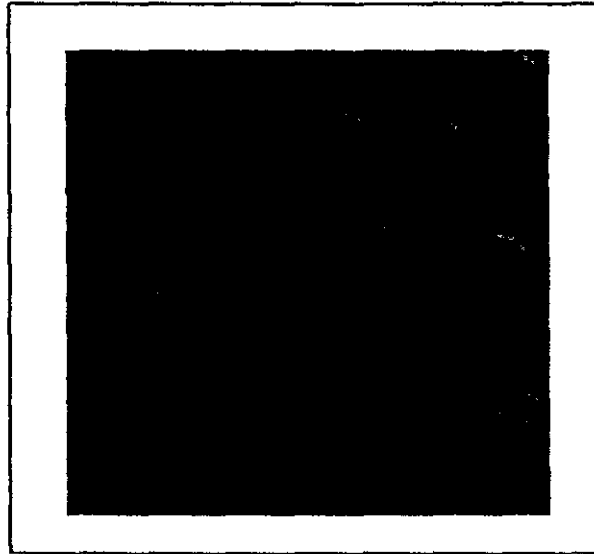
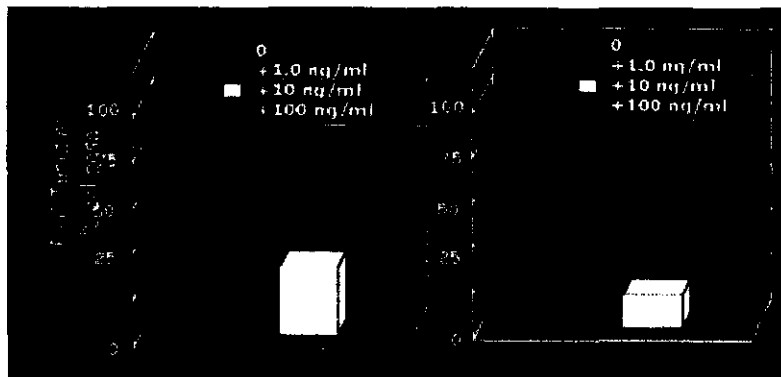


Fig. 10 Aspecto de las colonias de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* con el microscopio electrónico.

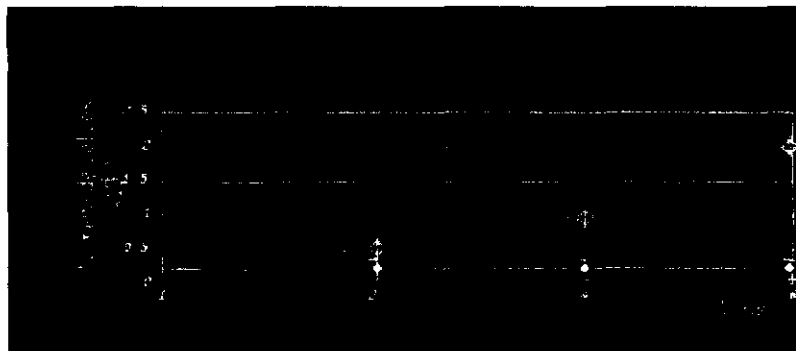
Las bacterias se inocularon en 3 ml. de caldo nutritivo a fin de realizar la caracterización mediante pruebas bioquímicas. Los resultados se muestran en la tabla presente.

PRUEBA BIOQUIMICA.	REACCION.
CATALASA	+
OXIDASA	?
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	-
FORMACION DE ÁCIDOS A PARTIR DE CARBOHIDRATOS:	
Arabinosa	-
Lactosa	-
Maltosa	+
Manitol	D
Rafinosa	-
Sorbitol	-
Sucrosa	-
Xilosa	D
Glucosa	+
Fructuosa	+
Galactosa	D
Ribosa	?
HIDRÓLISIS DE ESCULINA	-
INDOL	-
UREASA	-
HIDRÓLISIS DE GELATINA	-

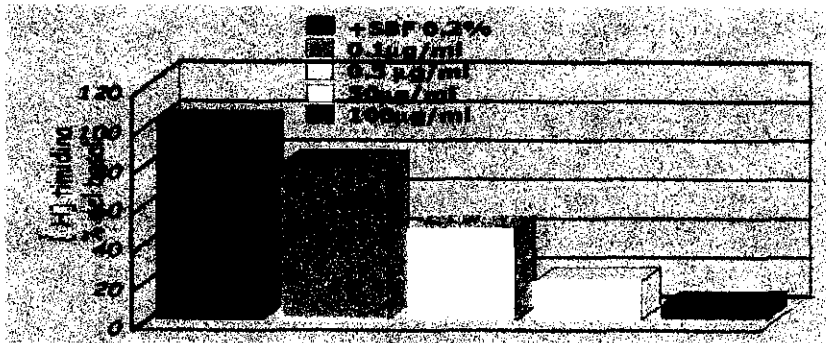
GRÁFICAS DE RESULTADOS



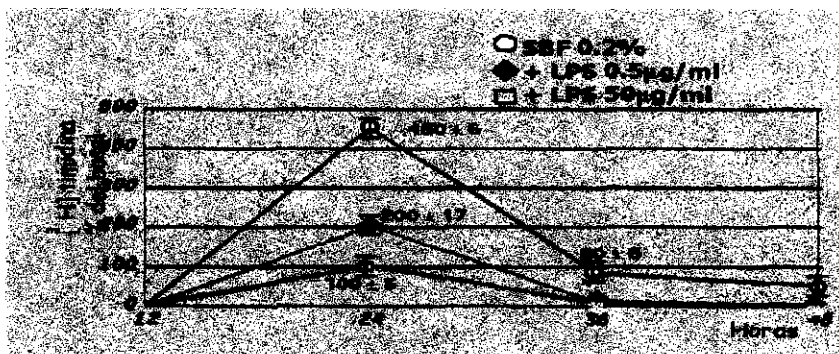
Gráfica 1



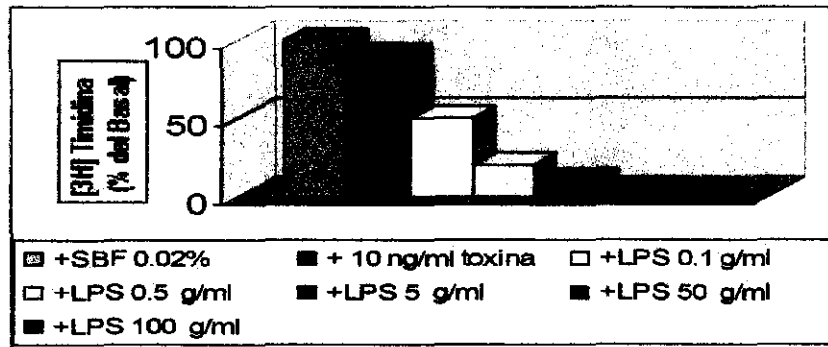
Gráfica 2



Gráfica 3



Gráfica 4



Gráfica 5

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Gráfica 1

En la gráfica 1 se exponen dos tablas que muestran el efecto de la toxina sobre el cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos en un medio que contiene 10% (izquierda) y 0.2% (derecha) de suero bovino fetal.

Se encontró que en ambas condiciones la toxina del medio de cultivo induce un efecto inhibitorio de forma dosis-dependiente sobre la proliferación de fibroblastos gingivales humanos. Así mismo se determinó que la máxima inhibición que ocasiona la toxina sobre la proliferación celular se observa a una dosis de 100 ng/ml y a dosis de 1 ng/ml se obtiene la mitad de la inhibición máxima. El efecto inhibitorio es mayor cuando se adiciona el suero bovino fetal en bajas dosis 0.02%. (derecha).

Gráfica 2

Se determinó también que al tratar los fibroblastos gingivales humanos durante 24 horas con los lipopolisacáridos los efectos inhibitorios permanecen aún después de una semana de tratamiento.

Gráfica 3

En otra serie de experimentos se encontró que los lipopolisacáridos inhiben la síntesis de DNA de manera dosis dependiente, obteniéndose un efecto máximo al adicionar 100 μ g/ml, y a dosis de 0.5 μ g/ml se obtiene la mitad de la inhibición máxima.

Gráfica 4

Se determinó que la inhibición inducida por los lipopolisacáridos es dependiente del tiempo, en donde el máximo efecto inhibitorio se presenta a las 24 horas de tratamiento y el mayor efecto se encuentra al adicionar 50 μ g/ml.

Se estudiaron también los efectos de estos agentes sobre la proliferación de fibroblastos gingivales humanos, para lo cual se adicionó la toxina en dosis submáxima (10ng/ml) durante 1 hr. Al término se retiró el medio y se retó hasta completar 24 hrs. con el lipopolisacárido a diferentes dosis.

Gráfica 5

La gráfica 5 muestra el efecto de la toxina del medio y los lipopolisacáridos sobre la proliferación celular. Se encontró que la inhibición inducida por los lipopolisacáridos es dependiente del tiempo, y se determinó que el máximo efecto inhibitorio es a las 24 hrs. de tratamiento con una adición de 50 μ g/ml.

11. CONCLUSIONES.

Las bacterias gram negativas y especialmente el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* poseen factores de virulencia altamente agresivos.

Los LPS son moléculas altamente tóxicas, en donde su alto orden estructural provee a la bacteria de mayor resistencia, aún así estas moléculas son susceptibles a fuertes agentes cationicos, incluyendo lo que ocurre con el grupo de antibióticos de la familia de las polimixinas, los detergentes cationicos y los peptidos cationicos sintéticos. Los complejos de polimixina probablemente reducen el alto orden molecular de la estructura de los LPS y por lo tanto desorganizan la membrana externa y exponen a la bacteria a daño celular. Se conocen en este caso el EDTA y otros agentes quelantes cationicos que son capaces de ocasionar grandes desordenes en los LPS.

Los neutrofilos circulantes juegan un papel importante en la defensa del periodonto contra las bacterias gram negativas, incluyendo el A.a. el cual presenta resistencia a la aniquilación por medio de la vía de complemento y es capaz de sintetizar toxinas proteicas que actúan como leucotoxinas, pero es altamente susceptible a la fagocitosis y subsecuentemente a la destrucción celular mediada por neutrofilos.

Se debe recordar que toda forma de tratamiento dental que desee contar con éxito debe encontrarse soportada en un parodonto saludable. En donde la mayor importancia no radica en la eliminación de la enfermedad, sino en la implementación de un estricto régimen de salud bucal, basado en técnicas adecuadas de cepillado y controles frecuentes de placa dentobacteriana que eviten la aparición de la enfermedad.

12. Discusión.

A.a es considerada como una bacteria de gran importancia en el desarrollo de la periodontitis del adulto y de la periodontitis juvenil localizada. De acuerdo a este contexto esta bacteria presenta determinadas propiedades biológicas como leucotoxicidad y efectos tóxicos sobre fibroblastos y células epiteliales humanas.

Estudios realizados por el grupo del investigador Bartold en la Universidad de Adelaida en Australia muestran que los lipopolisacáridos obtenidos de *Salmonella enteritidis* producen inhibición en la síntesis de DNA de manera dosis dependiente y así mismo sus efectos varían de acuerdo a la concentración de suero bovino fetal utilizada. En este trabajo se encontró que a la dosis de 0.2% de suero bovino fetal, el tratamiento con 50 µg/ml del lipopolisacárido induce la máxima inhibición sobre la síntesis de DNA.

En este trabajo se utilizó la preparación de lipopolisacárido purificado del microorganismo A.a. Nuestros resultados sugieren que posiblemente la presencia de factores de crecimiento presentes en el suero bovino fetal sean capaces de bloquear las acciones inhibitorias sobre la síntesis de DNA en fibroblastos gingivales humanos tratados con toxinas. En otra serie de resultados encontramos que los lipopolisacáridos promueven una disminución en la síntesis de DNA en el tiempo y que el efecto máximo se determina a las 24 horas de tratamiento.

Encontramos así mismo que el tratamiento tanto con lipopolisacáridos junto con la toxina del medio potencializa los efectos inhibitorios sobre la síntesis de DNA.

Se determinó que los lipopolisacáridos actúan sobre los fibroblastos gingivales humanos y participan como un iniciador en el proceso de inflamación y destrucción de tejidos. El mecanismo de acción de esta endotoxina es poco claro pero se ha demostrado que interactúa con los fosfolípidos de las membranas.

En otra serie de resultados encontramos que la toxina obtenida de medio de cultivo inhibe la proliferación celular y la síntesis de DNA y junto con el lipopolisacárido son capaces de alterar la proliferación celular.

Esto se pone de manifiesto al observar que durante el desarrollo de la enfermedad periodontal el proceso de cicatrización es lento, debido posiblemente a que más de un componente bacteriano impide la salud de periodonto.

13. ANEXOS

Anexo I

1. Obtención de la muestra.

Se introducen en las bolsas periodontales puntas estériles de papel endodóntico del número 30 al 45, dejándolas de 2 a 5 segundos hasta que absorban una cantidad suficiente de fluido crevicular.

Posteriormente se introducen las puntas en medio de cultivo para anaerobios Culture Stuart de DIFCO y se transportan hasta el laboratorio.

2. Cultivo primario de la muestra.

Las puntas de papel se homogenizan dentro del medio de transporte. Se toma un inóculo y se siembra en medios de agar sangre y agar chocolate, incubándose a 37°C en atmósfera aire/CO₂ 20:1 durante 48 horas.

3. Cultivo secundario.

Se toman las colonias del cultivo primario que se encuentren aisladas y se procede a sembrarlas en medio TSBV, incubándose a 37°C en atmósfera aire/CO₂ 20:1 durante 48- 72 horas.

ANEXO II

Medio Agar sangre.

Base de agar	7.2g
Agua destilada	100 ml
Hemoglobina 2%	2 g

Instrucciones:

Suspender el polvo en agua, mezclar y calentar hasta que se disuelva. Ajustar pH a 6.8. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a 20°C y agregar la hemoglobina. Agitar y colocar en cajas petri.

ANEXO III

Medio Agar chocolate

Base de agar	7.2g
Agua destilada	100 ml
Hemoglobina 2%	2 g

Instrucciones:

Suspender el polvo en agua, mezclar y calentar hasta que se disuelva. Ajustar pH a 6.8. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a 50°C y agregar la hemoglobina. Agitar y colocar en cajas petri

ANEXO IV

Agar soya tripticasa adicionado con bacitracina-vancomicina

Agar soya tripticasa	22.5 g
Extracto de levadura	0.5 g
Bacitracina	37.5 g
Vancomicina	2.5 g
Suero de caballo	50 ml.
Agua bidestilada	500 ml.

Instrucciones:

Suspender el agar soya tripticasa y extracto de levadura en el agua, mezclar y calentar hasta que se disuelva. Ajustar pH a 7.2. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos a 15 lb. Entibiar y agregar bacitracina, vancomicina y suero de caballo. Colocar en cajas petri.

Anexo V

Tinción de Gram

1. Se coloca en un porta objetos limpio una gota de agua destilada.
2. Se toma una muestra de la bacteria.
3. Se realiza un frotis y se fija con calor.
4. Se cubre con cristal violeta y se deja 60 segundos.
5. Se escurre y lava con agua.
6. Se cubre el frotis con lugol y se deja 60 segundos.
7. Se escurre y lava con alcohol acetona 15 segundos y después con agua.
8. Se cubre el frotis con safranina y se deja 60 segundos.
9. Se escurre, lava y seca al aire.
10. Se observan resultados al microscopio

Anexo VI

Aislamiento de lipopolisacárido.

- 1.- Se realiza un cultivo masivo en 125 ml. de medio líquido de infusión cerebro corazón (BHI), inoculando a partir del medio sólido de cultivo selectivo.
- 2.- Al paquete bacteriano se le agregan 4 ml de agua y 4 ml de fenol al 90%.
- 3.- La mezcla fenol-agua se calientan durante 5 minutos a 68 °C y se agita durante 15 minutos en el vortex.
- 4.- Se recupera la fase acuosa (parte superior) y se coloca en una bolsa para diálisis durante 72 horas. La bolsa se coloca en agua desionizada y se realizan varios cambios hasta que se libera el fenol.
- 5.- Al término de la diálisis se recupera el contenido de las bolsas y se coloca en viales. Entonces se ha obtenido el extracto crudo de LPS más ácidos nucleicos.
- 6.- Para la eliminación de los ácidos nucleicos se coloca desoxirribonucleasa y ribonucleasa 20 µl /ml durante 30 min/37°C.

Anexo VII

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR LOWRY.

MATERIAL

Solución stock de albúmina (1mg./ml)

REACTIVOS

A: 2 gr. de Na_2CO_3 en un matraz aforado de 100 ml, aforar a 0.1M con NaOH

B: 2 gr. de tartrato de sodio y potasio dihidratado aforado en 100 ml. de agua destilada.

C: 1 gr. de sulfato de cobre pentahidratado aforado a 100 ml. de agua destilada

Mezclar las soluciones B y C. Colocar 0.5 ml. de esta mezcla en 50 ml. de solución A. Dejar reposar 10 minutos.

Reactivo de Folin: se diluye 1:3. Se agrega 1 ml. de reactivo de Folin más 2 ml. de agua destilada. Preparado siempre al momento de usarse.

MÉTODO

La determinación de la concentración de proteínas puede hacerse directamente por la absorción de luz U.V. Una vez obtenidos los valores se puede construir una curva estándar de color contra la concentración de una proteína conocida. El color de la solución problema se interpreta utilizando una curva estándar y el valor de la absorbancia para cada una de las muestras de lleva a una curva patrón para obtener así la concentración de las muestras.

ANEXO VIII

Electroforesis.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Gel separador

Acrilamida Tris 30 %	5.0 ml.
Tris 1.5 M pH 8.8	3.75 ml.
Agua destilada	6.0 ml.
SDS 10 %	150 μ l.
TEMED	7.5 μ l.
Persulfato de Amonio 10%	75 μ l.

Gel concentrador.

Acrilamida Tris 30 %	1.25 ml.
Tris 0.5 M pH 6.8	1.8 ml.
Agua destilada	4.2 ml.
SDS 10 %	750 μ l.
TEMED	7.5 μ l.
Persulfato de Amonio 10%	75 μ l.

Solución Buffer

Tris 0.5 M pH 6.8	2.5 ml.
SDS 10 %	250 ml.
Glicerol	250 ml.
Agua destilada	4.5 ml.
Azul de bromofenol	5.0 mg.

Solución desteñidora

Metanol 50 %	250 ml.
Ác. acético 10 %	50 ml.
Agua destilada	200 ml.

ANEXO IX

TINCION CON PLATA.

1. El gel se lava dos ocasiones con etanol al 10% durante 10 min. y 3 ocasiones con agua bidestilada durante 10 min.
2. Posteriormente se coloca en solución de fijadora por 90 segundos y se procede a un lavado con agua bidestilada.
3. Se tiñe por 30 segundos con nitrato de plata al 0.1 %.
4. Se revela con carbonato de sodio al 2.5 %.
5. Se lava con ácido acético al 1% .
6. El último lavado se realiza perfectamente con agua bidestilada durante 30 seg.
7. El gel se coloca durante 2 horas a un secador .
8. Se procede a fijar en la solución que a continuación se menciona.

Solución fijadora.

Reactivo	Cantidad
Carbonato de Sodio	1.0 gr.
Ferrocianuro de Potasio	0.3 gr.
Tiosulfato de Sodio	0.6 gr.
Agua destilada	200 ml.

BIBLIOGRAFÍA

1. Helmmunt Brade. Endotoxin in healt and diseasem. Marcel Dekker. New York 1998. 3-98, 110-112.
2. Helmmunt Brade. Endotoxin. Marcel Dekker. New York 1998. 14-16 .
3. Von Haller. Elementa Physiologiae corporis humani. Vol III 1997. 1-2.
4. Gottileb, R.J. Periodontal changes in pregnancy. J. Periodontol 36:209-213. 1995.
5. Anaimo J. and Loe H. Anatomical characteristics of gingival tissue. Clinical and microscopic study of the free and attached gingival. J. Periodontol. 37: 5. 1995
6. Yonemura K.,Narayanan, A.S. Periodontology. 2 ed. Ed. Interamericana.1996. 123-129 .
7. Genco, R.J. Periodoncia. Ed. Interamericana. 1994. 3-54.
8. Oortowkkki, W.A. The collagen in the periodontum. J.Periodontal Res. 43:660 1995.
9. Genco, R.J. Periodoncia. Ed. Interamericana. 1994. 3-54.
10. Bulcazc, J. Enzimatic activities in gingival fluid. Periodontol. 36:145—153
11. Erickson, H.P. and Bourdon, M.A. Cell. Biol. 5,71-73. 1995.
12. Schooeder, H.E. and the Theilade J. Electron microscopy of normal human gingiva. J. Periodontal Res. 11:95 1995
13. Ghanil Gary C. Biochemical alterations on the inflammatory periodontal disease poly sintetase and activity in gingival fibroblast from humans with periodontitis. J. Periodonto Res. 234: 135 1994.
14. Deporter, D.A. And Ten Cate A.R. Cells formation in the normal and stressed periodontum. Periodontics. 2: 53 1998.
15. Burn and Murdoch. The role of the bone in thoot eruption. J. Periodontal Res. 23 60-63. 1996.
16. Piiche, J. Annd Graves, D. Study of the grow factor of human bone. J. Periodontol. Bone. 10:131-138. 1990.
17. Samphat et. al. Recombinant human osteogenic protein-1.J.B.C.267:20352-20362.
18. Wang, X. et. al. Recombinant human bone. Proc. Natl. Acede. Sci. 87:2220-2224. 1996.
19. Fisher, L.W., Hawkins, G.R., Turos, N. and Termine, J.D. J. Biol. Chem. 262:9702-9708. 1996.
20. Erickson, H.P. and Bourdon, M.A. Cell. Bioll. 5,71-73. 1995.
21. Zhannng, W., Domennicuccin, C., Golddberg, H.A., Wrana J.L. and Sodek, JBC. 1995.
22. Knox. Ultra structurall study if experimental cementum regeneration in rats. J. Periodont. Res. 23: 60-67 1995.
23. Yomenura, K., Raines, E.W. Ahm., n.G. and Narayann, S. Mitogenic signaling mechanisms of human cementum derived grow factor. J. Biol. Chem. 268:26120-26126.
24. Shakti., Chondro genetic potential of mesenchymal cell. JBC. 32:252-259. 1995.

25. Shuttleworth, C.A. and Smalley, J.W. Periodontal ligament. Tiss Res. 10:211-215. 19996.
26. Ghanil, Garya, C. Alterations in inflammatory periodontal diseases. J. Periodontol Res. 1994 234:165
27. Moos W.E.K. Bacteriology of moderate periodontitis in adult human. J. Periodontol. Res. 43: 660 1995
28. Zambon and Rector R.A. Arc. Oral. Biol 16: 573 1996
29. J.J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. J. Periodontol 10: 65-486 1996.
30. Manderl R.L. and Socransky. Toxins of A.a. J. Periodontol 42: 593 1996.
31. Genco, R.J. Periodontia. Ed. Interamericana. 1994. 3-54.
32. Zambon J.J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. J. Periodontol 52: 593 1996
33. Kiley, P., and Holt S.C. Characteritation of LPS from A.a. Y4 and N27. Infect Immun 30:826 1990.
34. Aleo, J.J. Stimulation of macromolecular synthesis by endotoxin- ell R.L. and Socransky. Leucotoxin of Actinobacillus actinomycetemcomitans treated 3T6 fibroblasts. Experientia. 1980; 36: 546-547.
35. Mand and the incidence of the juvenile periodontitis. J. Periodontol 52:559. 1996
36. Panum. P.L. Das putride gift. Pafhol Anat. Physiol. Klin Med (Virchow's archive) 1975. 60: 301-352. Endotoxins 3^o ed. Ed. Mmmosby.
37. Helmmunt Brade. Endotoxin in Healt and diseasem. New York. 1997 3-98, 110-141 650-678 p.p.
38. Rietchstel, E.T. Galanos. Bacterial endotoxins , Aci Am, 1992 157-158.
39. Siebert. F.B. Fever producing substance found in some destilles waters. Am. J. Physiol. 67:90 -1045. 1987.
40. Rietchstel, E.T. Galanos. Endotoxins, molecular relationships of structure to activity anf funtion. FASEB. 1994. 8: 217-225.
41. Orlowssky. W.A. The incorporation of proline in to the collagen of the periodontum. J. Periodontal Res 4443: 660 1995.
42. Mc. Colloch, C.A.G. Bordin, S. Role of fibroblast subpopulation in periodontal Physiology and pafhology. J. Periodontal Res. 26: 144-145.
43. Terranova, V.P. Martin, G.R. Molecular factor determinig gingival tissue interaction with tooth structure. J. Periodontol Res. 1997 17:101-108.
44. Irwin. C.R. Scor. Expresion of EGPF receptors on ephitellal and stromal cells of normal and inflamed gingival tissue. J. Periodontol Res. 226: 388-394. 1996.
45. Kristen Helgeland. Cell cycle specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblast of a toxin isolated from the culture medium of Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodontal Res 1993 28: 161-165.