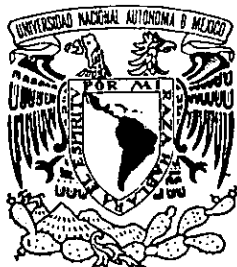


181



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE LOS LIPOPOLISACARIDOS SOBRE LA
ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPEROXIDO
DISMUTASA EN FIBROBLASTOS GINGIVALES
HUMANOS.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

MAURICIO AXAYACATL PEÑA PARRAGA

TUTOR: DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS.



MEXICO, D. F.

2000

286327



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

JURADO

Presidente: CD Luz del Carmen González. _____

Secretario: CD Verónica Venegas. _____

Vocal: Dra. Gloria Gutiérrez Venegas. _____

1er. Suplente. MC Gustavo Pacheco López. _____

2do. Suplente. MC Jaime Esquivel Soto. _____

El trabajo de investigación titulado "Efecto de los lipopolisacáridos sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa en fibroblastos gingivales humanos". Se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología UNAM. Bajo la tutoría de la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas. El proyecto fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) proyecto PAPIIT IN 224398

Sustentante:

Mauricio Axayacatl Peña Párraga.

Tutor:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

AGRADECIMIENTOS

- **Primeramente agradezco a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, por formarme integralmente y darme la oportunidad de disfrutar de sus instalaciones, pero sobretodo por permitirme ser un ejemplo más de esos miles de estudiantes mexicanos que disfrutando de la gratuidad pueden formar su educación.**
- **Especialmente a la Dra. Gloria Gutiérrez por ser de esos tan pocos maestros de mi facultad que igual te regala el conocimiento que su amistad.**
- **A la Dra. Cristina Trejo Solís por su asesoría en la realización de este trabajo por donar los anticuerpos y metodología para el desarrollo del mismo.**
- **A los miembros del jurado por la revisión y comentarios al trabajo.**
- **A mis amigos y compañeros del laboratorio, por conocer el significado de la palabra amistad. Armando Flores Lides, Carla Portillo Garcés, Arianna López Toledo, Luis Contreras Marmolejo, Carolina Barajas Torres, Silvia Maldonado, Erika García Ruíz, Fili Hernández, Patricia Román Álvarez, Carlos Vázquez, Ulises Tafoya, Silvia Ruíz, Jose Molina López, Miguelito Pérez.**
- **A mis amigos que me acompañaron e hicieron agradable mis estudios. Claudia Pin, Gabriela Ramírez, Marisú Fontanet, Carlos Tomás, Carlos Funes, Omar García, Norita, Gabriela Ortiz, Mónica Herrera, Josué Mendoza, Tristán Flores, Moises Talavera, Marcel Gaume.**
- **A cada uno de los integrantes del histórico comité de huelga de la Facultad de Odontología y al C.G.H, por darme y darle a todos una lección de ideales, dignidad y resistencia. Especialmente a Juan Carlos G. por su ejemplo de actitud.**
- **Para el Instituto de Fisiología Celular, por ayudarme en los problemas técnicos, sobre todo al Ing. Juan Barbosa.**

**"DEJEN QUE LADREN LOS PERROS,
ES SEÑAL QUE CAMINAMOS"**

M. de C. S.

DEDICATORIAS

- **A mis padres por su amor.**
- **A todos y todas mis tías especialmente a mis padres adoptivos Gabriel, Concepción y mi abuelo.**
- **Aishiteru. Ema Takai wa biijin de su.**
- **Mis hermanos Ignacio, Tellina, Gabriela, Hugo, Omar, Jackeline, Cuauhtémoc, Zyanya, Jazmín y Cristina.**
- **A mí muy querida Dra. Gloria.**

ÍNDICE

	Página.
1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Antecedentes	4
4. Introducción	5
4.1 Parodonto	5
4.2 Encía	6
4.3 Características de la encía sana	7
4.3.1 Encía marginal o libre	7
4.3.2 Surco gingival	7
4.3.3 Encía insertada	8
4.3.4 Encía interdental	9
4.3.5 Características histológicas	9
4.3.6 Tejido conjuntivo	11
4.4 Fibras gingivales	12
4.5 Células del tejido conectivo	16
4.6 Vascularización	17
4.7 Inervación	18
4.8 Criterios clínicos de la encía normal	19
4.9 Cemento	20
4.9.1 Histología	20
4.9.2 Función del cemento	20
4.10 Hueso alveolar	21
4.11 Enfermedad parodontal	23
4.12 Placa dental	26
4.12.1 Clasificación de placa	27
4.12.1.1 Placa supragingival	27
4.12.1.2 Placa subgingival	28
4.12.2 Cálculo dental	30
4.12.2.1 Composición	30
4.13 Infección	30
4.14 Clasificación de enfermedades parodontales	32
4.14.1 Gingivitis marginal aguda	33
4.14.2 Gingivitis marginal crónica	33
4.14.3 Gingivitis de la erupción dentaria	33
4.14.4 Gingivitis de la maloclusión	33
4.14.5 Resección gingival	34
4.14.6 Infección gingival aguda	34
4.14.7 Gingivitis úlcero necrosante aguda	34
4.14.8 Hipertrofia gingival	35
4.14.9 Pericoronitis	36
4.14.10 Gingivitis descamativa	36
4.15 Periodonitis	39

	Pagina.
4.15.1 Periodontitis crónica habitual	40
4.15.2 Periodontitis crónica destructiva o de rápido avance	40
4.15.3 Periodontitis juvenil	41
4.16 Absceso periodontal	42
4.17 Lipopolisacáridos	45
4.17.1 Composición y estructura de lipopolisacáridos orales	48
4.17.2 Estructura del lípido A obtenido de bacterias orales	49
4.17.3 Región polisacárida de los lipopolisacáridos orales	50
4.17.4 Caracterización de determinantes que participan en la actividad biológica	51
4.17.5 Estimulación de mediadores inflamatorios por lipopolisacáridos orales	51
4.17.6 Efecto de los lipopolisacáridos sobre la interacción en células de la encía	52
4.17.7 Los lipopolisacáridos modulan la respuesta del huésped	54
4.18 Intermediarios reactivos del oxígeno	55
4.18.1 Sistemas antioxidantes	58
4.18.2 Efectos protectores de las enzimas antioxidantes	60
4.18.3 Comparación entre diferentes enzimas antioxidantes	60
5. Planteamiento del problema	63
5.1 Justificación	63
6. Objetivos	64
6.1 Objetivo general	64
6.2 Objetivo específico	64
7 Hipótesis	65
7.1 Hipótesis verdadera	65
7.2 Hipótesis falsa	65
7.3 Hipótesis verdadera	65
7.4 Hipótesis falsa	65
8 Material y método	66
8.1 Tipo de estudio	66
8.2 Material biológico	66
8.3 Material	66
8.4 Reactivos	66
8.5 Equipo	67
8.6 Presupuesto	67
8.7 Método	68
8.7.1 Cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos	68
8.7.2 Aislamiento de lipopolisacáridos	68
8.7.3 Determinación de concentración de proteína	68
8.7.4 Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa	68

	Pagina.
8.7.5 Inmunotransferencia de las muestras a la matriz de nitrocelulosa	69
8.7.6 Aislamiento del D.N.A. genómico	69
Resultados	70
9.1 Efecto de los lipopolisacáridos sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa	70
9.2 Efectos de los lipopolisacáridos sobre la síntesis de la enzima superóxido dismutasa	73
10 Discusión	75
11 Conclusiones	78
12 Bibliografía	79
13 Anexos	87

1. ABREVIATURAS

S.O.D.	Superóxido Dismutasa
C A T.	Catalasa
F.G.H.	Fibroblastos Gingivales Humanos
L.P.S.	Lipopolisacáridos
E.R.O.S	Especies Reactivas del Oxígeno
E. coli.	Escherichia coli
KDO.	Ceto-Deoxi- Octulosónico
IL.	Interleucina
T.N.F.	Factor de Necrosis Tumoral
PG. E.	Prostaglandina E
MMP.	Metaloproteínas

2. RESUMEN

Las enfermedades bucales en sus diferentes manifestaciones han hecho padecer a la humanidad desde el principio de la historia. Actualmente una de las principales causas de pérdida dental en la población se origina por problemas patológicos en los tejidos de soporte dental. Los daños parodontales son iniciados por un grupo de infecciones bacterianas, en su mayoría gram-negativas, estos microorganismos ocasionan la inflamación de la gingiva y la destrucción de los tejidos de sostén, y en muchos casos la pérdida de hueso alveolar lo que desencadena la exfoliación de las piezas dentales.

Para impedir la destrucción de sus tejidos, la cavidad bucal cuenta con un sistema de defensa por medio del cual son controladas la mayoría de las agresiones externas e internas. Y en los cuales los fibroblastos gingivales juegan un papel muy importante en la síntesis y mantenimiento de los componentes del tejido conectivo como colágena, proteoglucanos, y ácido hialurónico.

La periodontitis es el resultado de la infección en el surco gingival ocasionado por la placa bacteriana subgingival. Datos recientes indican que las bacterias *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, están implicadas en la iniciación y progreso de la parodontitis. Los lipopolisacáridos son el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Estas moléculas de la membrana son consideradas como el factor clave de la patogénesis en los tejidos parodontales. Dentro de los daños causados por los lipopolisacáridos se encuentra la producción de especies reactivas del oxígeno, que pueden ser dañinas para las células, a pesar de que son las propias células las que sintetizan y desarrollan un sistema de defensa que funciona a través de enzimas antioxidativas como la Superóxido dismutasa, la Catalasa y la Glutación peroxidasa, las cuales tienen la característica de poder controlar las especies reactivas del oxígeno, que se forman durante el estrés oxidativo.

La finalidad de la investigación es determinar si los lipopolisacáridos inducen la expresión o actividad de la enzima Superóxido dismutasa (S.O.D.); en fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos se desarrollaron en cultivos celulares primarios y fueron expuestos a los efectos tóxicos de lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Se realizaron estudios dosis respuesta y curso temporal con la finalidad de determinar los efectos de los lipopolisacáridos sobre la actividad de esta enzima. Así mismo se extrajo el DNA genómico de

F.G.H. a fin de determinar si existe daño en este material genético por acción de estas endotoxinas bacterianas.

Nuestros resultados indican que el tratamiento con lipopolisacáridos induce un incremento en la actividad y síntesis de la enzima superóxido dismutasa. Así mismo encontramos que el tratamiento con la endotoxina no produce ruptura del DNA genómico y por tanto no se activan procesos de apoptosis por efecto de los lipopolisacáridos.

3. ANTECEDENTES

Es importante conocer los efectos de los lipopolisacáridos en la producción de los radicales libres, sobre los fibroblastos gingivales humanos para así poder determinar los daños en la cavidad bucal. Los radicales libres pueden llegar a producir respuestas biológicas tales como eritema, pigmentación, carcinogénesis, mutagenicidad y muerte celular. Las diferentes especies reactivas del oxígeno ó radicales libres que pueden causar dichos daños son los siguientes:

- Oxígeno libre (O_2).
- Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).
- Radical Hidroxilo ($\cdot OH$).
- Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2).

Los lipopolisacáridos juegan también, un papel muy importante en el proceso de formación de los radicales libres, ya que estos representan la porción tóxica de las bacterias gram negativas, que al entrar en contacto con la encía generan una reacción inmune a nivel tisular, lo cual nos da como consecuencia la formación de especies reactivas del oxígeno.

Por otro lado la importancia que tienen los fibroblastos para el sostén y mantenimiento de las piezas dentales es muy importante pues tienen una capacidad restaurativa (producción de colágena, glucoproteínas, y proteoglucanos) que es vital para la homeostasis bucal.

Por otra parte los resultados nos indican que los daños causados por los radicales libres, (en este caso por el ión superóxido) sobre los fibroblastos no causan problemas en el D.N.A. genómico, lo cual demuestra que los daños en las células son particulares de la zona extracelular.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 PARODONTO

El parodonto es el tejido de protección, sostén y apoyo del diente; el cual se compone de las siguientes estructuras (Figura. 1):

- Encía.
- Ligamento periodontal.
- Cemento.
- Hueso alveolar.

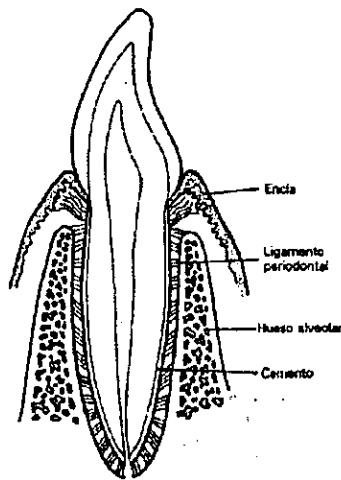


Figura1. Estructuras del Parodonto. ⁽⁶⁾

Se considera al cemento parte del parodonto, porque junto con el hueso, sirve de apoyo a las fibras del ligamento periodontal. El conocer las características normales de los tejidos del parodonto, nos permitirá comprender las patologías y los eventos fisiológicos que lo afectan.⁽¹⁾ Así mismo el parodonto está sujeto durante toda la vida tanto a variaciones morfológicas y funcionales, como a los cambios propios de la edad.

A continuación se describirán las características y funciones de las estructuras parodontales.

4.2 ENCÍA

La encía es la parte de la membrana de la mucosa bucal que cubre los procesos alveolares hasta las porciones cervicales de los dientes; se divide de modo tradicional en encía libre e insertada, esta división es una línea imaginaria, que va del fondo del surco gingival a la superficie gingival visible opuesta a él. La encía insertada se extiende hacia apical y desde este punto hasta la unión mucogingival; apical a esta línea la mucosa alveolar se continúa sin demarcación en la membrana mucosa del carrillo, labio y piso de la boca. (Figura. 2)

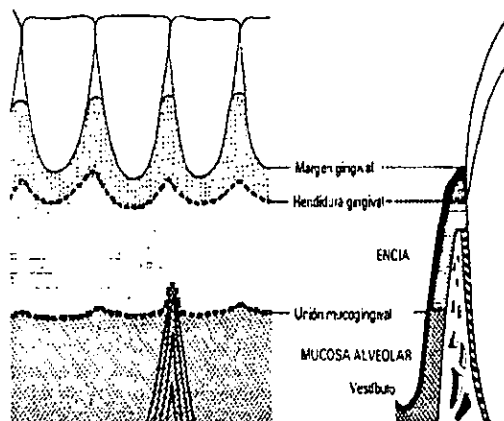


Figura 2. Relación anatómica de la encía normal.⁽²⁾

Es importante notar que el surco gingival de tejidos disecados, no es igual al determinado por el sondeo clínico; en dientes erupcionados, el margen gingival es aproximadamente de 0.5 a 2 mm de la porción coronal al cuello.⁽²⁾

En los dientes este margen tiene una terminación en forma de filo de cuchillo contra el diente pero redondeado; es frecuente encontrar un surco superficial entre el margen gingival y la superficie del diente. Desde el punto de vista clínico un surco sano no excede a los 2 o 3 mm; en todo caso, la profundidad de éste se obtiene midiendo con una sonda periodontal.

4.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENCÍA SANA

Para su estudio, la encía se ha dividido en tres áreas:

- Encía marginal o encía libre.
- Encía insertada.
- Encía interdientaria.

4.3.1 ENCÍA MARGINAL O LIBRE

La encía marginal o libre es el borde de la encía que rodea a los dientes a modo de collar (figura 3). Aproximadamente en el 50% de los casos está separada de la encía insertada-adyacente por una depresión lineal poco profunda, llamada surco gingival, la profundidad promedio del surco es de 1.8 mm, y de un espesor algo mayor a 1 mm que generalmente forma la pared blanda del surco gingival. ⁽¹⁾

La encía marginal consta de un núcleo central de tejido conectivo cubierto de epitelio escamoso estratificado. El epitelio de la cresta y de la superficie externa de la encía marginal es queratinizado, paraqueratinizado o de los dos tipos, contiene prolongaciones epiteliales prominentes y continua con el epitelio de la encía insertada. El epitelio de la superficie interna está desprovisto de prolongaciones de tipo epitelial, no es queratinizado ni paraqueratinizado y forma el tapiz del surco gingival. ⁽³⁾

4.3.2. SURCO GINGIVAL

El surco gingival es la hendidura ó espacio poco profundo alrededor del diente, cuyos límites son, por un lado, la superficie dentaria y, por otro el epitelio que tapiza la parte libre de la encía tiene forma de V y escasamente permite la entrada de una sonda periodontal. La determinación clínica de la profundidad del surco gingival es un parámetro importante del diagnóstico.

Sin embargo en una encía clínicamente sana, puede encontrarse un surco de cierta profundidad. El parámetro clínico utilizado para determinar la profundidad del surco es la introducción de un instrumento metálico graduado que mide la distancia que penetra. La

profundidad histológica de un surco no es exactamente igual a la profundidad de la penetración de la sonda. ⁽¹⁾

4.3.3. ENCÍA INSERTADA

La encía insertada es continuación de la encía marginal. Es firme, elástica y aparece estrechamente unida al periostio del hueso alveolar. La superficie vestibular de la encía insertada se extiende hasta la mucosa alveolar, relativamente laxa y móvil, de la cual se separa por una unión mucogingival (figura 3).

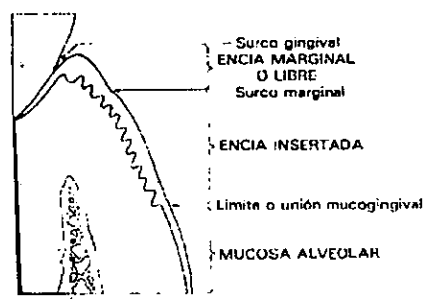


Figura 3. Relación anatómica de la encía marginal e insertada. ⁽¹⁾

El ancho de la encía insertada es un parámetro clínico importante; se determina midiendo la distancia entre la unión mucogingival y la proyección de la superficie externa del fondo del surco gingival o de la bolsa periodontal. No debe confundirse con la anchura de la encía queratinizada, por que esta última incluye también la encía marginal.

El tamaño de la encía insertada en la zona vestibular difiere en las distintas áreas de la boca. Es generalmente mayor en la región incisiva (3.5 a 4.5 mm en el maxilar y 3.3 a 3.9 mm en la mandíbula) y menor en las regiones posteriores.

Debido a que la unión mucogingival permanece estacionaria a lo largo de la vida del adulto, los cambios en el ancho de la encía insertada se deben a las diferentes posiciones de la corona. La anchura de la encía insertada disminuye con la edad y con la extrusión de los dientes. En la zona lingual de la mandíbula, la encía insertada termina en la unión

con la mucosa alveolar lingual, que continua con la mucosa del piso de boca. La superficie palatina de la encía insertada del maxilar superior se une imperceptiblemente con la mucosa palatina, igualmente firme y elástica.

4.3.4. ENCÍA INTERDENTAL

Es aquella región de encía que se sitúa en los espacios interdentes, esto es el área de contacto entre los dientes.⁽⁵⁾ Puede ser piramidal ó tener forma de col. En la primera hay una papila con la punta inmediatamente debajo del punto de contacto; es una depresión parecida a un valle que conecta a las papilas vestibulares y linguales, y se adapta al área de contacto interproximal.

La forma de la encía en un espacio interdental dado, depende del punto de contacto entre los dos dientes adyacentes y la presencia o ausencia de recesión.

La superficie vestibular y lingual se afinan en la zona de contacto interproximal en tanto que las superficies mesial y distal son ligeramente cóncavas. Los bordes laterales y la punta de las papilas interdentes, están formadas por una continuación de la encía marginal de los dientes adyacentes. La porción intermedia, está compuesta de encía insertada.⁽¹⁾

4.3.5 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

El epitelio de la cavidad bucal es escamoso, estratificado y con varias capas celulares. Este epitelio está separado del tejido conectivo por una membrana basal y formado por cuatro capas celulares bien diferenciadas: Basal, Espinosa, Granulosa y Córnea (figura 4).⁽⁵⁾

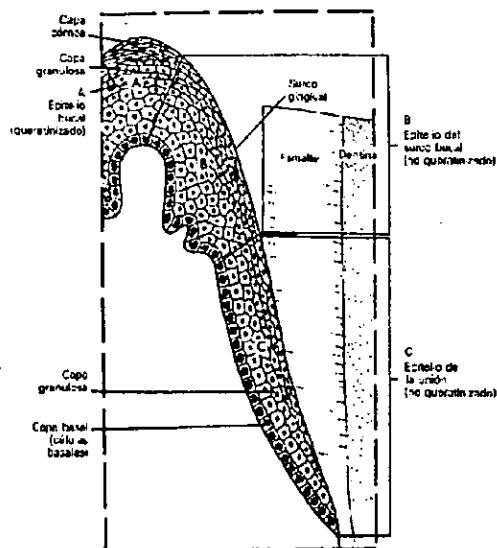


Figura 4. Características histológicas de la encía bucal. ⁽⁶⁾

Las células más profundas tienen forma cuboidal (células basales) y constituyen el estrato basal. La segunda capa de células, denominado estrato espinoso, se compone de células poligonales. La capa granulosa está formada por células planas con gránulos basofílicos prominentes de queratohialina en el citoplasma. La última capa se conoce como estrato córneo, puede estar queratinizada (sin núcleos), paraqueratinizada (con núcleos), ó en ambas situaciones. Las células epiteliales se sintetizan en el estrato basal y migran hacia la superficie, al tiempo que modifican gradualmente sus características, este proceso se conoce como queratinización.⁽⁶⁾ Cuando el componente de queratinización celular es grande, esta capa se engruesa y actúa como mecanismo de defensa.⁽⁵⁾ Las células epiteliales se unen entre sí por estructuras que se conocen como desmosomas o unión íntima. Las células basales se unen a la membrana basal por hemidesmosomas (figura 5).

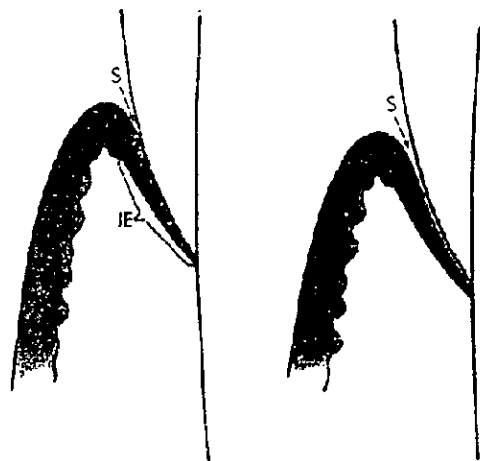


Figura 5. Adherencia Epitelial. Izquierda, concepto de Göttlieb de "adherencia epitelial" ancha y surco gingival de escasa profundidad (S). La base del surco está en el nivel más superficial (coronario) del epitelio adherido, que según la terminología actual es denominado epitelio de unión (JE). Derecha, concepto de Waerhaug, de banda epitelial ancha con surco gingival profundo (S), con base en el nivel más apical del epitelio.⁽⁶⁾

La unión entre el epitelio bucal queratinizado y el tejido conjuntivo subyacente, suele adoptar una forma ondulada. Las proyecciones de las células epiteliales dentro del tejido conjuntivo se conocen como espigas reticulares. Las proyecciones del tejido conjuntivo se denominan a su vez, papilas del tejido conjuntivo. Es probable que el patrón alternante entre papilas conjuntivas y espigas reticulares epiteliales sean las que otorguen a la encía insertada su textura puntiforme (piel naranja).⁽⁶⁾

4.3.6 TEJIDO CONJUNTIVO

El tejido conectivo gingival se conoce también con el nombre de lámina propia. Es denso y tiene una orientación funcional compleja, la cual se desarrolla gradualmente durante la erupción dentaria y presenta algunas fibras elásticas. La función de las fibras es estabilizar la encía al proceso alveolar y al diente, por lo tanto

estabilizar el diente al hueso. Está formada por una capa papilar subyacente al epitelio, compuesta por proyecciones y una capa reticular contigua al periostio del hueso.

4.4 FIBRAS GINGIVALES

En la encía marginal existe una disposición de las fibras (ligamento circular) que mantiene el epitelio en íntimo contacto con el diente manteniendo así el sellado epitelial.

Aunque las fibras gingivales no discurren como unidades aisladas o en haces de fibras, las direcciones que siguen fundamentalmente dentro del entrecruzamiento general nos permite diferenciar los siguientes grupos de fibras:

- Fibras gingivales libres que van desde el cemento hacia la encía libre.
- Fibras papilares; desde el cemento hasta el extremo de la papila.
- Fibras transeptales que van interproximalmente de diente a diente, por encima de la cresta ósea.
- Fibras circulares, rodeando total o parcialmente al diente.
- Fibras alveolo-crestales, corren desde el cemento a la cresta alveolar.
- Fibras gingivocrestales, desde la encía a la cresta alveolar.
- Fibras del proceso alveolar desde la lámina basal de la encía libre e insertada hasta el proceso alveolar.
- Fibras verticales, más ó menos paralelas al proceso alveolar, sin orientación funcional aparente.
- Fibras dento-gingivales orientadas radialmente atraviesan la encía insertada vestibular. (figura 6)⁽⁵⁾

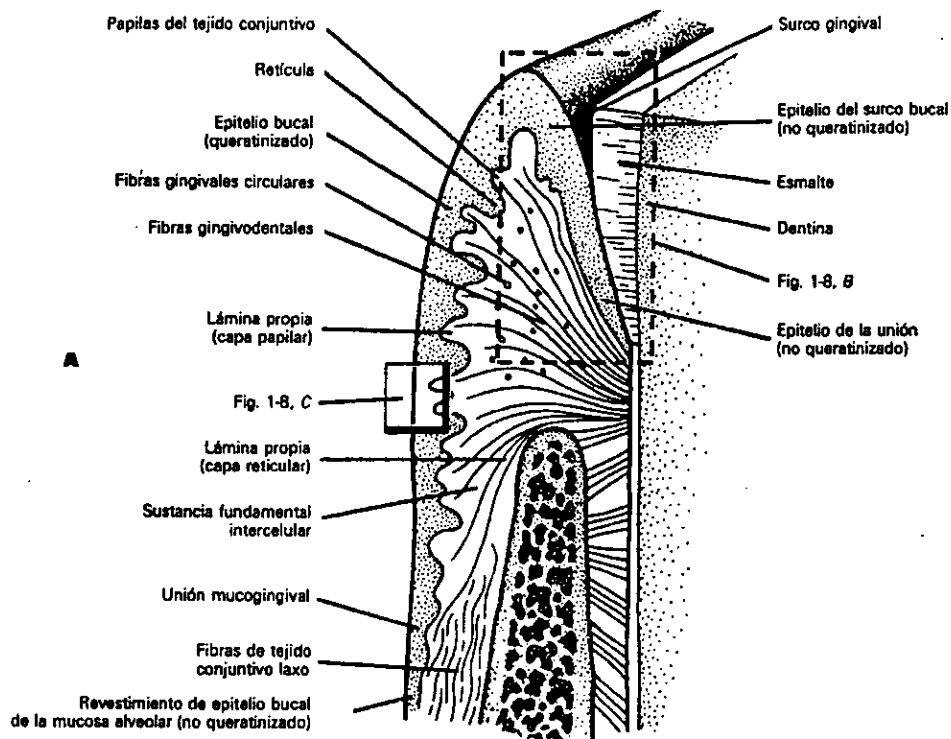


Figura 6. Características histológicas de la encía, corte facio-lingual del tejido parodontal. ⁽⁶⁾

Los grupos de fibras gingivales se pueden resumir en tres principales: Grupo gingivodental, grupo circular y grupo transeptal (figura 7 y 8).

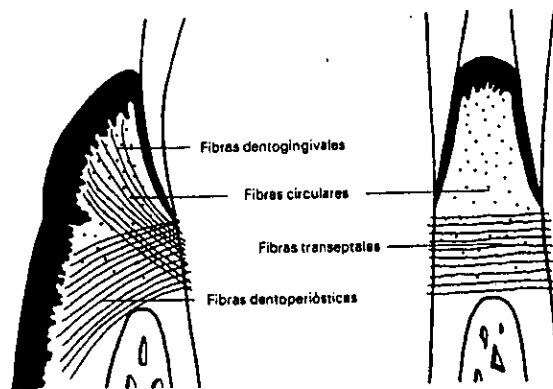


Figura 7. Disposición de fibras del tejido conectivo gingival. ⁽²⁾

Las funciones de estas fibras consiste en mantener firmemente adosado el margen gingival al diente, proporcionar la suficiente rigidez a las fuerzas de masticación y unir el margen gingival libre al cemento radicular y a la encía insertada adyacente.⁽⁵⁾ En la figura anterior (figura 7) se caracterizan las cuatro principales fibras que forman parte de la encía, es muy interesante ver como las fibras de la encía están en contacto, uniendo dientes vecinos. Durante la enfermedad parodontal estas fibras son deradadas y participan de manera importante en la estabilidad de las piezas dentales; por la cual el tener una enfermedad parodontal en un diente ya localizado, afecta directamente a los dientes que estén colocados de manera contigua.

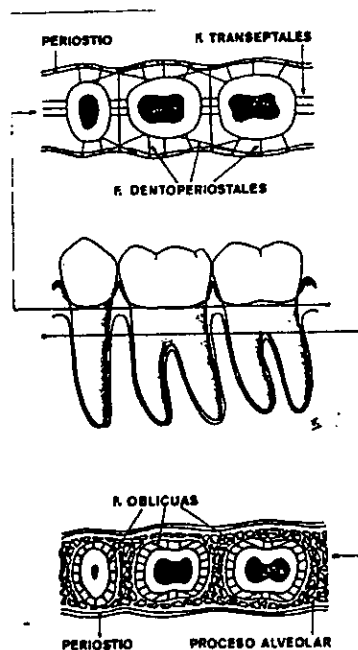


Figura 8. Fibras gingivales y parodontales.⁽²⁾

En la figura 8, se esquematizan los principales grupos de fibras gingivales y parodontales, así como su relación anatómica con las estructuras del parodonto, vista desde varios cortes efectuados en los dientes posteriores inferiores (segundo premolar, primer molar y segundo molar).

4.5 CÉLULAS DEL TEJIDO CONECTIVO

El fibroblasto es el elemento celular predominante en el tejido conectivo gingival. Entre los haces de fibras se encuentran abundantes fibroblastos. Como sucede en el tejido conectivo de cualquier otro sector del organismo, los fibroblastos sintetizan y secretan las fibras colágenas, así como elastina, proteínas colagenasas, glucoproteínas colagenasas, glucoproteínas y glucosaminoglucanos. La renovación de las fibras colágenas y otros componentes químicos, así como su degradación, son reguladas por los fibroblastos (figura 9). Estos también regulan la cicatrización de heridas después de intervenciones quirúrgicas, traumatismo ó como resultado de un proceso patológico.

En encías aparentemente normales, podemos encontrar, leucocitos y células plasmáticas en el tejido conectivo. Los mastocitos están distribuidos por todo el organismo y son abundantes también en el tejido conectivo de la mucosa bucal y la encía. En una encía clínicamente normal, se encuentran pequeños focos de células plasmáticas y linfocitos en el tejido conectivo cerca de la base del surco. Los neutrófilos pueden observarse en alto número, tanto en el tejido conectivo gingival como en el surco. Estas células inflamatorias están normalmente presentes en pequeñas cantidades de las encías clínicamente sanas. ⁽¹⁾



Figura 9. Microscopia electrónica de transmisión de un fibroblasto gingival humano procesado en el laboratorio de bioquímica de la facultad de Odontología.

4.6 VASCULARIZACIÓN

La vascularización de la encía proviene de: 1. Arteriolas supraperiósticas a lo largo de las superficies vestibulares y linguales 2. Vasos del ligamento periodontal 3. Arteriolas que llegan al tabique interdental como se muestra en la figura 10.⁽⁵⁾

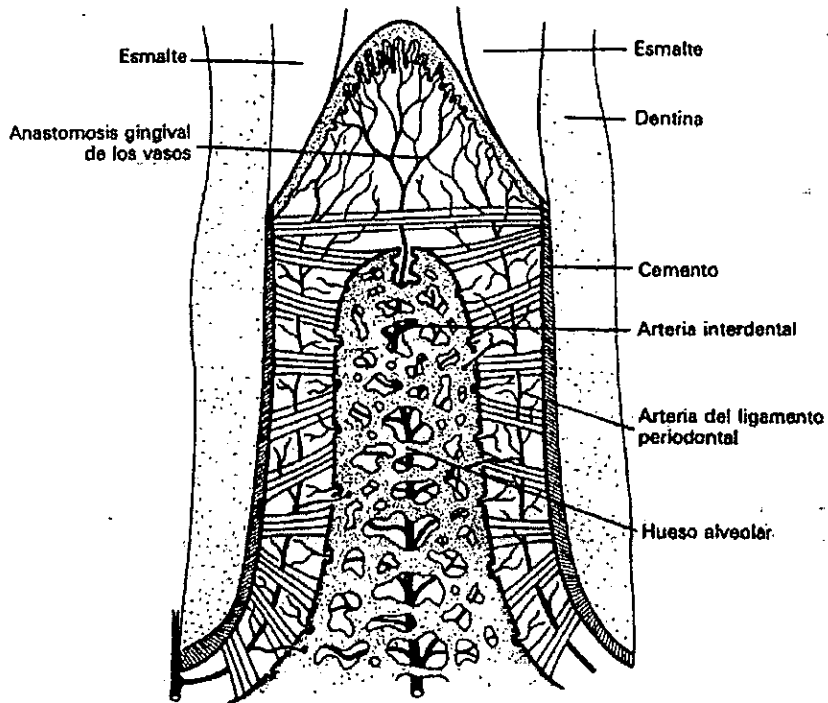


Figura 10. Vascularización del tejido periodontal. ⁽²⁾

4.7 INERVACION

La inervación de encía procede de las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino. La encía vestibular de los dientes posteriores y superiores es inervada por el nervio alveolar superior, mientras que la cara facial de los incisivos y caninos superiores lo es por la rama labial del nervio infraorbitario. El nervio nasopalatino inerva la encía palatina de los dientes anteriores y posteriores, mientras que el nervio palatino anterior inerva los dientes posteriores y superiores. La encía vestibular de los molares y premolares inferiores es inervada por el nervio vestibular largo, en tanto que la encía anterior de los dientes anteriores es inervada por el nervio mentoniano. La encía lingual de todos los dientes inferiores es inervada por el nervio lingual.⁽⁶⁾

4.8 CRITERIOS CLÍNICOS DE LA ENCÍA NORMAL

- **COLOR.** El color de una encía sana es por lo regular rosa pálido ó coral; el aspecto rosa pálido se compara al rojo de la mucosa bucal que se debe al grosor y estado queratinizado de la superficie del epitelio. El color se puede modificar por la presencia de pigmentación en personas de color oscuro y por el flujo sanguíneo a través de los tejidos.
- **SUPERFICIE.** La superficie de la encía en seco debe ser rugosa y granulada, presenta una superficie irregular, con puntilleo que parece cáscara de naranja, el grado de puntilleo varía de manera considerable dentro de la clasificación normal.
- **FORMA.** La forma de la encía depende del contorno y tamaño de las áreas interdentes, las cuales a su vez dependen de la forma, y posición del diente. La punta de la papila gingival es la parte más incisal u oclusal de la encía. El margen gingival es delgado tiene una terminación contra el diente en forma de filo de cuchillo y en la mayor parte de los dientes es recortado.
- **CONSISTENCIA.** A la palpación con un instrumento romo, la encía debe ser firme, reluciente y adherida a los tejidos subyacentes; la encía marginal, aunque es movable, tiene que estar fija a la superficie del diente.⁽²⁾

4.9 CEMENTO

Es el tejido mesenquimatoso calcificado que forma la capa externa de la raíz dentaria. Carece de inervación, aporte sanguíneo directo y drenaje linfático. Cubre la totalidad de la superficie radicular y en ocasiones parte de la corona de los dientes. No es tan duro como la dentina pero tiene las mismas características minerales y cristalinas que el hueso y la dentina.

4.9.1 HISTOLOGÍA

Existen dos formas principales de cemento en la raíz: cemento acelular o primario y celular o secundario. Ambos se caracterizan por presentar una matriz interfibrilar y fibrillas colágenas.

Cemento acelular. Suele ser la primera capa depositada y por lo tanto se encuentra inmediatamente adyacente a la dentina. Predomina en la región cervical aunque puede cubrir la raíz entera.

Cemento celular. Este cemento por el contrario cubre las regiones media y apical de la raíz dentaria.

Ambos tipos de cemento se distribuyen en forma laminada separados por líneas paralelas a lo largo de la raíz del diente. La estructura de cemento celular es similar a la del acelular, salvo por la presencia de cementoblastos atrapados. Estas células se encuentran localizadas en lagunas ó pueden extender sus terminaciones citoplasmáticas a través de conductos o canalillos. Después de su incorporación al cemento se llaman cementocitos.

4.9.2 FUNCIONES DEL CEMENTO

La función del cemento es transmitir las fuerzas oclusales al ligamento periodontal. Existe un alto nivel de renovación en los cementoblastos así como en las fibras colágenas cercanas al cemento, así pues, el cemento está en continuo cambio formativo con períodos de reparación y de reabsorción alternantes. El trauma oclusal puede llevar a la reabsorción del cemento.

La reabsorción cementaria también se puede producir por movimientos ortodónticos, quistes, tumores, dientes sin antagonistas (sin función) así como enfermedades parodontales y periapicales.

4.10 HUESO ALVEOLAR

El hueso alveolar forma y sostiene los alveolos dentarios (figura 11). Está compuesto por la pared interna del alveolo, la lámina cribiforme formada por hueso compacto, el hueso de sostén, formado por hueso esponjoso trabecular y por las tablas vestibular y palatina.

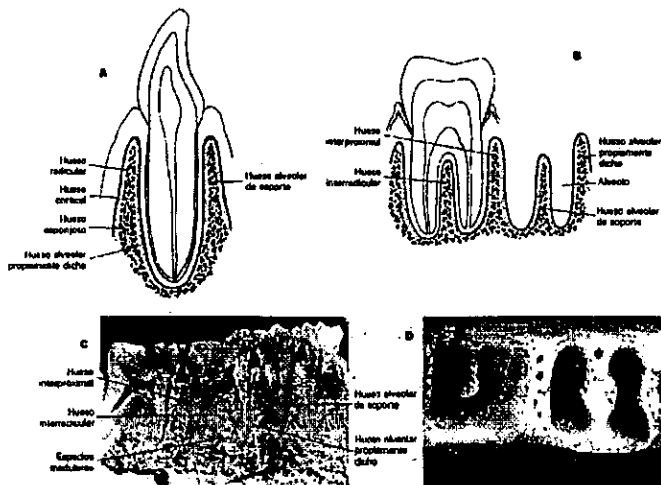


Figura 11. Hueso alveolar. (2)

El contorno óseo se adapta a la prominencia de las raíces. La altura y el espesor de las tablas vestibular y lingual están en relación, con la angulación de la raíz en relación al hueso y con las fuerzas oclusales. Debido a la angulación radicular y al espesor mínimo del hueso, en ocasiones la raíz queda cubierta por periostio y encía. Cuando el margen se encuentra intacto, estas zonas se denominan fenestraciones (ventana con una porción de raíz expuesta a la encía) y dehiscencias cuando en margen ha desaparecido.

El hueso alveolar se compone de la matriz calcificada y de los osteocitos encerrados en cavidades o lagunas. Estos envían una serie de prolongaciones o ramificaciones a través de los canalículos, que forman una red que se anastomosa y entrecruza. Estas células tienen una gran importancia como transportador de oxígeno y nutrientes desde el sistema vascular hasta el entorno celular, eliminando también las sustancias metabólicas. El equilibrio entre aposición ósea (producida por los osteoblastos) y la reabsorción ósea (producida por los osteoclastos) interviene en la remodelación del hueso durante toda la vida.⁽⁵⁾

4.11 ENFERMEDAD PARODONTAL

4.11.1 ETIOLOGÍA

La enfermedad periodontal comprende un grupo de trastornos diferentes, todos los cuales afectan las estructuras de sostén de los dientes y pueden dar por resultado la pérdida dental. ⁽⁷⁾

Los efectos lesivos de los irritantes locales como la placa bacteriana promueven en una primera fase a la gingivitis, y si ésta evoluciona, una periodontitis.

La gingivitis se caracteriza por:

- 1.** Cambio de coloración en la encía a una tonalidad más rojiza.
- 2.** Cambio en la consistencia, textura y forma de la encía.
- 3.** Presencia de hemorragia.
- 4.** Presencia de exudado.
- 5.** No existe migración de la adherencia epitelial. Es decir no hay bolsas. ⁽⁵⁾

Gingivitis y parodontitis son enfermedades inflamatorias de origen bacteriano. La gingivitis puede mantenerse durante muchos años sin dar lugar a una periodonitis. Es reversible con una buena higiene bucal junto a la eliminación consecuente de la placa y de los cálculos dentales.

La etiología de la periodontitis no está aclarada por completo. Los criterios decisivos parecen ser la patogenicidad de los microorganismos, su disposición para penetrar en los tejidos y la respuesta diversa del huésped a la infección. Incluso con tratamiento la reversibilidad de una periodontitis es limitada (nueva formación ósea, reinserción e inserción), sin que vuelva a alcanzarse nunca el tejido original. ⁽⁹⁾ Cuadro I.

Cuadro I. BACTERIAS - DEFENSA DEL HUÉSPED

Bacterias.	↔	Defensa del Huésped.
Productos bacterianos. - Antígeno mitógeno. - Enzima. - Toxina. Invasión bacteriana, infección. Cantidad y composición bacteriana. - Magnitud de la placa (cantidad e higiene bucal). - Composición de la placa. (calidad, patogenicidad). - Retención de la placa, hendiduras naturales e iatrógenias.		Defensa del huésped positiva. - Exudación. - Infiltración. - Defensa inmunológica. - (Función normal) Defensa del huésped defectuosa o debilitada. - Defecto de los leucocitos. - Defecto inmunitario. - Enfermedades sistémicas. - Trastornos funcionales, traumatismos oclusales.

Cuadro 1. Mecanismos de interacción bacteria-huésped. Se muestra la capacidad de las bacterias, para penetrar en los tejidos, la cantidad y composición así como sus productos metabólicos, por una parte, y la defensa del huésped (resistencia), por la otra, determinan el grado de la gravedad de una gingivitis, la formación de una periodontitis, lo que no es menos importante, la velocidad de la destrucción periodontal.⁽⁹⁾

La ausencia total de placa en la cavidad bucal no es alcanzable; se trata de una ilusión que no tiene una base fisiológica. Sin embargo es posible el mantenimiento sano de la encía y del parodonto cuando la cantidad de placa es pequeña, la virulencia de las bacterias reducida y los sistemas defensivos del huésped positivos.

Los productos bacterianos más importantes que dan lugar a la inflamación y a la destrucción, son las quimiotoxinas, los antígenos y los mitógenos. Cuando las bacterias entran directamente en los tejidos (invasión), se habla de una auténtica infección.

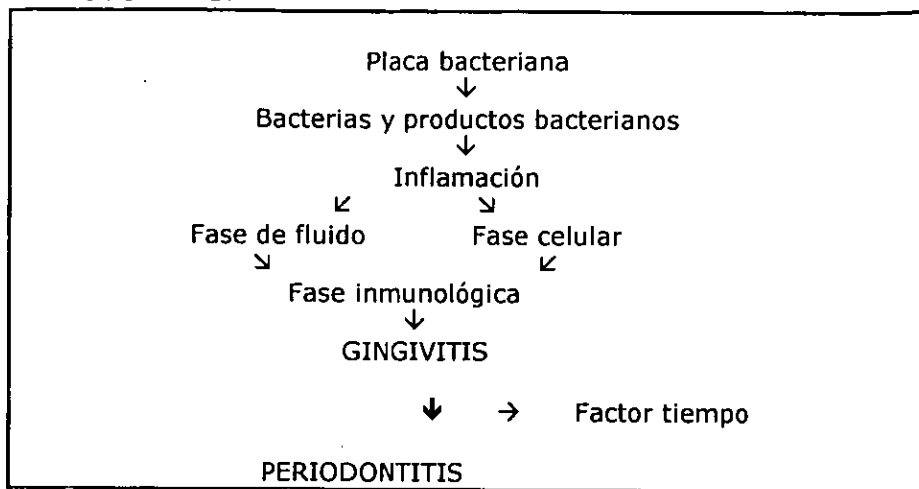
Posiblemente las enzimas bacterianas y las diversas toxinas pueden dañar el parodonto debilitándolo, sin necesidad de una respuesta fisiológica por parte del huésped. En los tejidos han sido encontradas hialuronidasas, condroitín-sulfatasas, enzimas proteolíticas, así como citotoxinas en forma de ácidos orgánicos, amoníaco, sulfhídrico y endotoxinas (L.P.S.) de origen bacteriano.⁽⁹⁾

4.12 PLACA DENTAL

El término placa dental bacteriana o placa dental es muy antiguo, ya que fue utilizado por Black en 1898 para describir la masa de microorganismos que se presentaban en las cavidades de las caries. Se trata de un material blando y adherente al diente, compuesto por microorganismos y sus productos bacterianos y que no es fácilmente eliminado en enjuagatorios con agua. Las bacterias se encuentran unidas entre sí por una sustancia intermicrobiana. Es el primer agente etiológico de la gingivitis y parodontitis. Los factores sistémicos anulan la respuesta del tejido a los factores locales, de aquí, que si al acúmulo de la placa bacteriana se le añaden los factores generales (hematológicos, diabetes, etc.), el problema se va agravando Cuadro II.

La placa es necesaria para iniciar y desarrollar la enfermedad, aunque una pequeña cantidad de placa, sin embargo puede ser mantenida dentro del equilibrio de la agresión y la defensa del huésped. Este equilibrio se puede romper por un aumento de la cantidad de la misma, de la virulencia de las bacterias ó por una disminución de las defensas del sujeto. La explicación de esto se ve claramente en el esquema en que este equilibrio es roto por los factores que amenazan esta agresión como lo son el cálculo, la mala odontología (iatrogenia), la impactación de alimentos o la respiración bucal. El problema radica en la disminución de las defensas por factores de tipo general como una diabetes, una leucemia, alteraciones nutritivas ó trauma de la oclusión.⁽⁵⁾

Cuadro II. FACTORES ETIOLÓGICOS DE LA GINGIVITIS Y PERIODONTITIS. ⁽⁵⁾



4.12.1 CLASIFICACIÓN DE PLACA DENTAL

La placa dentobacteriana se clasifica como placa supragingival y placa subgingival de acuerdo con su localización; la primera se refiere a aquellas agresiones microbianas que se encuentran en las superficies dentales; sin embargo, es posible que se extiendan en el fondo del surco gingival donde están en contacto inmediato con la encía marginal.

4.12.1.1 Placa supragingival. La placa supragingival se detecta a simple vista cuando alcanza un cierto grosor, esto sucede en uno o dos días; en aquellos sitios donde no se remueve de manera intencional, por fuerzas de masticación u otras funciones vitales. Es amarilla ó blanquecina y tiene mayor grosor a lo largo del tercio gingival del diente y las áreas interproximales, cuando es muy delgada para detectar su presencia, se determina con el uso de una solución reveladora como la eritrosina, ó al raspar la superficie dental con una sonda ó cureta. Se encuentra en el tercio gingival de la corona, área que por lo regular carece de autoclisis; la abrasión que produce la comida, la higiene bucal y la masticación normal es por lo regular suficiente para prevenir depósitos importantes de placa en las superficies lisas y los dos tercios oclusales de las áreas vestibular y lingual de la corona; por el contrario, las zonas interproximales

acumulan placa, ya que no tienen autoclisis y son de difícil alcance para el cepillo dental. Los depósitos de placa se presentan, en fisuras, fosas e irregularidades de las superficies oclusales, fluctuaciones y grietas de las superficies lisas de la corona; se forma con facilidad en dispositivos ortodónticos, así como en todo tipo de restauraciones figura 12. ⁽²⁾

Sobre un diente totalmente limpio se acumula en un tiempo de minutos a horas una capa de 0.1-0.8 μm de grosor (cutícula del esmalte), formada por glucoproteínas de la saliva. Sobre esta capa se establecen en las primeras 24 horas colonias de bacterias predominantemente grampositivas (*Streptococcus sp.*, *Actinomyces sp.*). En los días siguientes continúa el crecimiento de la placa con el asiento de cocos gram-negativos, así como fuso-espirilares grampositivos y gram-negativos. A las tres semanas se observa, especialmente en la proximidad del borde de la encía un marcado aumento de fusiformes. Por efecto de la liberación de sustancias, la flora bacteriana provoca en el tejido una fuerte migración de los leucocitos PMN y una exudación en el *sulcus* (barrera leucocitaria contra las bacterias). Con la aparición de la gingivitis se debilita el epitelio de unión, por lo que las bacterias pueden penetrar en la región subgingival entre el diente y el epitelio de la bolsa gingival (figura 12). ⁽⁹⁾

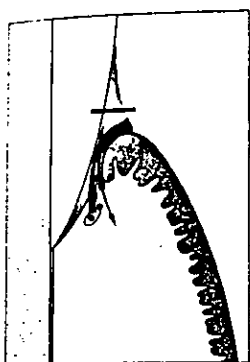


Figura 12. Primera reacción del huésped a la placa (gram-positivo y gram-negativo). Migración de los granulocitos polimorfonucleares, dirigidos quimiotácticamente y formación de una barrera leucocitaria. ⁽⁹⁾

4.12.1.2 Placa subgingival. La placa subgingival es aquella agregación bacteriana que se encuentran por completo dentro del

surco gingival ó bolsas parodontales, y se componen de bacterias ordenadas en capas ó zonas de placas adheridas a la superficie dental y otras en la interfase del tejido, algunas más se adhieren al revestimiento epitelial de la bolsa, así que resisten la remoción con el flujo del líquido gingival. También hay agregaciones de bacterias que representan una forma de placa dental en los surcos y las fisuras de la corona del diente; es probable que estén relacionadas con la caries en estos sitios; también se acumulan alrededor de restauraciones dentales y en todos los aparatos protésicos y ortodónticos colocados en la cavidad bucal (figura 13).

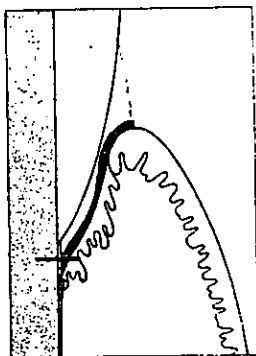


Figura 13. Placa subgingival en el exudado de la bolsa se perciben grandes colecciones sueltas de bacterias anaerobias gram-negativas. Se encuentran también formaciones de filamentos similares a escobillas.⁽⁹⁾

Subgingivalmente se puede distinguir entre una placa adherente y no adherente (figura 13). Sobre la superficie de la raíz del diente se deposita una capa adherente de grosor variable, compacta, similar a la de la gingivitis y compuesta de cocos grampositivos y sobretodo fusiformes y de diversos tipos de Actinomices. Esta placa adherente puede calcificarse (cálculo subgingival).

Adosadas al tejido blando de la bolsa se encuentran colecciones sueltas de bacterias (swimmers), que se componen casi exclusivamente de anaerobios gramnegativos: cocos, espiroquetas y espirilos (*Bacteroides* sp; en particular *Bacteroides gingivalis*). Estos anaerobios patógenos y gramnegativos, en parte móviles y no

adherentes, proliferan fuertemente en las fases agudas y parece que desempeñan un papel importante en la progresión de la periodontitis.⁽⁹⁾

4.12.2 CÁLCULO DENTAL

La mineralización de la placa dental para formar cálculo se produce *in vivo*, pero no es necesaria la presencia de los microorganismos; por lo menos se ha informado de una estructura cristalina blanca. Sin embargo sería un error considerar la formación de tártaro como independiente de la presencia de la actividad metabólica de los microorganismos de la placa.

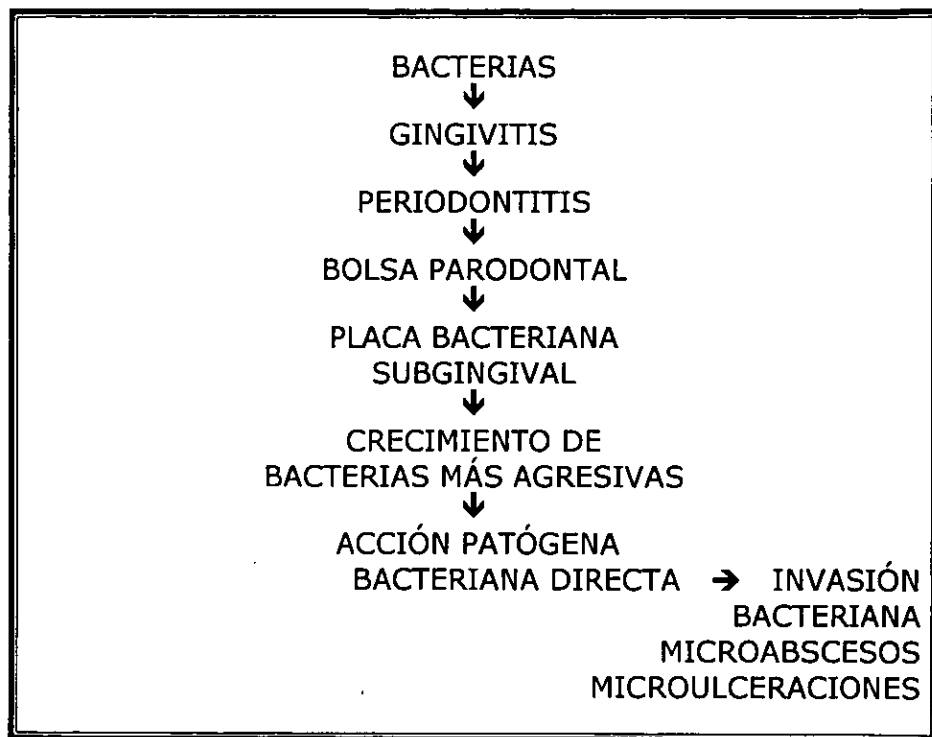
4.12.2.1 Composición. La composición del cálculo varía considerablemente entre los individuos y dentro de un mismo individuo. El contenido orgánico constituye aproximadamente el 12 % del cálculo e incluye proteínas, hidratos de carbono, lípidos y varios tipos de microorganismos no vitales, especialmente del tipo filamentosos como el *Leptothirex*. El componente orgánico principal es el fosfato de calcio, que está presente como material amorfo y en forma cristalina. Las formas cristalinas incluyen: hidroxiapatita, aproximadamente un 20 %; fosfato octacálcico, aproximadamente un 50 %. La bruxita, la whitlockita y el magnesio constituyen el porcentaje restante.⁽¹¹⁾

4.13 INFECCIÓN

En las periodontitis, que presentan un curso rápido y progresivo así como en las juveniles, las bacterias atraviesan las bolsas epiteliales y penetran en el tejido conjuntivo subepitelial; generalmente esto ocurre sólo en la profundidad de las bolsas, en donde pueden sortear el infiltrado masivo de células redondas, situado marginalmente. Lo más probable es que estas bacterias produzcan sustancias (leucotoxinas) para su camuflaje, con las cuales al principio engañan ó paralizan el tropismo quimiotáctico en las células fagocitarias (leucocitos PMN). Finalmente los invasores son reconocidos y destruidos por el sistema defensivo. En el caso de una invasión por un número poco elevado se forman las micronecrosis, mientras que en las invasiones masivas quedan construidos abscesos supurantes con drenaje externo. (Cuadro III)

No está claro si las lesiones hísticas resultantes son consecuencia directa de la citotoxicidad bacteriana ó se deben a reacciones secundarias (hiperreacciones) del sistema inmunitario del huésped ⁽⁹⁾

Cuadro III. CURSO ETIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN PARODONTAL.⁽⁵⁾



4.14 CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES PARODONTALES

A través de los años se crearon diferentes sistemas de clasificación para organizar y dar nombre a los diversos trastornos y entidades patológicas parodontales. A pesar de que las clasificaciones vigentes revelan información y conocimientos actuales, que describen la respuesta sistémica, microbiológica, radiográfica y clínica del huésped respecto a la enfermedad, otras más definitivas las reemplazarán una vez que se comprenda por completo la etiología de las alteraciones y sus diversos padecimientos.



Figura 14. Proceso de migración de la encía (formación de bolsas parodontales).⁽²⁾

La gingivitis y la periodontitis son enfermedades que pueden contraer personas aparentemente sanas; son los trastornos parodontales más frecuentes. La primera es un proceso inflamatorio de la encía, en el cual, el epitelio de unión, aunque es modificado por la enfermedad, se une al diente en su nivel original; la porción más apical del epitelio de unión se localiza en el esmalte, ó cerca de la unión cemento-esmalte. Se habla de periodontitis cuando se pierde tanto la inserción del ligamento periodontal, como el soporte óseo alveolar (figura 14). A esto se vincula la migración apical del epitelio de unión sobre la superficie radicular. La periodontitis se define como la migración del epitelio de unión hacia apical de la unión cemento- esmalte.⁽²⁾

4.14.1 Gingivitis marginal aguda. Aparece como la primera respuesta a la presencia de la placa bacteriana a nivel del margen gingival, con un cambio de coloración más intenso, hemorragia y aumento del exudado. Este proceso patológico es en la primera fase, prácticamente intrascendente y el paciente no acude a la clínica, y sin embargo, es en ese momento cuando las medidas de higiene y control de placa pueden llevar a una desaparición total de todo el proceso en muy pocos días. Si todo va evolucionando por que la presencia de la placa persiste llegamos a la gingivitis marginal crónica.

4.14.2 Gingivitis marginal crónica. La encía presenta las mismas alteraciones ya comentadas anteriormente como lo es el cambio de color, forma, consistencia, textura, etc. La mala higiene del paciente favorece que el proceso siga avanzando y la hemorragia gingival sea mayor.

El cálculo no se suele presentar en el joven, aunque ya en la pubertad se puede empezar a observar.

4.14.3 Gingivitis de la erupción dentaria. En el momento de la erupción dentaria es frecuente ver ciertos fenómenos de gingivitis asociadas con la erupción dental. La erupción por si misma no provoca gingivitis sino que las alteraciones inflamatorias por la placa pueden acentuar la gingivitis alrededor de estos dientes. Con una higiene correcta se puede llegar a corregir este problema.

4.14.4 Gingivitis de la maloclusión. Dientes con malposiciones dentarias, falta de alineación en la arcada ó con caries, pueden facilitar el acúmulo de la placa bacteriana y producir una gingivitis que no está relacionada directamente con esta patología, sino con la mala higiene de estos pacientes. La masticación unilateral puede agravar estas manifestaciones.

En esencia, la gingivitis producida por la placa es avanzada en estos pacientes por la maloclusión, sobremordida, falta de alineación de los dientes, respiración bucal, etc. Es necesario proceder a las medidas de higiene bucal y a solucionar estos factores modificantes que forman el acúmulo de la placa.

4.14.5 Recesión gingival. Se ve frecuentemente en los niños y muchas veces es debido a una posición inadecuada de un diente en la arcada lo que facilita una recesión gingival localizada. Se presenta en

los dientes inferiores, generalmente, cuando están en posición labial o inclinados. A veces también la presencia de frenillos o una encía insertada demasiado estrecha puede colaborar a facilitar la presencia de la placa en estas regiones. Se deben corregir estos factores y reinstaurar las medidas de higiene bucal.

4.14.6 Infección gingival aguda. Lo más frecuente es la gingivostomatitis herpética aguda producida por el virus del herpes simple y se presenta en lactantes y niños menores de seis años, también se presenta en adolescentes y adultos.

Generalmente, las infecciones bacterianas complican el cuadro clínico y dan unas características en las cuales la encía eritematosa y brillante de la mucosa adyacente se caracteriza fundamentalmente por la presencia de vesículas pequeñas esféricas que se localizan en cualquier región de la mucosa bucal, en especial en la región gingival. A las 24 horas la mucosa se rompe, dando lugar a pequeñas ulceraciones dolorosas con bordes rojo y una región central hundida amarillenta o blanco-grisácea. La manifestación típica tiene una duración de entre siete y diez días. No quedan cicatrices después de la curación de las úlceras. Hay fiebre, malestar general y la encía marginal es edematosa y hemorrágica. El paciente refiere dolor e imposibilidad de masticación y deglución.

4.14.7 Gingivitis úlcero necrosante aguda. Conocida también como estomatitis vesículo membranosa, ulcerosa o boca de trinchera. La incidencia es principalmente en personas jóvenes entre los 18 y 30 años de edad.⁽⁵⁾ La gingivitis ulcerosa es una inflamación de la encía, aguda, dolorosa, necrosante y rápidamente progresiva, que puede evolucionar a un estadio subagudo ó crónico. Sin tratamiento, en la mayoría de los casos evoluciona rápidamente a una periodontitis ulcerosa. La enfermedad aparece rara vez de forma generalizada y con la misma intensidad en toda la dentadura; puede estar muy avanzada en algunos dientes anteriores, mientras que en los premolares o molares vecinos no aparece ó solo se hace en forma discreta (o a la inversa). No aparece clara la razón de esta presentación irregular. Generalmente, la gingivitis ulcerosa sólo muestra bolsas de pequeña profundidad, dado que, al mismo tiempo que se produce la pérdida de inserción, necrotizando la encía y destruyéndola. Sólo raras veces y en casos graves, se encuentran ulceraciones por contagio de la mucosa.

Junto con la gingivitis simple, la gingivitis ulcerosa es la enfermedad más frecuente en las encías. Los factores locales son la mala higiene oral, proliferación de espiroquetas, bacteroides y bacterias fusiformes

en la placa, recovecos marginales y tabaquismo. Así como el estado general, agotamiento, estrés, edad.

El curso clínico es agudo y las papilas atacadas pueden quedar destruidas por la ulceración en unos días. También sin tratamiento puede pasar de la fase aguda a un estadio más crónico a causa de una mejora de la resistencia, o de un tratamiento instaurado por el paciente mismo. La gingivitis ulcerosa no tratada recidiva frecuentemente y puede evolucionar a una periodontitis ulcerosa con pérdida del hueso alveolar especialmente en la región interdental.⁽⁹⁾ A veces, las lesiones pueden llegar a la región amigdalina y originar una gran halitosis, adenopatías regionales, cervicales y febrícula. Los síntomas son:

- Hemorragia.
- Ulceración.
- Dolor.
- Seudomembrana.
- Comienzo brusco.
- Adenopatías.
- Mal estado general.
- Halitosis.
- Febrícula.

4.14.8 Hipertrofia gingival. Se trata de un aumento de tamaño de la encía, puede ser generalizado a una región extensa de la boca o bien localizado a un área específica.

- **Inflamatorio.** Es debido a la presencia de la placa bacteriana y se localiza en una papila ó en la encía marginal. Hay que diferenciarla del absceso gingival en el que se trata de un acúmulo de pus en la región gingival de forma aguda.
- **El tipo no inflamatorio.** Se presenta generalmente en aquellos pacientes epilépticos que toman ciertos compuestos como Delantina (difenil hidantoinato sódico) que provoca un aumento del tamaño de la encía, de tipo generalizado y que puede llegar a cubrir todas las coronas ó parte de ellas. El tratamiento es quirúrgico y un estricto control de placa.
- **El tipo hereditario ó familiar.** Es raro y no se sabe a que se debe. La encía hipertrófica es dura y fibrosa.
- **En el embarazo.** Puede aparecer también una hipertrofia gingival que a veces puede estar localizada en un área específica como es una papila interdental y que entonces recibe el nombre de tumor del embarazo. A veces desaparece espontáneamente después del parto por lo que el tratamiento quirúrgico si se hace, se debe posponer a este periodo.

4.14.9 Periocoronitis. La periocoronitis se presenta alrededor de la encía que cubre a la corona de un diente en erupción y es más frecuente a nivel de tercer molar. Esto facilita que el capuchón de encía sobre la corona almacene residuos alimentarios y placa bacteriana que perpetúa la infección. Es un foco que se debe eliminar quirúrgicamente con la extracción del cordal (foliculo) incluido. Retener este foco va a significar el mantenimiento de un factor patológico local con todas las complicaciones que ello conlleva.

4.14.10 Gingivitis descamativa crónica. Se trata de un cuadro raro que aparece generalmente en mujeres alrededor de la menopausia. Se caracteriza por una encía rojiza, edematosa, brillante, dolorosa, especialmente con la masticación de alimentos excesivamente condimentados. El simple contacto con el agua, o con un spray de aire es doloroso y sangrante. El tratamiento es a base de profilaxis, raspados y alisados así como la aplicación de corticoides por vía oral y local. Cuadro IV.⁽⁵⁾

Cuadro IV. ENFERMEDADES Y TRANSTORNOS GINGIVALES

A. Gingivitis.

1. Gingivitis marginal.
2. Gingivitis úlcero-necrosante aguda.

B. Gingivitis y otras alteraciones gingivales relacionadas con complicaciones sistémicas.

1. Alteraciones gingivales relacionadas con hormonas sexuales.
 - a. Gingivitis del embarazo.
 - b. Gingivitis relacionada con anticonceptivos bucales.
 - c. Gingivitis relacionadas con otras alteraciones hormonales (ovarios poliquísticos, pubertad y menopausia).
2. Alteraciones gingivales relacionadas con enfermedades de la piel y membranas mucosas.
 - a. Pénfiguro.
 - b. Penfiguroide cicatrizal.
 - c. Pénfiguro buloso.
 - d. Lique plano.
 - e. Psoriasis.
 - f. Gingivitis descamativa.
 - g. Lupus eritematoso.
 - h. Eritema multiforme.
 - i. Fibromatosis gingival idiopática.
 - j. Estomatitis aftosa recurrente.
3. Gingivitis en padecimientos sistémicos generalizados.
 - a. Leucemia aguda.
 - b. Trombocitopenia.
 - c. Hemofilia.
 - d. Síndrome Sturge-Weber.
 - e. Granulomatosis de Wegener.
 - f. Esclerosis.
 - g. Hipoadrenocorticismo.
 - h. Deficiencia de vitamina C.
 - i. S.I.D.A.
 - j. Sarcoidosis.
4. Gingivostomatitis infecciosa.
 - a. Gingivostomatitis herpética.
 - b. Herpes zoster.
 - c. Herpangina.
 - d. Sífilis.
 - e. Candidiasis.
 - f. Actinomicosis.
 - g. Histoplasmosis.

5. Alteraciones gingivales relacionadas con el consumo de fármacos.

a. Tratamientos sistémicos.

- i. Fenitoína (Dilantin).
 - ii. Valproato sódico.
 - iii. Ciclosporina.
 - iv. Dehidropiridinas: nifedipina (Procardia) y nitrendipina.
- b. Compuestos con efectos locales.**
- i. Compuestos cáusticos.
 - ii. Metales pesados.

C. Transtornos gingivales diversos.

- 1. Quistes gingivales.
- 2. Fístulas gingivales.
- 3. Neoplasias.
- 4. Hendiduras gingivales.
- 5. Recesión gingival.
- 6. Frenillo atípico o ligamentos musculares.
- 7. Epulis o granuloma piógeno gingival.
- 8. Abscesos gingivales.

Cuadro VI. Se presentan las enfermedades y trastornos gingivales muchos de los cuales se especifican en hojas anteriores. ⁽²⁾

4.15 PERIODONTITIS

La parodontitis es el resultado del progreso inflamatorio de la gingiva a las estructuras del parodonto. Como consecuencia de este daño se da la reabsorción del hueso alveolar y la pérdida de unión, seguida por la formación de bolsas parodontales.⁽¹²⁾

La característica más clara para distinguir una gingivitis de una parodontitis es la pérdida de la unión del tejido conectivo con el hueso y la formación de una bolsa parodontal con migración apical del epitelio de unión. Una consecuencia de esta migración es que el epitelio de unión llega hasta la raíz del diente, y la pared externa de la bolsa es cubierta por un epitelio que es llamado epitelio de la bolsa. Los estadios iniciales de la periodontitis son fácilmente detectables mediante microscopía, pero difíciles de detectar clínicamente.

El tejido conectivo cambia sus características en la gingivitis. El proceso primeramente afecta las fibras dentogingivales y dentoperiósticas; para después afectar las fibras del ligamento periodontal. La pérdida del tejido conectivo en la superficie de unión con la raíz es irreversible porque el epitelio de la bolsa, entre el cemento y el tejido conectivo impide la reinserción de las fibras colágeno en su superficie.

Por debajo de la bolsa parodontal se encuentra una población de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas infiltradas en el área. El infiltrado generalmente se extiende desde la bolsa hasta la cresta del hueso alveolar sufriendo resorción por parte de los osteoclastos.

La patología puede no presentar un cambio en la población de las células inflamatorias. Pequeñas cantidades de ciertos linfocitos T, macrófagos y monocitos. Algunos expertos profundizan en los efectos de otros tipos de citoquinas. Algunas de estas citoquinas incluyen IL-1, TNF, e IL-6.⁽¹³⁾

La periodontitis se desarrolla por lo regular a partir de la gingivitis; sin embargo, no todas las gingivitis dan lugar a una periodontitis. La cantidad de virulencia de los microorganismos (patógenos) por una parte, y los factores de resistencia del huésped (estado inmunológico), por otra, son decisivos en la actividad inflamatoria y en la progresión de la destrucción periodontal. Con una higiene bucal meticulosa (eliminación de placa y cálculos) puede prevenirse casi siempre una periodontitis.⁽⁹⁾

El propósito de la clasificación es proporcionar una base actualizada de la terminología útil en la comunicación entre profesionales, pacientes y personas relacionadas con la rama. Para lo cual se han clasificado diferentes tipos de parodontitis. ⁽²⁾

4.15.1 Periodontitis crónica habitual. Es el clásico cuadro clínico que se presenta en el adulto a partir de los cuarenta años de edad y que no ha realizado unas medidas correctas de higiene bucal.

En una próxima etapa aparece el cambio de coloración, textura, consistencia, forma y pérdida de adaptación de la encía, hemorragia espontánea por el cepillado, el sondaje y presencia de exudado. Posteriormente aparece la bolsa periodontal, movilidad, furcaciones, migración dentaria y diastemas.

El cuadro va avanzando lenta y progresivamente aún cuando se intercalan episodios de actividad y de reposo en función de la capacidad invasora de los gérmenes y de la respuesta del huésped.

Si el proceso no se detiene, la pérdida de inserción y estructura es tan intensa que el diente se exfolia. Todo esto se puede prevenir evitando el acúmulo de la placa e instaurando las medidas de higiene bucal.

4.15.2 Periodontitis crónica destructiva ó de rápido avance. Es el mismo cuadro clínico anterior, pero con una evolución muy rápida, lo que lleva a una gran destrucción de estructuras parodontales en muy poco tiempo.

Es aquel paciente que acude a la consulta con especial sintomatología periodontal, no acepta el tratamiento y vuelve al cabo de uno ó dos años, con un estado periodontal deplorable, habiendo perdido varios dientes y con las bolsas profundas y grandes diastemas. Las causas no se saben de manera cierta, pero se sospecha que puede ser una especial agresividad de los gérmenes ó una baja respuesta del sujeto a los mismos.

4.15.3 Periodontitis juvenil. Es un cuadro clínico que afecta a sujetos antes de los veintiún años de edad, con una también especial agresividad y evolución de la enfermedad. Se presenta en dos formas: Generalizada y Localizada.

En la generalizada se afectan la mayor parte de los dientes. En la localizada la patología se centra en algunos factores. Baer (1971) definió esta enfermedad como "aquella afección del parodonto que es producida en un adolescente sano y caracterizada por una rápida pérdida de hueso alveolar en casi más de un diente de la dentición permanente, poco acúmulo de placa y poco a ninguna inflamación clínica".

Características clínicas: La periodontitis juvenil se diagnostica con dificultad en periodos incipientes por su falta de síntomas y signos, salvo en exploraciones rutinarias, ya que por otra parte, salvo en casos de mala higiene donde la encía estará inflamada, normalmente tiene un aspecto sano. La edad de comienzo es alrededor de la pubertad, entre los once y trece años de edad, de ahí que no se aprecie en la dentición mixta.

Parece que existen ciertos antecedentes familiares, aunque no se ha demostrado claramente. Entre los factores locales sorprende que en la exploración se demuestran graves alteraciones óseas con pérdidas amplias y una baja ó mínima cantidad de placa bacteriana. En las radiografías, la imagen típica es una pérdida ósea alveolar en forma de arco a nivel del diente o dientes afectados, pérdida que se produce de forma bilateral a manera de espejo. Los dientes más afectados son los incisivos y primeros molares. En síntesis la clínica se caracteriza por:

- 1.- Afectación de incisivos y primeros molares especialmente.
- 2.- Falta de inflamación clínica.
- 3.- Poca placa dental.
- 4.- Gran movilidad y migración dentaria.
- 5.- Pérdida vertical en forma de arco.
- 6.- Tasa de pérdida ósea tres a cuatro veces más rápida.
- 7.- Presencia de gérmenes típicos en su bolsa periodontal el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Capnocytophaga*.
- 8.- Defectos inmunitarios como alteración de la quimiotaxis de los neutrófilos e inhibición de la migración de macrófagos.

4.16 ABSCESO PERIODONTAL

Se presenta cuando existe una bolsa periodontal profunda con exudado inflamatorio en su interior y cuyo orificio de drenaje se cierra, con lo cual se acumula el contenido inflamatorio en la misma y se produce el absceso. La etiología es el cierre del orificio de salida de la bolsa periodontal. La clínica se caracteriza por la inflamación aguda con aumento de tamaño, enrojecimiento y dolor. El dolor está localizado topográficamente junto al diente afectado. A veces hay adenopatías satélites y extrusión del diente causal.

El tratamiento de urgencia es calmar el dolor, ya que el paciente presenta sensibilidad en la masticación e inclusive para ocluir los dientes entre sí.

Es junto con la Gingivitis Ulcerativa Necrotizante Aguda (GUNA), la única razón de urgencia por la que acuden los pacientes a nuestra consulta periodontal.

Los abscesos parodontales requieren un tratamiento de urgencia en el cual se debe evacuar el pus para liberar la presión sobre los tejidos adyacentes. Se debe penetrar en la bolsa con la sonda periodontal para intentar recanalizar el orificio de salida de la misma y evacuar el contenido, que en este caso es pus.

La evacuación también se puede hacer mediante una incisión con bisturí. Con ello se alivia el dolor, la inflamación disminuye rápidamente y el diente que esté móvil, vuelve a mantenerse en su posición original.

La pérdida ósea en este tipo de pacientes por tener un infiltrado inflamatorio agudo es rápida y extensa, aunque puede ser reversible después del tratamiento correcto de la bolsa.

Es necesario complementar el tratamiento local y quirúrgico con antibióticos, analgésicos y antiinflamatorios (cuadro V).

Cuadro V. ENFERMEDADES Y TRANSTORNOS PARODONTALES

A. Periodontitis del adulto:

1. Clasificación I, II, III, IV de la AAP.
2. Epidemiología: periodontitis de evolución moderada y rápida.
3. Clínica basada en tratamiento: refractaria y recurrente.
4. Clínica basada en la historia: periodontitis ulcerosa necrosante aguda recurrente y periodontitis juvenil poslocalizada.

B. Periodontitis juvenil:

1. Periodontitis localizada juvenil.
2. Periodontitis generalizada juvenil.

C. Periodontitis con complicaciones sistémicas:

1. Periodontitis con alteraciones primarias de neutrófilos.
 - a. Agranulosis.
 - b. Neutropenia cíclica.
 - c. Síndrome Chediak-Higashi.
 - d. Anormalidades en la adherencia de neutrófilos.
 - e. Síndrome de Job.
 - f. Síndrome del "leucocito perezoso".
 - g. Anormalidades en la función de neutrófilos.
2. Periodontitis en padecimientos sistémicos con deterioro de neutrófilos secundario o relacionado.
 - a. Diabetes sacarina tipo I y II.
 - b. Síndrome Papillon-LeFèvre.
 - c. Síndrome de Down.
 - d. Enfermedades inflamatorias del intestino: enfermedad de Crohn.
 - e. Síndrome preleucémico.
 - f. Síndrome de Addison.
 - g. S.I.D.A.
3. Otros padecimientos sistémicos relacionados con alteraciones en la estructura del aparato de inserción periodontal.
 - a. Síndrome Ehlers-Danlos (VIII).
 - b. Histiocitosis (granuloma eosinófilico).
 - c. Sarcoidosis.
 - d. Escleroderma.
 - e. Hipofosfatasa.
 - f. Hipoadrenocorticismos.
 - g. Hipertiroidismo.

D. Transtornos diversos que afectan al parodonto.

1. Abscesos parodontales.
2. Quistes parodontales.
3. Anquilosis.
4. Resorción radicular.
5. Lesiones por comunicación parodonto-pulpa.
6. Secuestro óseo.
7. Hipersensibilidad dental.
8. Raíces retenidas.
9. Abscesos pericoronales.
10. Infecciones relacionadas con raíces fracturadas o defectos anatómicos.
11. Neoplasias del aparato de inserción periodontal.

Cuadro V. Se presentan las enfermedades y trastornos gingivales muchos de los cuales se especifican en hojas anteriores. ⁽²⁾

4.17 LIPOPOLISACÁRIDOS ORALES

La placa dental denominada también biopelícula, es una estructura que está compuesta por más de 300 diferentes especies de bacterias.

(14)

Las biopelículas se definen como una población de bacterias adherida entre sí o a alguna superficie que se encuentran recubiertas por una matriz. Este conjunto de bacterias es sumamente resistente a los mecanismos de defensa del huésped.⁽¹⁵⁾ La biopelícula libera componentes de la superficie celular a la cavidad oral o al surco gingival. Y son precisamente estos componentes los que el huésped utiliza para controlar sus respuestas a la infección bacteriana en la región más altamente vascularizada de los tejidos parodontales que rodean las superficies de las raíces de los dientes (Figura 15).

Se ha establecido que el huésped utiliza un mecanismo molecular que regula el bajo nivel de inflamación en tejidos clínicamente sanos. En el infiltrado de estos tejidos sanos se expresan de forma constitutiva IL-8^{(16) (17)} y E selectina.^{(18) (19)}

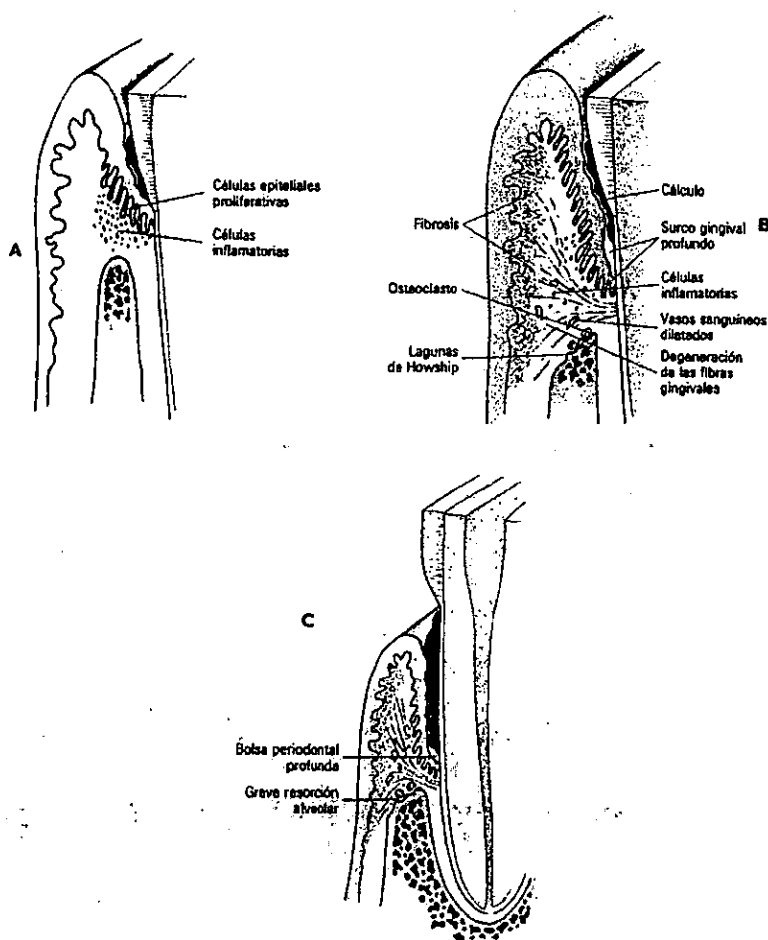


Figura 15. Curso clínico. El aumento de bacterias patógenas de la placa dental subgingival, conducen a reacciones inflamatorias, reabsorción ósea y pérdida del ligamento de inserción, con lo que se produce por aumento en la profundidad y ulceración del epitelio de unión o formación de bolsa. A) Proliferación apical de las células epiteliales de la inserción del epitelio de la unión y del epitelio del surco. B) Movimiento apical del epitelio de la unión, degeneración de las fibras gingivales; reabsorción osteoclástica; fibrosis C) Periodontitis avanzada. ⁽⁶⁾

Algunos autores sugieren que los antígenos de cubierta de la placa dental están involucrados en el mantenimiento del tejido clínicamente sano.

En contraste existe una clara asociación entre el incremento en el número de bacterias gram-negativas que pueden ser aisladas de la placa dental en relación con la enfermedad.

El número total de bacterias que pueden ser aisladas de un sitio sano oscila entre 10^2 - 10^3 bacterias, de las cuales aproximadamente el 10% corresponde a bacterias del tipo gram-negativo que son las involucradas en la liberación de L.P.S..

La gingivitis es una enfermedad caracterizada por el incremento en el enrojecimiento e inflamación de la encía que rodea la superficie dental conjuntamente con un incremento en el número y tipo de células inflamatorias, se produce de igual forma un aumento en las cuentas microbianas de hasta 10^4 - 10^5 microorganismos de los cuales del 15 al 50 % son bacterias gram negativas. En la periodontitis, enfermedad en la que se produce una inflamación crónica que conlleva a la destrucción del hueso alveolar y pérdida de tejido conectivo se presenta un mayor incremento en el número de bacterias de hasta 10^5 y 10^8 microorganismos y se produce este incremento con una clara asociación de microorganismos de tipo gram-negativos.

Entre los organismos gram-negativos más fuertemente asociados con la enfermedad periodontal se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, estos microorganismos están asociados con el desarrollo de la enfermedad y participan de manera importante en la inducción de la periodontitis, estas bacterias presentan en su superficie unas macromoléculas denominadas lipopolisacáridos.

Los lipopolisacáridos participan como mediadores de procesos inflamatorios, se ha determinado que estas macromoléculas son permeables en todas las células que componen la encía y que inician una cascada de procesos que deterioran las estructuras orales. Algunos estudios muestran que al tratar tejidos con diversos tipos de lipopolisacáridos se promueve la expresión de mediadores inflamatorios nocivos sobre el tejido del huésped.

4.17.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LIPOPOLISACÁRIDOS ORALES

El grupo de lipopolisacáridos más ampliamente caracterizado corresponde al de la familia de los Enterobacteriaceae en particular los extraídos de *Escherichia coli*. Las formas moleculares de L.P.S. predominantes en estas especies presentan un lípido A bastante conservado entre estas especies y que está compuesto por β -(1,6)-D-glucosamina (1,4') disacárido fosfato, con 3-hidroxi-ácido dodecanoico y tetradecanoico unidos en posiciones 2' y 3' hidroxi-ácidos grasos respectivamente. (Figura. 2) El lípido A está unido a un núcleo interno que contiene L-glicero-D-mano-heptosa y ácido ceto-deoxi-octulosónico (KDO) y una región menos conservada en el núcleo externo compuesta de azúcares como glucosa, galactosa, manosa y glucosamina. Un O-polisacárido, el cual varía ampliamente en composición y estructura, aún entre las mismas especies, puede estar unido al núcleo externo. Los L.P.S. aislados de organismos gram-negativos, están compuestos de especies moleculares múltiples, que difieren no sólo en la presencia o cantidad de O-polisacáridos unidos en un núcleo y la composición del lípido A. Algunas especies contienen lípido A acilados o fosfatos alterados por algunos sustituyentes.

Los L.P.S. de las bacterias bucales tienen una diversa composición química (figura 6). Las bacterias pueden clasificarse de acuerdo a la longitud de la cadena de ácido graso en tres grupos: cadenas de ácidos grasos de longitud media (14C) L.P.S. similar a *E. coli*; L.P.S. con una longitud de ácido graso (17C) similar a *Bacteriodes fragilis*; finalmente con cadenas de ácido graso de longitud de (12-13C) similar a *Pseudomonas aeruginosa*.

L.P.S. obtenidos de *A. actinomycetemcomitans*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Fusobacterium nucleatum* y *Campylobacter rectus*, contienen una región 3-hidroxi-tetradecanoato (3-OHC14), KDO, y L-glicero-D-mano-heptosa y la presencia de un KDO fosforilado en particular en *A. actinomycetemcomitans* y en ocasiones una región 3-hidroxi-hexadecanoato in *C. rectus* y *F. nucleatum* con más de 14-carbonos como componente activo.

Los L.P.S. de *P. gingivalis*, *B. forsythus* y *Prevotella intermedia* contienen 3-OH-ácido tetradecanoico como el hidroxi-ácido graso mayoritario. ^{(20) (21) (22) (23) (24)}

Se ha determinado también que *Capnocytophaga sputigena* contiene 2-hidroxi-15-metil-ácido hexadecanoico, ⁽²⁵⁾ pero hasta el momento se

desconoce si el lipopolisacárido de estos microorganismos está relacionado con los de Bacteroides.

Otra bacteria oral que tiene L.P.S. con cadenas de ácido graso menores a las determinadas en enterobacterias como *Eikenella corrodens* que tiene un L.P.S. con 3-hidroxi-ácido dodecanoico y ácido dodecanoico.⁽²⁶⁾

Centipeda periodontia, *Selenomonas sputigena* y *Veillonella spp* tienen L.P.S. que contienen 3-hidroxi-ácido tridecanoico y el carbono 13 ácido graso no hidroxilado.^{(27) (26) (28) (29) (30) (31)} Estos tres lipopolisacáridos contienen KDO y heptosa. La espiroqueta oral *Treponema denticola* sintetiza hidroxi-ácido graso de cadenas de 12 y 13 átomos de carbono, lo que sugiere que estos organismos presentan cadenas cortas de ácido graso de los L.P.S., pero hasta el momento no se ha determinado con convicción la presencia de L.P.S. en estos microorganismos.

4.17.2 ESTRUCTURA DEL LÍPIDO A OBTENIDO DE BACTERIAS ORALES

Los L.P.S. obtenidos de bacterias orales presentan el mismo tipo de estructura de lípido A como las enterobacterias, consistente en β -(1,6)-glucosamina disacárido fosfato sustituida con ácidos grasos hidroxilados.⁽³²⁾ La estructura del lípido A más ampliamente caracterizada corresponde a la de *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, este último microorganismo está asociado a la periodontitis juvenil localizada, estos microorganismos presentan una estructura de lípido A similar a la *Escherichia coli* difieren únicamente en la sustitución de dodecanato por un molécula tetradecanato (Figura 16) . En lo referente al lípido A de *Porphyromonas gingivalis* presenta un menor número de cadenas de ácido graso unidas a β -(1,6) glucosamina, pero de mayor longitud en comparación a la de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, además solo se encuentra fosforilado en la posición del átomo de carbono 1.

4.17.3 REGIÓN POLISACÁRIDA DE LOS L.P.S. ORALES

Las porciones polisacáridas de las moléculas de L.P.S. de las bacterias orales no han sido hasta el momento caracterizadas como con las enterobacterias. El L.P.S. más ampliamente estudiado corresponde a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* presenta una estructura repetida de (-3- α -D-Fucosa (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-Ramosa-(3 $\rightarrow$ 1)- β -D-N-acetil galactosamina), serotipos de la misma especie contienen estructuras repetidas de deoxi-L-talosa y deoxi-D-talosa. ⁽³³⁾ ⁽³⁴⁾

4.17.4 CARACTERIZACIÓN DE DETERMINANTES QUE PARTICIPAN EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los lipopolisacáridos exhiben una amplia variedad de actividades biológicas *in vitro* y afecta un número de respuestas características *in vivo*. ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾ Entre los factores que más ampliamente influyen en la actividad de los lipopolisacáridos se encuentran las propias bacterias en las que la composición del medio afecta la integridad del lipopolisacárido en particular, cuando *Porphyromonas gingivalis* crece en medios deficientes en hierro los lipopolisacáridos extraídos de estas cepas presentan una actividad biológica alterada y un cambio en la identidad química. ⁽³⁷⁾

4.17.5 ESTIMULACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS POR L.P.S. ORALES

La actividad biológica de los L.P.S. se debe principalmente al lípido A. Estudios con análogos del lípido A han demostrado que afectan las actividades endotóxicas y que la remoción de una cadena de ácido de graso o modificación de un grupo fosfato promueven la alteración de actividades pirogénicas. Sin embargo la inducción de la síntesis de interleucinas es menos estricta en cuanto a los requerimientos

estructurales. Diferentes moléculas de L.P.S. de la cavidad oral tienen una actividad biológica alterada. L.P.S. obtenidos de *Porphyromonas gingivalis* son menos potentes que los L.P.S. de *E. coli* porque carecen del grupo 4'-fosfato. Sin embargo los L.P.S. de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens* y *F. nucleatum* presentan actividades similares a los de *E. coli*.

4.17.6 EFECTO DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS SOBRE LA INTERACCIÓN CON CÉLULAS DE LA ENCÍA

Las células epiteliales de la encía constituyen el primer punto de contacto con los lipopolisacáridos bucales. En células epiteliales de la encía se ha reportado que el tratamiento con L.P.S. promueve la actividad de IL-1.⁽³⁸⁾

En fibroblastos gingivales el tratamiento con L.P.S. extraídos de *P. gingivalis* estimulan la liberación de IL-8, monocyte chemotactic protein y MCP-1 con igual potencia que L.P.S. extraídos de *E.coli*. Se ha demostrado así mismo que en fibroblastos obtenidos de encías inflamadas la respuesta a la producción de IL-8 disminuye.

Los monocitos son capaces de responder a concentraciones muy bajas de lipopolisacáridos produciendo una amplia variedad de mediadores de procesos inflamatorios así mismo estimulando a otros tipos celulares.

Los neutrófilos liberan citocinas en respuesta al tratamiento con L.P.S. en particular de los extraídos con *P. gingivalis* y *Capnocytophaga ochracea* son capaces de estimular la producción de IL-1, IL-8 y TNF- α . Se ha demostrado así mismo que los polisacáridos de los L.P.S. promueven la activación de monocitos y resorción ósea en rata.

Los L.P.S. presentes en las superficies de los dientes son capaces de difundirse por los tejidos gingivales y producir mediadores inflamatorios. Normalmente estos mediadores promueven la supresión de la presencia bacteriana. Algunos autores proponen que el tratamiento con L.P.S. estimula a los macrófagos para sintetizar IL-1 β y esta citocina a su vez estimula a células no mieloides (endoteliales, epiteliales y fibroblastos) a secretar un mayor número de mediadores. Los L.P.S. inducen la expresión de mediadores como TNF- α , IL-1 β , prostaglandina E₂ y metaloproteinasas; y se ha demostrado también que estos mediadores se encuentran en altas concentraciones en tejidos parodontales y fluido crevicular durante procesos inflamatorios parodontales. El tratamiento con agentes anti-inflamatorios reduce los niveles de estos mediadores y suprime la destrucción ósea y de tejidos.

De los mediadores de procesos inflamatorios, el más ampliamente caracterizado corresponde a IL-1 que entre sus efectos se encuentra la inducción de la proliferación de células T, degranulación de neutrófilos, liberación de citocinas y prostaglandina E₂ por parte de los fibroblastos, de igual forma en monocitos.

Los monocitos son el recurso principal de secreción de TNF- α en respuesta a L.P.S.. El TNF- α estimula la resorción ósea pero es menos potente que la IL-1. Incrementa así mismo la permeabilidad vascular, la degranulación de neutrófilos e induce la respuesta de varios tipos celulares incluyendo la liberación de PGE₂ por los fibroblastos e IL-1 por monocitos. TNF- α es producido por monocitos en respuesta a una amplia variedad de L.P.S. de la cavidad oral lo que sugiere el papel de las citocinas en los procesos parodontales inflamatorios.

La prostaglandina E₂ es un lípido bioactivo derivado del ácido araquidónico y está fuertemente implicado como un mediador importante en la destrucción de los procesos parodontales.

En el fluido crevicular los niveles de PGE₂, se incrementan durante la inflamación, se ha determinado que el tratamiento con agentes anti-inflamatorios participan en la disminución del proceso destructivo.

En lo que refiere a las proteínas de matriz, las metaloproteinasas (MMP) consisten al menos de nueve endopeptidasas dependientes de zinc. Las MMP participan en la destrucción del tejido conjuntivo y en la resorción ósea. Los L.P.S. de la cavidad oral pueden estimular a los macrófagos para secretar MMP que degradan la destrucción de tejidos blandos y destrucción ósea. Así mismo la inducción de mediadores por efecto de L.P.S. promueven la inflamación local estimulando otras células a fin de liberar mediadores y de esta forma regulan la expresión de moléculas de adhesión y péptidos quimiotácticos que atraen células inflamatorias. (Figura 17)

4.17.7 LOS LIPOPOLISACÁRIDOS MODULAN LA RESPUESTA DEL HUÉSPED

Las bacterias de la placa dental no están asociadas normalmente con antígenos de superficie incluyendo los L.P.S., ácido lipoteico y proteínas que penetran los tejidos gingivales.

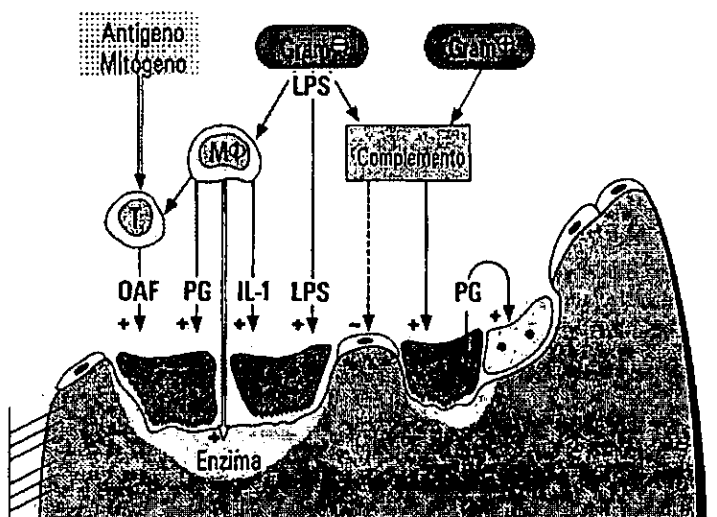


Figura 17. Mecanismo de destrucción ósea. Los osteoclastos activados desmineralizan los huesos y forman una matriz no collagenosa. Las fibras de colágeno son fagocitadas por mononucleares o células similares a fibroblastos. La resorción ósea se produce por el factor activador de osteoclastos (OAF), la interleucina (IL-1) procedente de macrófagos, los lipopolisacáridos (L.P.S.) y la prostaglandina E (PGE₂)

Los componentes bacterianos interactúan con varios tipos celulares que inducen mediadores inflamatorios. Esta interacción mantiene al tejido en un bajo nivel de inflamación y de esta forma no progresa la enfermedad sirviendo para mantener al huésped protegido de la invasión bacteriana. Los L.P.S. de ácidos grasos de cadena corta (E.

corrodens) o intermedia (*F. nucleatum*) y con lípido A bifosforilado son potentes estimuladores de estos mediadores y en bajas concentraciones participan estimulando la respuesta innata en el huésped. (Figura 17)

Sin embargo el L.P.S. de *P. gingivalis* participa en bloquear la expresión de E-selectina, que es una molécula de adhesión necesaria para la eficiente salida de leucocitos del flujo sanguíneo. Toda vez que *P. gingivalis* ha invadido las células epiteliales estas comienzan a secretar IL-8.

Recientemente se ha descrito que los lipopolisacáridos son capaces de estimular la actividad de enzimas

Se ha descrito que los lipopolisacáridos estimulan la síntesis de prostaglandinas y se incrementa la producción de radicales libres del ión hidroxilo durante este proceso. ⁽³⁹⁾

En particular en el parodonto estos eventos son gran importancia en procesos inflamatorios ya que los mediadores de procesos inflamatorios conducen a la activación de neutrófilos que se adhieren al endotelio vascular y pueden migrar a las diferentes regiones mediante el proceso de diapedesis, lo que ocasiona que las células del entorno aumenten el consumo de oxígeno y activen a la NADPH oxidasa lo que conlleva a la producción de radicales libres y a la activación de metabolitos proinflamatorios como el factor de activación plaquetario y leucotrienos que conducen a un evento inflamatorio.

Y en conjunto son los responsables de la destrucción de macromoléculas proteicas como el colágeno.

4.18 INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXÍGENO

Como he mencionado en líneas anteriores los lipopolisacáridos son moléculas que al interaccionar con las células promueven cambios en las mismas lo cual afecta la expresión génica y en ocasiones se promueve la formación de radicales libres como el peróxido y superóxido dismutasa (Figura 18). Las síntesis de estas moléculas tiene el propósito sin duda alguna de defender al organismo de señales provenientes de moléculas extrañas sin embargo el incremento en la concentración en cualquiera de estos iones puede desencadenar en promover efectos tóxicos y en ocasiones hasta la muerte celular.

Todas las células eucariontas tienen un conjunto de enzimas responsables de la remoción de estos radicales libres, el superóxido se

hidroliza por acción de la enzima superóxido dismutasa y el peróxido por la enzima peroxidasa.

Me permito referirme de manera muy somera en la enzimología de los intermediarios del oxígeno que es un campo de interés desde hace aproximadamente 100 años. En el periodo comprendido entre 1858 a 1886 el investigador Traube que se encontraba investigando en Alemania, llegó a la conclusión de que la oxidación biológica involucra la activación molecular del oxígeno por enzimas intracelulares.

Y algunos años después particularmente en 1894 los investigadores Yoshida de Japón y Bertrand en Francia determinaron que había un grupo de enzimas que participaban en el oscurecimiento y endurecimiento de las hojas del árbol de látex de origen Oriental. Bertrand acuñó el nombre de laccasa al grupo de enzimas que participaban en este proceso y que catalizaban la oxidación de sustancias fenólicas como el lactol o ursinol de estos árboles. Posteriormente encontró que la enzima laccasa se encontraba presente también en los hongos y estos contenían una laccasa distinta a la que denominó tirosinasa y que estaba involucrada en el oscurecimiento de los mismos. A partir de estos hallazgos Bertrand introdujo el término oxidasa al conjunto de enzimas que catalizan estas reacciones y sugirió que pertenecían al grupo de las metaloproteinasas.^{(40) (41)}

En la actualidad se han caracterizado más de 200 enzimas que utilizan al oxígeno como sustrato, las cuales se han agrupado en:

- Oxigenasas
- Oxidasas

Las oxigenasas catalizan la incorporación de átomos de oxígeno en sustratos orgánicos. Y se agrupan a su vez en dioxigenasas (que catalizan la inserción del dioxígeno en sustratos orgánicos) y monoxigenasas (que catalizan la inserción de un átomo de dioxígeno hasta su reducción en agua).

En las reacciones catalizadas por oxidasas la molécula de dioxígeno funciona como un aceptor de electrones que es reducido a superóxido (O_2^-), peróxido (H_2O_2) o a dos moléculas de agua (H_2O).

En su conjunto todas las enzimas que activan y reducen al dioxígeno son proteínas conjugadas, en cuyos grupos prostéticos de estas enzimas está presente la flavina, el cobre o el hierro. Muchas de estas enzimas son hemo proteínas en particular las enzimas denominadas oxidasas ya que las enzimas agrupadas como oxigenasas carecen de grupos hemo. Algunas flavoproteínas contienen molibdeno, así como centros ferro-sulfurados pero estos grupos no aparecen directamente involucrados en la reducción del dioxígeno. La reacción del dioxígeno

generalmente ocurre en el grupo prostético e involucra tres pasos fundamentales y que a continuación se mencionan:

- La combinación de oxígeno con una flavina que se encuentra en estado ampliamente reducida, en forma flavín-peróxido
- La asociación de oxígeno a un centro metal reducido con varios grados de transferencia electrónica del metal al oxígeno.
- La activación por un centro metal oxidado del sustrato orgánico, el cual puede reaccionar directamente con el dioxígeno unido al sitio activo.

Existen dos factores a saber que hacen al dioxígeno cinéticamente inerte:

1. Su estado basal como triplete, ya que su spin promueve restricciones en la reacción.
2. La magnitud negativa en el potencial de reducción estándar el electrón del oxígeno para la formación del radical superóxido el cual realiza este proceso no espontáneo con donadores de electrones que tienen potenciales elevados.

En términos generales podemos afirmar que el oxígeno sirve como una molécula oxidativa en los organismos aeróbicos porque permite la producción de energía durante la respiración debido a su alto potencial electroquímico. Por su estructura electrónica la reducción del oxígeno se efectúa a través de pasos sencillos de transporte de electrones lo que produce la generación de radicales libres.

Y hace algunas décadas Gershan, McCord y Fridovich descubrieron al ión superóxido y su papel en la toxicidad del oxígeno.^{(42) (43)}

Durante la respiración celular el oxígeno es reducido a la molécula agua por la enzima citocromo oxidasa, solamente del 3 al 5% del oxígeno usado se convierte en superóxido como resultado de la liberación de electrones en la cadena de transporte de electrones ubicada en la mitocondria.^{(43) (44)} Así mismo el superóxido y el peróxido se forman en la célula por la activación de complejos enzimáticos como el xantina-oxidasa, citocromo P450 y NADPH oxidasa, así como por la autooxidación de moléculas pequeñas como

las catecolaminas, flavinas y como resultado de ciclos xenobióticos como el paraquat, nitrofurantoina y adriamicina.

El ión hidroxilo es formado por la reacción denominada de Haber-Weiss que se produce entre el peróxido y el superóxido. Esta reacción es catalizada por metales de transición en particular hierro y se denomina reacción de Fenton.⁽⁴⁶⁾ Debido a su reactividad, estos radicales libres reaccionan de forma instantánea, dañando los componentes celulares.

Todos los componentes celulares pueden reaccionar con radicales libres derivados del oxígeno en uniones insaturadas y grupos tiol. En proteínas algunos aminoácidos son sumamente sensibles a este ataque induciendo alteraciones enzimáticas o cambios de conformación.⁽⁴⁷⁾ El ión hidroxilo puede producir entrecruzamientos entre proteínas y la ruptura de aminoácidos lo que conduce la fragmentación de macromoléculas.⁽⁴⁸⁾ Los ácidos nucleicos también son blanco de radicales libres, cuyo aumento en concentración promueve la ruptura del DNA o modificación de las bases nitrogenadas lo que conlleva a mutaciones puntuales.⁽⁴⁷⁾

Sin embargo el daño más importante es causado por lipoperoxidación en donde los ácidos grasos poliinsaturados son muy sensibles al ataque por radicales libres lo que promueve su ruptura a aldehídos que son muy tóxicos a las células.^{(49)(50) (51)} Estos eventos ocasionan cambios muy profundos en la estructura de las membranas alterando el funcionamiento celular.

En la actualidad se ha propuesto que todos estos eventos es decir, la modificación de proteínas, la ruptura del DNA y la lipoperoxidación participan en la promoción de la muerte celular durante el estrés oxidativo.

4.18.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Las células los utilizan para defenderse del ataque por radicales libres, se han descrito hasta el momento diferentes sistemas antioxidantes como el sistema α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión así mismo enzimas antioxidantes como isoformas de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. En condiciones fisiológicas estas enzimas mantienen concentraciones bajas de radicales libres y su actividad está acuciosamente regulada.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa fue descubierta por McCord y Fridovich en 1969, su función es dismutar dos iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido (H_2O_2) y oxígeno (O_2), esta enzima es de suma importancia en el mantenimiento de condiciones aeróbicas. Se han descrito tres isoformas que presentan iguales propiedades cinéticas. En procariontes una de estas isoformas contiene hierro en

su sitio activo,⁽⁵²⁾ ⁽⁵³⁾ la forma que contiene manganeso está presente tanto en eucariontes como procariontes y la otra isoforma se encuentra en la mitocondria y el citoplasma, es una forma dependiente de cobre - zinc. Esta enzima es la primera defensa contra los radicales libres derivados del oxígeno y puede ser rápidamente inducida bajo determinadas condiciones cuando las células o los organismos son expuestos a estrés oxidativo.

La catalasa es una enzima ubicua que se encuentra presente en todos los organismos. En las células eucariontes se encuentra en los peroxisomas. Esta enzima contiene un grupo hemo en el sitio activo que es el responsable de su actividad catalítica. La enzima utiliza como sustrato dos moléculas de peróxido y las transforma en dos moléculas de agua y oxígeno. Esta enzima al igual que la enzima superóxido dismutasa se induce cuando las células son sometidas a algún tipo de estrés.⁽⁵⁴⁾

La enzima glutatión peroxidasa es una selenoproteína, tetramérica, cada subunidad tiene un peso molecular de 22,000 daltons, cada una contiene un átomo de selenio en forma de selenocisteína y es la región de la enzima involucrada en la catálisis.⁽⁵⁵⁾

Diversos estudios señalan que del 60% al 70% de la actividad de esta enzima se encuentra ubicada en el citoplasma de las células y del 25% al 40% en la mitocondria. Chambers⁽⁵⁶⁾ demostró que el residuo selenocisteína se encuentra codificado en el codón de término UGA en el mensajero. Este codón denominado también ópalo es reconocido por una molécula especial de RNA de transferencia que al inicio es cargado con serina y después la serina es convertida en selenocisteína. Este seleno aminoácido es incorporado post-traduccionalmente en el polipéptido de las subunidades de glutatión peroxidasa.⁽⁵⁷⁾ La deficiencia de selenio *in vivo* e *in vitro* conduce a una dramática disminución en la actividad de esta enzima.

La enzima glutatión peroxidasa reduce hidroxiperóxidos lipídicos y no lipídicos así mismo al peróxido para catalizar esta reacción oxida dos moléculas de glutatión. El mecanismo enzimático de la catálisis es ter-uni-ping pong, la tasa de reacción enzimática se incrementa linealmente conforme aumenta la concentración de sustrato. Este tipo de cinética es la responsable de la alta tasa de reducción del peróxido. (Figura 18)

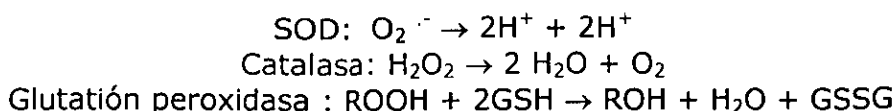


Figura 18. Reacciones catalizadas por las enzimas super3xido dismutasa, catalasa y glutati3n peroxidasa. GSH: glutati3n reducido, GSSG glutati3n oxidado.

4.18.2 EFECTOS PROTECTORES DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A pesar de los numerosos estudios que se han realizado en las propiedades de estos diferentes sistemas antioxidativos y del hecho de que participan en la defensa de radicales libres del ox3geno su importancia en la c3lula no ha sido esclarecida del todo. En particular por la heterogenidad de los modelos experimentales y por el tipo de condiciones oxidativas empleadas. Es por esta raz3n que la interpretaci3n de los resultados var3a enormemente porque se han seleccionado modelos de efectos protectores de enzimas antioxidativas, de proliferaci3n celular, supervivencia celular, ruptura de DNA y tumorigenicidad. Todos estos estudios han llevado a interpretaciones contradictorias, como con la enzima super3xido dismutasa que en ocasiones act3a de forma protectora y en otras de manera delet3rea.

4.18.3 COMPARACI3N ENTRE DIFERENTES ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS

Existen infinidad de protocolos experimentales que tratan de evaluar el potencial protector de las enzimas antioxidativas. Y que consiste en exponer a los animales o c3lulas a un sistema generador de radicales libres y d3terminar sus efectos. El mecanismo m3s sencillo es la adici3n de las enzimas de forma extracelular a las c3lulas expuestas *in vitro* a sistemas generadores de radicales libres.⁽⁵⁸⁾ Se descubri3 que solo la catalasa protege de los radicales libres generados del sistema de la xant3n-oxidasa acetaldeh3do en fibroblastos humanos. Martin ⁽⁵⁹⁾ as3 mismo encontr3 que la catalasa inhibe la toxicidad inducida por nitrofuranto3na en c3lulas parenquimatosas.

El siguiente paso en el conocimiento del comportamiento de estas enzimas consiste en incrementar la concentración de enzimas antioxidativas usando varios sistemas y estudiar los efectos protectivos contra el estrés oxidativo. La actividad de la catalasa se incrementa para proteger a las células endoteliales de los radicales generados por el sistema de la xantín oxidasa.⁽⁶⁰⁾ La enzima superóxido dismutasa protege a estas células de la hipoxia. Esta enzima también protege de hipoxia a fibroblastos y de la activación por paraquat.⁽⁶¹⁾

Es posible que las tres principales enzimas tengan influencia entre sí aunque se encuentren en compartimentos separados. La enzima glutatión peroxidasa protege de la lipoperoxidación y la S.O.D. actúa en regiones hidrofílicas y de esta forma promueve la protección de estructuras tanto hidrofóbicas como hidrofílicas son complementarias garantizándose así la integridad celular contra el ataque por radicales libres.

Algunos estudios señalan que la recuperación^{(62)(63) (64)} de las células expuestas a estrés oxidativo depende de la intensidad del estrés. Estos resultados sugieren que los daños oxidativos no pueden ser reparados completamente y esto altera la división celular. Se ha demostrado que la inyección a diferentes concentraciones de catalasa, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa en células con exposición a diferentes periodos de hipoxia tan prolongados como 20 horas no alteran la capacidad de las células de dividirse.

En los estudios mencionados anteriormente se describió el papel que tienen estas enzimas en mantener a las células en condiciones normales como consecuencia de la remoción de radicales libres derivados del oxígeno.

En los estudios realizados por Michelis⁽⁶⁵⁾ demostró que la microinyección con anticuerpos contra las enzimas superóxido dismutasa Cu-Zn y glutatión peroxidasa incrementa la mortalidad de fibroblastos por hipoxia. Estos resultados sugieren que ambas enzimas son necesarias para la protección de la célula contra el ataque por radicales libres cuando las células son expuestas a estrés oxidativo.

En otros experimentos Puglia y Powell demostraron que se incrementa la toxicidad por hipoxia en ratas cuando se utiliza biscloroetilnitrosourea⁽⁶⁶⁾ este fármaco inhibe a la glutatión peroxidasa.

Posteriormente Suttrop⁽⁶⁷⁾ demostró que al inhibir el ciclo de la glutatión peroxidasa con butionina sulfoximina o biscloroetilnitrosourea decrece de forma importante la resistencia de células endoteliales a la generación de radicales libres por la vía de la glucosa oxidasa.

En fechas recientes mediante la utilización de técnicas de transfección se ha establecido que la sobre expresión de la actividad de

superóxido dismutasa promueva que las células de ratón sean más resistentes a paraquat o hipoxia, posteriormente Huag⁽⁶⁸⁾ demostró una clara correlación entre la magnitud en el incremento de la actividad de superóxido dismutasa y la resistencia a paraquat.

Sin embargo bacterias enriquecidas con superóxido dismutasa muestran un aumento en la sensibilidad a la hipoxia⁽⁶⁹⁾ y a radiaciones ionizantes⁽⁷⁰⁾ y en otros experimentos los fibroblastos humanos transfectados con superóxido dismutasa son más resistentes a paraquat pero más sensibles a la lipoperoxidación.⁽⁷¹⁾

Finalmente en condiciones normales la célula promueve el balance entre la producción de radicales libres derivados del oxígeno y su destrucción por sistemas antioxidantes. Sin embargo este balance puede romperse ya sea por incremento en la concentración de radicales libres o bien por decremento en los sistemas de defensa. Estas dos estrategias se han utilizado para comprender el papel de las enzimas antioxidantes en la protección celular.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el desarrollo de la enfermedad periodontal se producen radicales libres del oxígeno de células fagocíticas, que son importantes en la actividad microbiana, pero que son muy nocivos para las células del entorno y para los componentes de la matriz sobretodo en los sitios de la inflamación. Durante la inflamación en la enfermedad periodontal, los leucocitos, fagocitos y fibroblastos están expuestos a componentes de las paredes celulares bacterianas y a citocinas. Se sabe que los lipopolisacáridos y las paredes celulares estimulan la liberación de superóxido⁽⁷²⁾ en fibroblastos gingivales y posiblemente este ión participa en la patología periodontal.

5.1 JUSTIFICACIÓN

Se ha descubierto que el papel de la enzima S.O.D. es importante en la modificación de los efectos tóxicos de los iones superóxido, así como su relevancia para combatir los factores de la citotoxicidad del T.N.F, radiación y efectos hipertérmicos en líneas celulares cancerígenas. El S.O.D. que se localiza en la matriz mitocondrial actúa bajo las vías de estimulación del factor de necrosis tumoral, IL 1 y lipopolisacáridos impidiendo la formación de radicales libres que puedan dañar a la células. No existen reportes de la activación de la enzima S.O.D. en fibroblastos gingivales humanos, bajo la estimulación de lipopolisacáridos. Con la presente investigación se determinó si los L.P.S. promueven el daño celular mediante la producción de radicales libres. Demostrando mediante un método cualitativo (gel de agarosa) si existe modificación del D.N.A. genómico, extrayéndolo de F.G.H. tratados anteriormente con L.P.S. a diferentes dosis y tiempos.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- El propósito de este trabajo experimental consistió en determinar si lipopolisacáridos purificados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promueven la actividad de la enzima superóxido dismutasa en fibroblastos gingivales humanos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Se determinará la actividad de la enzima superóxido dismutasa en fibroblastos gingivales humanos tratados a diferentes dosis y tiempos con lipopolisacáridos purificados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- Se estudiará si el tratamiento con lipopolisacáridos induce la síntesis de la enzima Mn-superóxido dismutasa.
- Se establecerá la correlación entre el aumento de actividad y el daño en DNA genómico.

7. HIPÓTESIS

7.1 HIPÓTESIS VERDADERA

- Si los fibroblastos gingivales humanos son expuestos a los efectos tóxicos de los Lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, entonces se inducirá la producción de radicales libres como el superóxido.

7.2 HIPÓTESIS FALSA

- Si los fibroblastos gingivales humanos son expuestos a los efectos tóxicos de los Lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, entonces no se inducirá la producción de radicales libres como el superóxido.

7.3 HIPÓTESIS VERDADERA

- Si los fibroblastos gingivales humanos son expuestos a los efectos tóxicos de lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* entonces los radicales libres producidos como el superóxido dañaran el D.N.A. genómico.

7.4 HIPÓTESIS FALSA

- Si los fibroblastos gingivales humanos son expuestos a los efectos tóxicos de lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* entonces los radicales libres producidos como el superóxido no fragmentarán el D.N.A. genómico.

8. MATERIAL Y MÉTODO

8.1 TIPO DE ESTUDIO

Experimental, prospectivo, comparativo.

8.2 MATERIAL BIOLÓGICO

* Fibroblastos gingivales humanos.
* Lipopolisacáridos purificados de Actinobacillus actinomycetemcomitans.

8.3 MATERIAL

- Cajas petri.
- Pipetas
- Micropipetas.

8.4 REACTIVOS

- Medio de cultivo de Hanks
- Antibiótico - antimicótico (Gibco).
- Suero bovino fetal (Gibco)
- Tripsina (Gibco)
- Carbonato de Sodio (BAKER)
- Hidróxido de sodio (BAKER)
- Tartrato de sodio (BAKER)
- Sulfato de cobre pentahidratado (BAKER)
- Folin - Fenol (SIGMA)
- Suero albúmina de bovino (SIGMA)
- Acrilamida (SIGMA)
- Persulfato de amonio (SIGMA)
- Bis-acrilamida (SIGMA)
- Trisma - base (SIGMA)
- Glicina (BAKER)
- Temed (BAKER)
- Riboflavina (SIGMA)
- Nitroblue tetrazolium (SIGMA)
- Metanol (BAKER)
- Tween (SIGMA)
- Fosfato de sodio (BAKER)

- Azul de Bromofenol (SIGMA)
- Marcador de peso molecular (GIBCO)
- Leche descremada (Nestlé)
- Azida de Sodio.
- Anticuerpos Anti-superóxido dismutasa (Santa Cruz)

8.5 EQUIPO

- Incubadora CO₂ (Nuaire)
- Campana de flujo laminar. (Nuaire)
- Microscopio de objetivos invertidos (Olympus)
- Baño de temperatura controlada.
- Cámara de electroforesis (Hoeffer)
- Cámara de transferencia (Hoeffer)
- Fuente de Poder.
- Orbit shaker.
- Espectrofotómetro.
- Vortex.
- Centrífuga.
- Agitador.
- Balanza.
- Potenciómetro.

8.6 PRESUPUESTO

El proyecto de investigación fué financiado por el responsable del laboratorio de Bioquímica y el proyecto PAPIIT IN 224398.

8.7 MÉTODOS

➤ 8.7.1 CULTIVO CELULAR DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS

El cultivo de fibroblastos gingivales humanos se obtuvo de pacientes de la clínica de exodoncia. Las células se obtuvieron a partir de muestra de tejido libre de enfermedad periodontal. El tejido se lavó durante 6 ocasiones en solución de Hanks (GIBCO) suplementado con penicilina/fungizona(GIBCO). El tejido gingival se cortó en piezas de 1- 2 mm y se sembró en cajas de 6 pozos en medio Dulbecco's Modificado por Eagles (GIBCO) suplementado con 2mM L-glutamina (GIBCO) 100u/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomycin, 1mg/ml de fungizona (GIBCO) y 10% de suero bovino fetal. El explante se incubó a 37°C en 5% de CO₂. Los cultivos se alimentaron semanalmente. Las células se utilizaron entre los pases 5-15.

➤ 8.7.2 AISLAMIENTO DE LIPOPOLISACÁRIDOS

Se extrajeron de la bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* de acuerdo a la metodología de Westphal⁽⁷³⁾ ANEXO 1.

➤ 8.7.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método de Lowry ⁽⁷⁴⁾ Se realizó por triplicado y calculó la media ± error estandar. ANEXO 2.

➤ 8.7.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA

Se crecieron las células en cajas petri de 60 mm hasta la subconfluencia. Se incubaron las células durante 24 hr. en DMEM sin suero bovino fetal. Al término se retiró y se cambió por DMEM con suero bovino fetal al 0.2% y se trataron a diferentes dosis y tiempos con los lipopolisacáridos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Al término del tratamiento se retiró el medio de cultivo y se adicionó 1 ml. de buffer de fosfatos salino en presencia de tritón al 10%. Se cuantificó la proteína de acuerdo al método de Lowry, 150 µg de proteína se utilizaron para la visualización de la actividad enzimática de acuerdo al método de gel nativo (actividad de superóxido dismutasa) ANEXO 3.

➤ **8.7.5 INMUNOTRANSFERENCIA DE LAS MUESTRAS A MATRIZ DE NITROCELULOSA**

Se corrieron muestras de lisados celulares en un gel nativo al 10%, a 3 miliamperes por cm de gel (25 miliamperes totales) durante 2.5 horas. Posteriormente se transfirió la muestra del gel a membranas de nitrocelulosa en un campo eléctrico de 200 volts durante 45 minutos. Se incubaron las muestras con anti-superóxido dismutasa y se reveló la reacción con una anti IgG acoplada a fosfatasa alcalina. Se realizó por triplicado y se calculó la media $\pm$ error estandar. ANEXO 4.

➤ **8.7.6 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO**

Las células se trataron a diferentes dosis y tiempos con los lipopolisacáridos al término de la reacción se aisló el DNA de acuerdo a la metodología descrita por LIFE TECHNOLOGIES. Se realizó por triplicado y se colocó un experimento representativo. ANEXO 5.

9. RESULTADOS

9.1 EFECTO DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA

Dosis respuesta de la actividad de superóxido dismutasa en respuesta al tratamiento con lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos.

Con la finalidad de determinar si la enzima superóxido dismutasa se activa por acción de los lipopolisacáridos, se trataron fibroblastos gingivales humanos con diferentes dosis de lipopolisacáridos durante 24hr. La actividad de la enzima se determinó en geles nativos y se reveló por actividad enzimática.

Encontramos que el tratamiento con dosis desde 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ induce un aumento en la actividad de la enzima, así mismo encontramos que se activa una isoforma de peso molecular más bajo. Este incremento de la actividad se presenta hasta dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (Figura 19). De igual forma el tratamiento con lipopolisacáridos induce la expresión de una forma de superóxido de peso molecular menor.

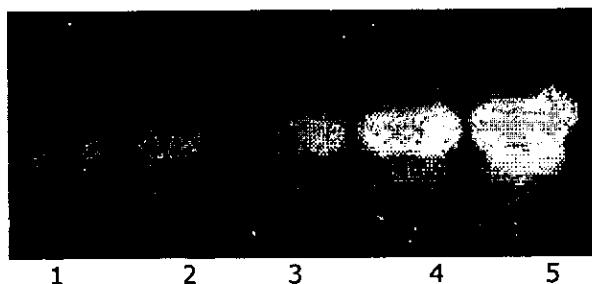


Figura 19. Dosis respuesta del tratamiento de lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron en cajas petri hasta subconfluencia y se trataron con diferentes dosis de lipopolisacáridos 1) Control; 2) 1; 3) 5; 4) 50; 5) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

En el análisis de barrido de las electroforesis nativas encontramos que la actividad de la enzima se incrementa 6 veces sobre la actividad basal a dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ y este aumento persiste hasta las 12 horas de tratamiento en donde después de 24 horas de tratamiento no se observaron diferencias significativas (Figura 20).

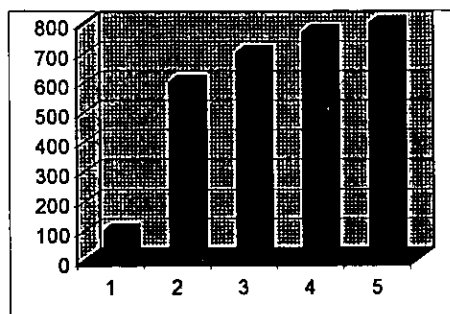
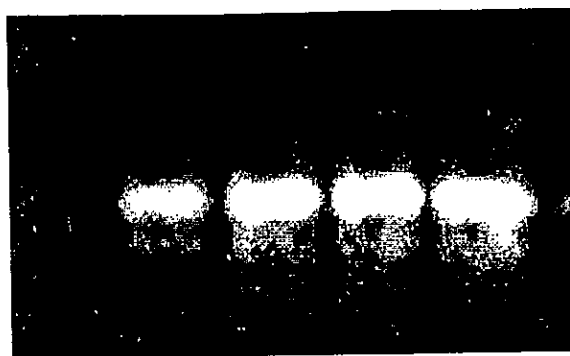


Figura.20 Análisis de barrido de la dosis respuesta a lipopolisacáridos. En la figura se muestra el análisis de barrido de los geles de actividad obtenidos al tratar con diferentes dosis de lipopolisacáridos 1) control; 2) 1 $\mu\text{g/ml}$; 3) 5 $\mu\text{g/ml}$; 4) 50 $\mu\text{g/ml}$; 5) 100 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados se presentan como el porcentaje acumulado con respecto al basal.

Curso temporal de la actividad de superóxido dismutasa en fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacáridos

En los ensayos de actividad en geles nativos encontramos que el tratamiento con lipopolisacáridos a dosis constante (50 $\mu\text{g/ml}$) y diferentes tiempos, nos muestra que la actividad de la enzima se presenta desde las 6 horas de tratamiento y que aumenta hasta las 12 horas de tratamiento, observamos así mismo que desde las seis horas de tratamiento se presenta una activación de una segunda isoforma de superóxido dismutasa de menor peso molecular. (Figura 21)



1 2 3 4 5

Figura 21. Curso temporal de la actividad de superóxido dismutasa en fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacáridos. Fibroblastos gingivales humanos se crecieron hasta subconfluencia y se trataron a diferentes tiempos con 50 μg / ml de lipopolisacárido. 1) Control; 2) 6 hr; 3) 12 hr; 4) 24 hrs; 5) 48 hrs.

En el análisis de barrido encontramos que el tratamiento con lipopolisacáridos a diferentes tiempos promueve un incremento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa; encontramos así mismo que el máximo incremento se produce a las 24 horas de tratamiento y que no presentan diferencias importantes entre las 24 y 48 horas de tratamiento. (Figura. 22)

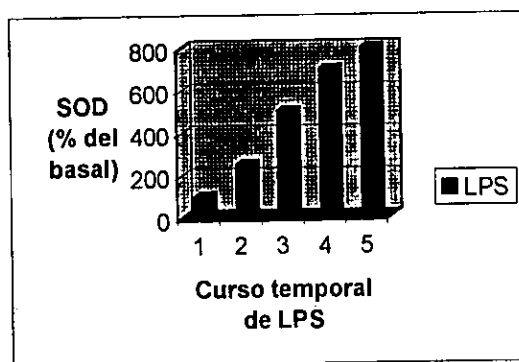


Figura. 22 Curso temporal al tratamiento con lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos.

Análisis de barrido de fibroblastos gingivales humanos; las células se crecieron hasta subconfluencia y se trataron a diferentes tiempos con 50 μg / ml de lipopolisacárido. 1) Control; 2) 6 hr; 3) 12 hr; 4) 24 hrs; 5) 48 hrs.

9.2 EFECTO DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS SOBRE LA SÍNTESIS DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA

Dosis respuesta al tratamiento de fibroblastos gingivales humanos con lipopolisacáridos

Con la finalidad de determinar si los efectos de los lipopolisacáridos sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa se debían a cambios en la síntesis de la enzima se realizaron ensayos western-blot a fin de caracterizar su actividad sintética. En la figura 23 se muestra el resultado del ensayo de western blot en donde se muestra que tratamiento con lipopolisacáridos promueve un aumento en la síntesis de la enzima desde las dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$.

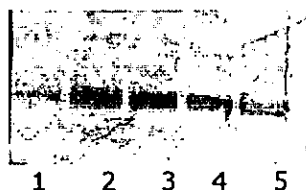


Figura 23. Dosis respuesta al tratamiento con lipopolisacáridos.

Se crecieron los fibroblastos gingivales humanos hasta la subconfluencia y se trataron durante 24 horas con diferentes dosis de lipopolisacárido al término de cada condición se recuperaron las células y se lisaron en solución de Laemli nativa, las muestras se separaron por electroforesis y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se revelaron por fosfatasa alcalina. 1) 100; 2) 50; 3) 5; 4) 1 $\mu\text{g/ml}$; 5) Control

Curso temporal del tratamiento con lipopolisacáridos sobre la expresión de la enzima superóxido dismutasa.

Los fibroblastos gingivales humanos se trataron a diferentes tiempos con dosis fija de lipopolisacáridos (50 $\mu\text{g/ml}$) nuestros datos muestran que el tratamiento con los lipopolisacáridos promueve un incremento en la síntesis de la enzima superóxido dismutasa. Encontramos que el máximo incremento se produce a las 24 horas (Figura. 24).

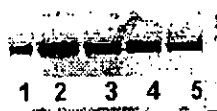


Figura 24. Expresión de superóxido dismutasa por el tratamiento a diferentes tiempos con lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos. Se crecieron los fibroblastos gingivales humanos hasta la subconfluencia y se trataron con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lipopolisacárido durante diferentes tiempos al término de cada condición se recuperaron las células y se lisaron en solución de Laemli nativo, las muestras se separaron por electroforesis nativa al 10% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se revelaron por fosfatasa alcalina. 1) 48 hrs; 2) 24 hrs; 3) 12 hrs; 4) 6 hr; 5) Control

Efecto de los lipopolisacáridos sobre el DNA genómico de fibroblastos gingivales humanos.

Con la finalidad de determinar si los incrementos en la actividad de la enzima superóxido dismutasa inducido por lipopolisacáridos, participa en modificar al DNA genómico. Se realizaron estudios de aislamiento del material genético nuestros datos señalan que el tratamiento con lipopolisacáridos no produce el fraccionamiento del DNA. (Figura. 25)

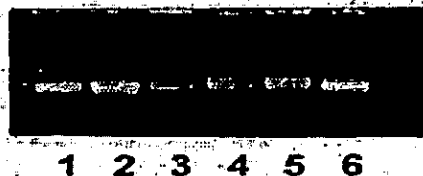


Figura. 25 Efecto de los lipopolisacáridos sobre el genómico de fibroblastos gingivales humanos. Las células se crecieron hasta la subconfluencia y se trataron con lipopolisacáridos a diferentes dosis durante 24 horas. 1) Control; 2) 1 3) 5 4) 10 5) 50 6) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lipopolisacáridos. Al término de la reacción se procedió a obtener el DNA genómico.

10. DISCUSIÓN

Los lipopolisacáridos son los componentes mayoritarios de las paredes celulares de las bacterias gram negativas. La interacción de estos con células eucarióticas ocasiona cambios en la transducción de señales y de la expresión génica. Entre las respuestas celulares que se presentan, se produce un rápido incremento en la formación de superóxido (de 2 a 3 hrs) y de peróxido lo que conlleva a un incremento en el estado redox celular. Se considera que el incremento en radicales como superóxido y peróxido se utilizan como un mecanismo de protección contra agentes invasores.

Pero si la producción de estas especies reactivas se prolonga puede desencadenar en daño y muerte celular ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾. Las enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa) constituyen el sistema de defensa preponderante en respuesta a las especies reactivas del oxígeno. El anión superóxido, por sí mismo no está implicado como un mediador de la toxicidad celular, pero es reducido a peróxido y un radical hidroxilo; son estas especies químicas las que producen daños importantes en los tejidos circundantes.

Evidencias experimentales sugieren que tejidos no inmunes producen especies reactivas de oxígeno, en miocitos al someterlos a isquemia se produce el anión superóxido mediante la activación de la vía de la xantín oxidasa (Figura. 26).

Recientemente se ha demostrado que las especies reactivas del oxígeno tienen importantes efectos en la producción de Interleucina 8 ⁽⁷⁸⁾ y en la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa cuya catálisis conlleva a la producción de óxido nítrico que a concentraciones elevadas desencadena la formación de tumores y tiene actividad bactericida ⁽⁷⁹⁾. Todos estos eventos citados anteriormente se asocian al grado del daño que presenten los tejidos.

En el presente proyecto de investigación demostramos que lipopolisacáridos purificados de la bacteria *Actinobacillus actinomycetemittans*, promueven la activación de la enzima superóxido dismutasa de manera dosis dependiente y en el tiempo. Este evento está aunado a incrementos en la síntesis de la enzima.

En otros resultados de laboratorio ⁽⁸⁰⁾, se demostró que la actividad de la enzima catalasa se incrementa en respuesta a la estimulación inducida por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos. En otra serie de experimentos ⁽⁸¹⁾, encontramos que las endotoxinas purificadas de esta bacteria parodontopatogénica promueven la producción de óxido nítrico

Como se muestra en el esquema que se presenta a continuación encontramos que el anión superóxido participa en la producción de peróxido y óxido nítrico. Pero los sistemas depuradores de estas especies reactivas del oxígeno son tan eficientes en los fibroblastos gingivales humanos que a muy bajas dosis de las endotoxinas bacterianas se activa a la enzima catalasa, de tal forma que el procesamiento de este radical activo no promueve ruptura en el material genético de estas células.

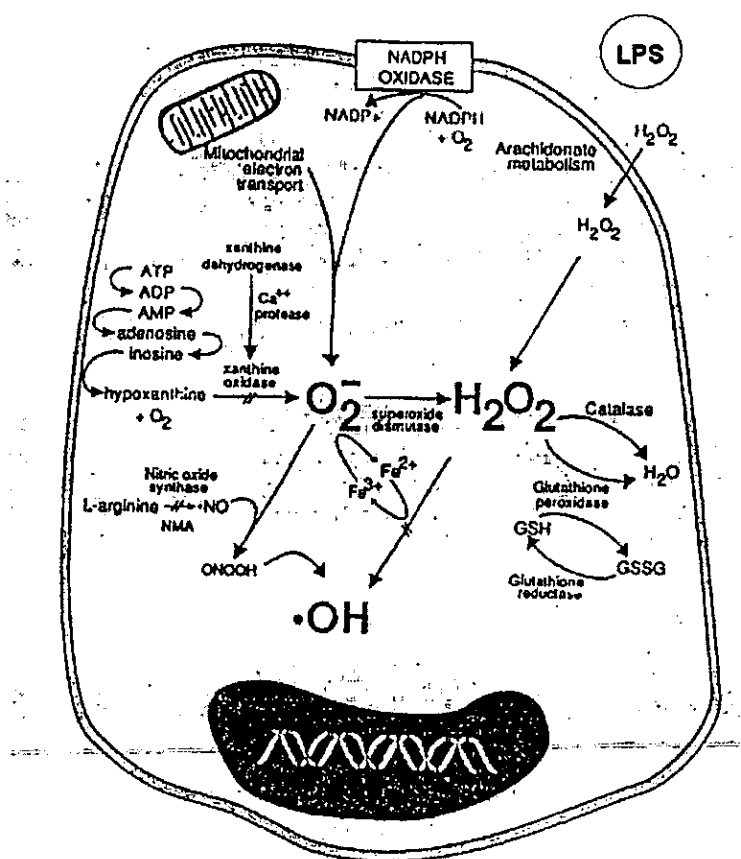


Figura. 26 Mecanismos productores de especies reactivas del oxígeno.⁽⁶⁹⁾

Hasta el momento no existen reportes que señalen cual es la vía de transducción involucrada en la activación de especies reactivas del oxígeno por acción de los lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos. Estudios preliminares de este laboratorio señalan que estas endotoxinas participan en la activación de la vía de transducción de tirosín cinasa, así mismo inducen la expresión de formas no convencionales de proteína cinasa C, con la finalidad de caracterizar con certeza la vía o vías de transducción involucradas en este evento se deberán realizar investigaciones con inhibidores selectivos de las vías antes mencionadas que impidan la activación de las enzimas que participan en la formación de especies reactivas del oxígeno.

La importancia clínica de la presente investigación radica en conocer las moléculas involucradas y los mecanismos a través de los cuales actúan los lipopolisacáridos en la enfermedad parodontal, estudiar así mismo como se comportan los fibroblastos gingivales humanos en respuesta a la agresión inducida por la endotoxina involucrada, y caracterizar la respuesta inflamatoria gingival. La finalidad de este proyecto está encaminada en posteriormente poder evitar la disminución de la síntesis de las fibras de soporte celular que ocasionan la pérdida dental. Para así combatirlas y tener una sociedad con dientes sanos y naturales durante el transcurso de la vida. Por lo cual es de suma importancia tener datos reales sobre los procesos degenerativos de los fibroblastos gingivales humanos.

11. CONCLUSIONES

- Con los resultados obtenidos se puede determinar que los lipopolisacáridos purificados de *Actinobacillus actinomycescomitans* promueven la actividad de la enzima superóxido dismutasa en fibroblastos gingivales humanos *in vitro*.
- Los fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacáridos de A a. Promueven incrementos en la actividad la enzima superóxido dismutasa a partir de las primeras 6 horas, y su activación se prolonga hasta las 12 horas y se mantiene así hasta las 48 horas.
- Por otra parte la dosis-respuesta de lipopolisacáridos sobre los fibroblastos gingivales humanos nos muestra que las endotoxinas bacterianas inducen la expresión de la enzima superóxido dismutasa a partir de un microgramo incrementándose paulatinamente hasta dosis de 100 microgramos/ml de tratamiento con lipopolisacáridos.
- También se demostró que los lipopolisacáridos no promueven daños en el D.N.A. genómico de los fibroblastos gingivales humanos.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Carranza Fermín A. Parodontología Clínica de Glickman. México. Tercera edición. Editorial Interamericana 1987.
2. Genco Robert J. Goldman Henry M. Periodoncia. México. Editorial Interamericana McGraw-Hill 1994.
3. Capistrán Ramírez Gabriel. Relaciones Protético Parodontales. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis (Licenciatura) 1992.
4. Carranza Fermín A. Sznajder Norma. Compendio de periodoncia. México. Quinta Edición Editorial Médica-Panamericana 1996.
5. Bascones Martínez Antonio. Periodoncia Básica. España . Primera Edición Editorial Avances Médico Dentales.
6. Hoag M. Philip., Pawlak A. E. Fundamentos de Periodoncia. España. Primera Edición. Editorial Mosby Year Book 1990.
7. Lindhe Jan. Parodontología Clínica, Argentina. Editorial Médica Panamericana 1986.
8. Allen L. Don. Macfall T. W. Periodontics For the dental Hygienist U.S.A. Fourth Ed Editorial Lea Febiger 1987.
9. Rateitschak H. Klaus., Rateitschak Pluss M. e. Atlas de Periodoncia. España. Primera Edición. Editorial salvat Editores S.A. 1988.
10. Carranza Fermín., Michael G. Newman. Clinical Parodontology. U.S.A. 8 th. De. Editorial W.B. Saunders Company. 1996.
11. Ramford P. Sigurd. Ash M. Major. Parodontología y Periodoncia. Argentina. Editorial Médica Panamericana. 1982.
12. Kinoshita Shiro., Sueda Takimeshi., Hara Koji. Atlas de Periodoncia. España. Primera Edición. Editorial Espaxs Publicaciones Médicas. 1985.
13. Wilson G. Thomas., Kornman Kenneth. Advances in Periodontics. Honk Kong. Editorial Quintessence. 1992.

14. Moore, W., Moore L. The bacteria of periodontal diseases. *Parodontology* 2000. 5: 66-77. 1994.
15. Darveau, RP, Tanner A, Page, RC. The microbial challenge in periodontitis. *Parodontology* 2000 14: 12-32. 1997.
16. Page, RC, Schroeder, HE. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J. Parodontol.* 52: 477-491. 1981.
17. Tonetti, MS, Imboden, M., Gerber L., Lang, N. Localized expression of mRNA for phagocyte specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infet. Immun.* 62: 4005-4014. 1994.
18. Gemmell E., Walsh, L, Savage, N. Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J. Periodontal Res.* 29: 46-53. 1994.
19. Moughal, NA, Adonogianaki, E, Thornhill, M, Kinane D. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. *J. Periodont Res;* 27: 623-630. 1992.
20. Weintraub, A., Zahringer, U, Wollenwever H, Seydel S and Rietschel E. Structural characterization of the lipid A component of *Bacteroides fragilis* strain NCTC 9343 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 183: 425-431. 1989.
21. Kumada, H., Haishima, Y, Umemoto T and Tamamoto K. Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 177: 2098-2106. 1995.
22. Kumada H, Kondo S, Umemoto, T, Hisatsune K. Chemical structure of the 2-keto-3-deoxyoctanate region of lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS. Microbiol Lett.* 108(1): 75-79. 1997.
23. Fujiwara T, Ogawa T, Sobue S, and Hamada S. Chemical immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. *J. Gen. Microbiol.* 136: 319-326. 1990.
24. John B, Olsen, I, and Bryn K. Fatty acids and sugars in lipopolysaccharides from *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides*

- gingivalis and *Bacteroides loeschei*. *Oral Microbiol Immunol* 3: 22-27. 1983.
25. Dees, SB, Karr DE, Hollis D, and Moss CW. Cellular fatty acids of *Capnocytophaga* species. *J. Clin. Microbiol* 18: 779-783. 1982.
 26. Mashimo J., Michiko, Y, Ikeuchi, K, Hata S. Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolysaccharides from oral bacteria. *Microbiol Immunol*. 29(5): 395-403. 1985.
 27. Kumada, H, Watanabe K, Nakamu A, Haishima Y, Kondo S, Hisatsune K, Umemoto Y. Chemical and biological properties of lipopolysaccharide from *Selenomonas sputientia* ATCC 33150. *Oral Microbiol Immunol*. 12(3): 162-167. 1997.
 28. Koeguchi S, Tsutsui O, Kato K, Matsumura T. Isolation and characterization of lipopolysaccharide from *Centipeda periodontii*. *Oral Microbiol Immunol* 5(2): 108-112.
 29. Hewett M. Knox K. Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Veillonella*. *Eur. J Biochem* 19:169-175. 1971.
 30. Dahle U, Tronstad L. Olsen L. 3-hydroxy fatty acids in a lipopolysaccharide-like material from *Teponema denticola* strain FM. *Endodont Dent Traumatol* 12: 202-205. 1997.
 31. Ogawa T. Immunobiological properties of chemically defined lipid A from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *Eur. J. Biochem*. 219:737-742. 1994.
 32. Morrison DC, Ryan JL. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*. Vol. I Boca Raton CRC Press. 1992.
 33. Perry MB, Mac Lean L, Brisson J, Wilson M. Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect. Immun*. 64 (4): 1215-1219. 1996.
 34. Perry MB, Mac Lean L, Brisson J, Wilson M. Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur J Biochem* 242 (3): 682-688. 1996.

35. Wilson M Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis *Sci Prog* 78: 19-34. 1995.
36. Hamada S, Takada H, Ogawa T, Fujiwara T, Mihara J. Lipopolysaccharide of oral anaerobes associated with chronic inflammation: chemical and immunomodulating properties. *Intern Rev Immunol* 6: 247-261. 1990.
37. Champagne CM, Holt SC, Van Dycke TE, Gordon BJ, Shapira L. Lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas gingivalis* grown in hemin-limited chemostat conditions has a reduced capacity for human neutrophil priming. *Oral Microbiol Immunol* 5: 319-325. 1996.
38. Sugiyama A, Arakaki R, Ohnishi T, Arakaki N, Daihara Y, Takada H. Lipoteichoic acid and Interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture. *Infect Immun* 64: 1426-1431. 1996.
39. Buechter D.D. Free radicals and Oxygen toxicity. *P^rharm. Res.* 57 (3) 231-2-37. 1988.
40. Keilin, D. The history of Cell Respiration and Cytochrome. London: Cambridge Univ. Press. 416 pp. 1986.
41. Hill, H.A. In oxygen Free Radicals and Tissue Damage. Pp 5-11. Amsterdam: Excerpta Medica. 381 pp. 1979.
42. Haugaard N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol Rev.* 48: 311-375: 1968.
43. Gerschman, R., Gilbert, DI, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and X-radiation. A mechanism in common. *Science* 119: 623-626. 1954.
44. McCord J, M. Fridovich I. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055: 1969.
45. Turrens, JF, Boveris, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 191: 421-437: 1980.
46. Halliwell, B., Gutteridge JMC. Oxygen toxicity oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219: 1-14; 1984.

59. Martin, WJ. Nitrofurantoin: Evidence for the oxidant injury of lung parenchymal cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:482-486: 1986.
60. Beckman, JS, Minor, RL, White CW, Repine JE, Rosen, GM, Freeman, BA. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylen glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J. Biol. Chem.* 263:6884-6892: 1988.
61. Bagley, AC, Krall, J, Lynch, RE. Superoxide mediates the toxicity of paraquat for chinese hamster ovary cells. *Proc Natl. Acad. Sci.* 83: 3189-3193: 1986.
62. Ody, C, Junod, AF. Direct toxic effects of paraquat and oxygen on cultured endothelial cells. *Lab. Invest.* 52:77-84: 1985.
63. Honda, S, Matsuo, M. Lack of recovery from oxygen-induced damage to colony formation and DNA synthesis in senescent human diploid fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* 40: 81-87: 1989.
64. Martin WJ, Kachel DL. Oxygen mediated impairment of human pulmonary endothelial cell growth. Evidence for a specific threshold of toxicity. *J. Lab. Clin Med* 113: 413-421: 1989.
65. Michielis, C. Raes, M, Zachary MD, Delaive E., Remacle J. Microinjection of antibodies against superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *Exp. Cell Res.* 179: 581-589: 1988.
66. Powell, R, Puglia CD. Effect of inhibition of glutathione reductase by carmustine on central nervous system oxygen toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 111-117: 1987.
67. Suttrop N, Toepper, W, Roka L. Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: Glutathione redox cycle and catalase. *Pediatr Res.* 32: 360-365: 1992.
68. Huang, TT, Carlson EJ, Leadon, SA, Epstein, CJ. Relationship of resistance to oxygen free radicals to CuZn-superoxide dismutase activity in transgenic, transfected and trisomic cells. *FASEB J.* 6:903-910: 1992.
69. Scott, MD, Meshnick, SR, Eaton JW. Superoxide dismutase rich bacterial. Paradoxical increase in oxidant toxicity. *J. Biol. Chem.* 262: 3640-3645: 1987.

- 70.Scott, MD, Meshnick, SR, Eaton JW. Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation. *J. Biol Chem* 264: 2498-2501: 1989.
- 71.Elroy-Stein O, Brenstein Y, Roner Y. Overproduction of human CuZn superoxide dismutase in transfected cells. Extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J.* 5: 615-622: 1986.
- 72.Skaleric U, Manthey CM, Mergenhagen SE, Gaspiric B and Wahl SM. Superoxide release and superoxide dismutase expression by human gingival fibroblasts. *Eur U. Oral Sci* 2000 Apr; 108 (2): 130-135 .
- 73.Westphal O., Ludentz OS, Bister, F. Extraction of bacteria with phenol . *Z. Naturf* b7:148-155: ANEXO 1. 1952.
- 74.Lowry, OH, Rosenborough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275: 1951.
75. Raetz, C.R.H. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 129-170. 1990.
- 76.Raetz, C.R.H. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eukaryotic signal transduction. *J. Bacteriol.* 175: 5745-5753,1993.
- 77.Raetz, C. R. H., S. Ulevitch, S.D. Wright, C.H. Sibley, A., Ding and C.F. Nathan. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* 5: 2652-2660, 1991.
- 78.De Forge, L.E., E., Fantone, J.C., Kenney, J.S., and Remick D.G. *J.Clin Invest.* 90, 2123-2129. 1992.
- 79.Stuer, D.J, and Marletta, M.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7738-7742, 1985.
- 80.Erika Inés García Ruíz, Inducción de la enzima catalasa por lipopolisacáridos en cultivos de fibroblastos gingivales humanos. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de licenciatura. 2000.
- 81.Carlos Vazquez. Efecto de lipopolisacáridos sobre la producción de Oxido nítrico en fibroblastos gingivales humanos. México D.F.

Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de licenciatura.
2000.

13. ANEXO 1

AISLAMIENTO DE LIPOPOLISACÁRIDOS

- Suspender las colonias en solución isotónica.
- Centrifugar a 300 rpm durante 15 minutos.
- Descartar el sobrenadante hasta obtener la pastilla.
- Resuspender con agua-fenol.
- Centrifugar a 13.000 rpm a 5 grados centígrados durante 30 minutos.
- Separar la fase acuosa para dializar.
- La porción fenólica se lava dos veces más con agua centrifugando a 13.000 rpm a 5 grados centígrados durante 15 minutos.
- Las porciones acuosas se dializan por separado.

SOLUCIONES

- Solución saturada fenol-agua.
- Agua desionizada.

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La técnica consiste en realizar una curva patrón con diferentes concentraciones de proteína de 0, 5, 10, 25, 50 y 100 μg de proteína de solución de albúmina bovina. Aforar a un volumen de 200 μl , de igual forma se toman distintos volúmenes de las muestras. Se les adiciona 1 ml. de la siguiente solución:

- 1 ml. Sulfato de cobre al 1%
- 1ml. Tartrato de sodio y potasio al 2%
- 23 ml. de hidróxido de sodio 0.1N en carbonato de sodio al 2%.

Los tubos se agitan y se dejan reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregan 50 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua desionizada 2:1 se incuba durante 30 minutos y se leen a una densidad óptica de 660 nm.

ANEXO 3

GEL NATIVO DE ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA

GEL

- 0.02 g de persulfato de amonio.
- Gel al 10% de acrilamida.
- Se colocan dentro del espacio entre los vidrios con una pipeta, y se espera hasta que gelifique.
- Ya gelificado se coloca el concentrador con el peine de corrida.
- Colocar 10 microlitros de jugo azul nativo en cada muestra.
- Se coloca la muestra en los carriles.
- Colocar 5 microlitros de marcador de peso molecular (Prestained-Protein MW stos-highs).
- Correr a 66-70 amperes por 24 horas.
- Se sumerge el gel en solución NBT- Riboflavina y Temed (1:1) X 60 minutos en el cuarto oscuro.
- Iluminar con el transiluminador habiendo tratado la solución por 10 minutos.
- Retirar el exceso de agua y fijar en ácido acético por 10 minutos.

Receta de gel

- Acrilamida.
- Buffer tris 8.8 pH.
- Buffer tris 6.8 pH.
- Agua.
- Temed.
- Presulfato de amonio.

Referencia. Bautista, A.P.K. Mészáros, J. Bojta, and J.J. Spinzer. (1990) Superoxide anion generation in the liver during the early stage of entoxemia in rats. J. Leukoc. Biol. 48:123-128.

ANEXO 4

TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA A UN SOPORTE SÓLIDO. (WESTERN BLOT)

Actualmente el método es utilizado para transferir proteínas de un gel a un papel de nitrocelulosa. Las proteínas específicas son identificadas por la asociación de anticuerpos contra ellas.

La transferencia se lleva a cabo mediante una equipo diseñado para tal propósito y se efectúa en un lapso de 1.5 a 2 horas dependiendo del voltaje empleado. A continuación se describen los pasos de forma cronológica para llevar a cabo la transferencia de proteínas:

1. Una vez que el gel de poliacrilamida termina su corrida, se coloca en un plato con agua bidestilada (para evitar que se deshidrate).
2. Se utilizan guantes para la manipulación y el corte del papel filtro de nitrocelulosa de un tamaño adecuado que corresponda al gel o un poco mayor, y se marca por fuera en la esquina superior izquierda con un plumín suave.

Nota: La importancia de los guantes radica en proteger al papel de nitrocelulosa libre de contaminación de aceites y secreciones de la piel y el que se puedan transferir proteínas extrañas o no propias de la muestra que se procesará.

2. Hidratación del papel filtro de nitrocelulosa en agua desionizada o el buffer de transferencia por cinco minutos.
4. Se colocan las seis piezas de transferencia, de positivo a negativo (rojo a negro) de la siguiente manera:

+

- Almohadilla porosa (doble y por ambos lados).
- Papel Whatman 3 mm².
- Papel de nitrocelulosa.
- Gel de poliacrilamida.
- Papel Whatman 3 mm².
- Almohadilla porosa (doble y por ambos lados).

Una vez ordenada la rejilla de contención, se remoja en buffer (Glicina, Tris base, SDS y metanol)

1. Al momento de poner en contacto el papel de nitrocelulosa con el gel se retiran todas las burbujas que quedan entre ambos, con un tubo de ensayo, pasando este por la superficie de la nitrocelulosa. Es muy importante colocarlos perfectamente alineados.
2. Se colocan la rejilla con los filtros y el gel en la cámara de transferencia. Y se conecta la fuente de poder con las siguientes cargas:
 - 60 mA por 12 horas.
 - 40 mA de 4-8 horas.
 - 100 Volts por 1 hora.
1. Al término de la transferencia el papel se prepara para la incubación con los anticuerpos. Para cumplir con tal propósito la membrana deberá bloquearse, lavarse e incubarse con el 1º y 2º anticuerpo hasta revelarse la reacción.

ANEXO 5

DNA ZOL. AGENTE AISLANTE DE DNA GENÓMICO

Descripción. Se utiliza para aislar DNA genómico de muestras líquidas o sólidas de animales, plantas, levaduras o bacterias. El DNA zol contiene un detergente con guanidina y una solución que lisa la cual permite seleccionar la precipitación del DNA de las células lisadas.

Estabilidad. El DNAzol es estable a una temperatura de 15-30 grados centígrados, por un año.

Instrucciones de uso.

- 1. Lisis de células y núcleos.** A las células cultivadas se les agrega DNAzol en el área del plato. Y se lisan las células por agitación después se pipetea para lisa en un tubo de ensayo. Pastilla o suspensión; las células se lisan por medio de un pipeteo suave, y se lavan con NaCl, se resuspende a 4 grados centígrados con una solución hipotónica. La muestra se centrifuga a 4000 RPM por 10 minutos a 4 grados centígrados. Se retira el sobrenadante y se coloca DNAzol.
- 2. Centrifugación.** Se sedimenta el homogenado por 10 minutos a 10,000 RPM a 4 grados centígrados; seguida la centrifugación se transfiere el sobrenadante viscoso resultante a un tubo. Con este paso se remueven los fragmentos insolubles de tejido, RNA y exceso de lipopolisacáridos. Este proceso es recomendado para minimizar la cantidad de RNA dentro del DNA.
- 3. Precipitación de DNA.** El precipitado de DNA del lisado y homogenización se adiciona etanol y DNA zol Para su aislamiento, mezclándolo todo en un cuarto frío por 1-3 minutos. El DNA puede rápidamente hacerse visible como un precipitado nuboso. Remueva el precipitado de DNA enrollado en la pipeta. El DNA es colocado en la punta del tubo (limpio). Con mucho cuidado se retira el sobrenadante del fondo del tubo. Se mezcla la pastilla con el etanol para evitar que el DNA se mantenga enrollado (nuboso).
- 4. Lavado del DNA.** Se lava el precipitado de DNA dos veces con etanol. Se mezcla invirtiéndolo en tubos de 3-6 veces. Se mantienen los tubos verticales por 1 a 5 minutos hasta que el DNA esté en el fondo del tubo, para después redissolver en etanol.
- 5. Solubilización del DNA.** Se dejan secar los tubos con aire seco por 5 a 15 minutos a temperatura ambiente. Se disuelve el DNA en NaOH, y se coloca la pastilla directamente en la punta de la pipeta. El NaOH solubiliza completamente el precipitado de DNA.
- 6. Cuantificación de resultados (DNA).** Mezclar el DNA solubilizado con NaOH y medir a A260 y A280 nm. en el espectrofotómetro y

finalmente se calcula el DNA asumiendo que una unidad de A260 equivale a 50 microgramos de DNA por mL.

El DNA aislado contiene partículas de RNA degradado. Si la muestra contiene más de 3% de RNA es necesario repetir el paso 2 o de centrifugación descrito en el protocolo.

Referencias.

1. Cox, R.A. (1986) Methods in Enzymology (Grossmann, L. and Moldave, E., eds) Vol. 12 Part B, pages 120-129. Academic Press, Orlando Fl.
2. Ausubel, F.M., Brent R Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., and Struhl, K. (1990) in Corrent Protocols in Molecular Biology, Vol 2, page A.1.5., John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.

13. Artículo I.

LOS LIPOPOLISACÁRIDOS COMO PROMOTORES DE PROCESOS INFLAMATORIOS EN CAVIDAD ORAL.

Gloria Gutiérrez-Venegas, Mauricio Peña-Párraga y Armando Flores-Lides.

Laboratorio de Bioquímica. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, c.p. 04510.

Tel/Fax: 56 22 55 54; correo electrónico: gloria@fo.odonto.unam.mx

ABSTRACT

The dental plaque is a biofilm composed of different gram positive and negative bacteria. The release of lipopolysaccharides (L.P.S.) induced the expression of inflammatory mediators and compositional changes associated with the disease. L.P.S. has been shown to permeate all gingival tissues and interact with cells in the gingiva and initiate a wide spectrum of detrimental processes such as stimulation of destructive inflammatory processes and by modification of the innate host response.

Key words: Lipopolysaccharides, structure and biological activity, oral bacteria, periodontitis.

RESUMEN

La placa dental denominada también biopelícula está compuesta por microorganismos gram positivos y negativos. La liberación de los lipopolisacáridos (L.P.S.) promueve la expresión de mediadores inflamatorios y cambios en la composición del parodonto asociados con la enfermedad. Los L.P.S. son unas moléculas permeables a todos los tejidos orales y con la capacidad de interactuar con células de la encía en donde inician un amplio espectro de procesos destructivos

como la estimulación de procesos inflamatorios y la modificación de la respuesta innata del huésped.

PALABRAS CLAVE: Lipopolisacáridos, estructura y actividad biológica, bacterias orales, periodontitis.

INTRODUCCIÓN

La placa dental denominada también biopelícula, es una estructura que está compuesta por más de 300 diferentes especies de bacterias (1).

Las biopelículas se definen como una población de bacterias adheridas entre sí o a alguna superficie, que se encuentran recubiertas por una matriz. Este conjunto de bacterias es sumamente resistente a los mecanismos de defensa del huésped (2).

La biopelícula libera componentes de la superficie celular a la cavidad oral o al surco gingival. Y son precisamente estos componentes los que utiliza el huésped para controlar sus respuestas a la infección bacteriana en la región más altamente vascularizada de los tejidos parodontales que rodean las superficies de las raíces de los dientes (Figura 1).

Se ha establecido que el huésped utiliza un mecanismo molecular que regula el bajo nivel de inflamación en tejidos clínicamente sanos. En el infiltrado de estos tejidos sanos se expresan de forma constitutiva IL-8 y E-selectina (3-6). Algunos autores sugieren que los antígenos de cubierta de la placa dental están involucrados en el mantenimiento del tejido clínicamente sano.

En contraste, existe una clara asociación entre el incremento en el número de bacterias gram-negativas que pueden ser aisladas de la placa dental en relación con la enfermedad periodontal.

El número total de bacterias que pueden ser aisladas de un sitio sano, oscila entre $10^2 - 10^3$ bacterias, de las cuales aproximadamente el 10 % corresponde a bacterias del tipo gram-negativo que son las involucradas en la liberación de los L.P.S..

La gingivitis es una enfermedad caracterizada por el incremento en el enrojecimiento e inflamación de la encía que rodea la superficie dental

conjuntamente con un incremento en el número y tipo de células inflamatorias; se produce de igual forma un aumento en las cuentas microbianas de hasta 10^4 - 10^5 microorganismos de los cuales del 15 al 50 % son bacterias gram negativas. En la periodontitis, enfermedad en la que se produce una inflamación crónica que conlleva a la destrucción del hueso alveolar y pérdida de tejido conectivo se presenta un incremento en el número de bacterias de hasta 10^5 - 10^8 microorganismos, este incremento se produce con una clara asociación de microorganismos de tipo gram-negativos.

Entre los organismos gram-negativos más fuertemente asociados con la enfermedad periodontal se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Estos microorganismos están asociados con la enfermedad y participan de manera importante en la inducción de la periodontitis; estas bacterias presentan en su superficie unas macromoléculas denominadas lipopolisacáridos.

Los lipopolisacáridos participan como mediadores de procesos inflamatorios. Se ha determinado que estas macromoléculas son permeables en todas las células que componen la encía y que inician una cascada de procesos que deterioran las estructuras orales. Algunos estudios muestran que al tratar tejidos con diversos tipos de lipopolisacáridos se promueve la expresión de mediadores inflamatorios nocivos sobre el tejido del huésped.

Composición y Estructura de Lipopolisacáridos Orales.

El grupo de lipopolisacáridos más ampliamente caracterizado corresponde al de la familia de los Enterobacteriaceae, en particular los de *Escherichia coli*, que están formados por cuatro dominios consistentes en un lípido A, que es la región tóxica de la molécula, el núcleo interno de oligosacáridos, el núcleo externo y la región

polisacárida O-antigénica. Las formas moleculares de los L.P.S. predominantes en estas especies presentan un lípido A bastante conservado, que consiste en una molécula de β -(1,6)-D-glucosamina (1,4')-disacárido fosfato, 3-hidroxi-ácido dodecanoico y tetradecanoico unidos en posiciones 2' y 3' hidroxi - ácido graso respectivamente (Figura 2). El lípido A está unido a un núcleo interno que contiene L-glicero-D-mano-heptosa y ácido ceto-deoxi-octulosónico (KDO) y una región menos conservada en el núcleo externo compuesta de azúcares como glucosa, galactosa, manosa y glucosamina. La molécula O-polisacárida, que esta unida al núcleo externo, varía ampliamente en composición y estructura, aún entre las mismas especies.

Los L.P.S. aislados de organismos gram-negativos, están compuestos de especies moleculares múltiples, que difieren no sólo en la presencia o cantidad de O-polisacáridos unidos en el núcleo externo sino también en la composición del lípido A. Algunas especies contienen lípido A acilado y los fosfatos son reemplazados por algún otro sustituyente.

Los L.P.S. de las bacterias bucales tienen una diversa composición química.

Las bacterias pueden clasificarse de acuerdo a la longitud de la cadena de ácido graso, presente en la estructura del lípido A.

Se clasifican en tres grupos: cadenas de ácidos grasos de longitud media (14 C), con L.P.S. similar a *E. coli*; L.P.S. con una longitud de ácido graso (17 C) presente en *Bacterioides fragilis* y finalmente, con cadenas de ácido graso de longitud de (12-13 C) como en *Pseudomonas aeruginosa*.

Los L.P.S. obtenidos de *A. actinomycetemcomitans*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Fusobacterium nucleatum* y *Campylobacter rectus*, contienen una región 3-hidroxi-tetradecanoato (3-OHC14), KDO, y L-glicero-D-mano-heptosa y la presencia de un KDO fosforilado en particular en *A. actinomycetemcomitans* y en ocasiones una

región 3-hidroxi-hexadecanoato in *C. rectus* y *F. nucleatum* con más de 14-carbonos como componente activo.

Los L.P.S. de *P. gingivalis*, *B. forsythus* y *Prevotella intermedia* contienen 3-OH-ácido tetradecanoico como el hidroxi-ácido graso mayoritario (7-12).

Se ha determinado también que *Capnocytophaga sputigena* contiene 2-hidroxi-15-metil-ácido hexadecanoico, pero hasta el momento se desconoce si el lipopolisacárido de estos microorganismos está relacionado con los que se encuentran en los bacteroides.

Otra bacteria oral que tiene L.P.S. con cadenas de ácido graso menores a las determinadas en enterobacterias, es *Eikenella corrodens*, que tiene un L.P.S. compuesto por 3-hidroxi-ácido dodecanoico y ácido dodecanoico. *Centipeda periodontia*, *Selenomonas sputigena* y *Veillonella spp* tienen a L.P.S. que contienen 3-hidroxi-ácido tridecanoico y el carbono 13, de ácido graso no hidroxilado (12). Estos tres lipopolisacáridos contienen KDO y heptosa. La espiroqueta oral *Treponema denticola* sintetiza hidroxi-ácido graso de cadenas de 12 y 13 átomos de carbono, lo que sugiere que estos organismos presentan cadenas cortas de ácido graso de los L.P.S., pero hasta el momento no se ha determinado la presencia de L.P.S. en estos microorganismos.

Estructura del lípido A obtenido de bacterias Orales:

El lípido A obtenido de bacterias orales presenta el mismo tipo de estructura que las enterobacterias, consistente en β -(1,6)-glucosamina disacárido fosfato sustituida con ácidos grasos hidroxilados (13). La estructura del lípido A más ampliamente caracterizada corresponde a la de *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Estos microorganismos presentan una estructura de lípido A que es similar a la de *Escherichia coli* y difieren únicamente en la sustitución de dodecanato por una molécula tetradecanato (Figura 2). El lípido A de

Porphyromonas gingivalis, presenta un menor número de cadenas de ácido graso unidas mediante un enlace β -(1,6) glucosamina y es de mayor longitud en comparación al lípido A de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que se encuentra fosforilado en la posición del átomo de carbono 1.

Región polisacárida de los L.P.S. orales.

Las porciones polisacáridas de las moléculas de L.P.S. de las bacterias orales no han sido hasta el momento ampliamente caracterizadas como con las enterobacterias. El lipopolisacárido más ampliamente estudiado corresponde al de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; éste presenta una estructura repetida de (-3- α -D-fucosa (1 $\rightarrow$ 2)- α -L-ramosa-(3 $\rightarrow$ 1)- β - D-N-acetil galactosamina). Biotipos de la misma especie contienen estructuras repetidas de deoxi-L-talosa y deoxi-D-talosa

Caracterización de determinantes en la actividad biológica.

Los lipopolisacáridos exhiben una gran variedad de actividades biológicas *in vitro* y promueven un sin número de respuestas características *in vivo*. Entre los factores que más ampliamente influyen en la actividad de los lipopolisacáridos, se encuentran las propias bacterias en las que la composición del medio afecta la integridad del lipopolisacárido; en particular cuando *Porphyromonas gingivalis* se hace crecer en medios deficientes en hierro, los lipopolisacáridos extraídos de estas cepas presentan una actividad biológica alterada y un cambio en la identidad química.

Estimulación de mediadores inflamatorios por L.P.S. orales.

La actividad biológica de los L.P.S. se debe al lípido A. Estudios en los que se utilizan análogos del lípido A han demostrado que al modificar esta estructura, se afectan las actividades endotóxicas. Se ha demostrado así mismo, que la remoción de una cadena de ácido graso o la modificación de alguno de los grupos fosfato

promueven la alteración de actividades pirogénicas. Sin embargo, la inducción de la síntesis de interleucinas es menos estricta en cuanto a los requerimientos estructurales. Se ha establecido asimismo, que moléculas de L.P.S. estructuralmente diferentes de la cavidad oral tienen una actividad biológica alterada. L.P.S. obtenidos de *Porphyromonas gingivalis* son menos potentes que los L.P.S. de *E. coli* porque carecen del grupo 4'-fosfato. Sin embargo los L.P.S. de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens* y *F. nucleatum* presentan actividades similares a los de *E. coli*.

Efecto de los lipopolisacáridos sobre las células del parodonto.

Recientemente se ha demostrado que tejidos gingivales sanos presentan un bajo nivel de expresión de mediadores inflamatorios. La molécula E-selectina se encuentra en la superficie del endotelio y su función es facilitar la salida de leucocitos del flujo sanguíneo a los tejidos circundantes con el fin de atacar a las bacterias presentes en el sitio de la infección. La expresión de IL-8 guía a los leucocitos al sitio de la colonización bacterial.

La distribución de los leucocitos en los tejidos gingivales aumenta cuando las bacterias, proteínas y lipopolisacáridos son reconocidos por el huésped en particular mediante la asociación de estas moléculas con los monocitos (Figura 3).

De igual forma las células epiteliales de la encía, que constituyen el primer punto de contacto con los lipopolisacáridos en el parodonto, liberan IL-1 (14).

Las endotoxinas actúan también sobre los fibroblastos gingivales que sintetizan y liberan tanto IL-8 como la proteína quimotáctica monocítica (MCP-1). Se ha demostrado así mismo, que en fibroblastos obtenidos de encías inflamadas, la respuesta a la producción de IL-8 disminuye cuando se tratan a estas células con lipopolisacáridos extraídos de *P. gingivalis*.

Como se mencionó anteriormente los monocitos, son capaces de responder a concentraciones muy bajas de lipopolisacárido produciendo una amplia variedad de mediadores

de procesos inflamatorios que estimulan a otros tipos celulares como los linfocitos y los osteoclastos.

De igual forma los neutrófilos, liberan citocinas en respuesta al tratamiento con L.P.S.; en particular los extraídos de *P. gingivalis* y *Capnocytophaga ochracea* que son capaces de estimular la producción de IL-1, IL-8 y TNF- α en estas células.

En macrófagos los L.P.S. promueven la síntesis de IL-1 β , que a su vez estimula a células no mieloides (endoteliales, epiteliales y fibroblastos) a secretar prostaglandinas y metaloproteinasas mismas que se encuentran en altas concentraciones en tejidos parodontales y en particular en el fluido crevicular, con lo que se inicia la destrucción ósea y de tejidos de soporte como el ligamento periodontal.

De los mediadores de los procesos inflamatorios, el más ampliamente caracterizado es IL-1, entre cuyos efectos se encuentra la inducción de la proliferación de células T, degranulación de neutrófilos, liberación de citocinas y prostaglandina E₂ por parte de los fibroblastos gingivales y de los monocitos.

Los monocitos son el recurso principal de secreción de TNF- α en respuesta a L.P.S.. El TNF- α estimula la resorción ósea pero es menos potente que la IL-1. Incrementa así mismo la permeabilidad vascular, la degranulación de neutrófilos e induce la respuesta de varios tipos celulares incluyendo la liberación de PGE₂ por los fibroblastos y de IL-1 por monocitos. En el fluido crevicular los niveles de PGE₂, se incrementan durante procesos inflamatorios. Se ha determinado que el tratamiento con agentes anti-inflamatorios participan en la disminución del proceso destructivo lo que nos sugiere que la PGE₂ participa de manera importante en la enfermedad parodontal (15).

En lo que se refiere a las proteínas de matriz, como las metaloproteinasas (MMP), que consisten al menos de nueve endopeptidasas dependientes de zinc, se ha establecido que participan en la destrucción del tejido conjuntivo y en la resorción ósea. Los L.P.S. presentes en la cavidad oral pueden estimular a los macrófagos a secretar MMP que participan en la destrucción tanto de tejidos blandos como óseos.

Los L.P.S. modulan la respuesta del huésped.

Los L.P.S. con ácidos grasos de cadena corta (*E. corrodens*) o intermedia (*F. nucleatum*) y con lípido A bifosforilado son potentes estimuladores de mediadores inflamatorios y en bajas concentraciones participan en estimular la respuesta innata en el huésped. Sin embargo el L.P.S. de *P. gingivalis* participa bloqueando la expresión de E-selectina, que es una molécula de adhesión necesaria para la eficiente salida de leucocitos al flujo sanguíneo. Toda vez que *P. gingivalis* ha invadido las células epiteliales estas comienzan a secretar IL-8.

Mecanismos de destrucción del ligamento periodontal y del hueso alveolar.

Se ha demostrado que la presencia de lipopolisacáridos conduce a la activación de los neutrófilos que liberan de forma permanente gránulos que contienen hidrolasas ácidas (ej. catépsina) y proteasas neutras (ej. elastasas y collagenasas). Estas sustancias disgregan los proteoglucanos de la membrana celular bacteriana y también el colágeno y el fibrinógeno presente en el ligamento periodontal. Los neutrófilos se agrupan durante el curso de inflamación aguda y en abscesos, la lisis en el tejido inflamado da lugar a la liberación de grandes cantidades de hidrolasas y proteasas. En este proceso participan también los macrófagos que secretan una serie de productos entre los que se encuentran hidrolasas ácidas, lisozima y proteasas neutras.

Los mecanismos que determinan la destrucción del hueso no se conocen con certeza pero en estudios *in vitro* se ha demostrado que la prostaglandina E₂, la IL-1 y el TNF α estimulan la formación de nuevos osteoclastos e incrementan la capacidad resorptiva de células destructoras existentes (Figura 4).

CONCLUSIONES

La placa dental es una biopelícula compuesta de numerosas especies bacterianas. La liberación de L.P.S., por estas bacterias, comienza a difundirse en los tejidos gingivales. Durante la salud periodontal tanto los lipopolisacáridos así como otros componentes bacterianos activan un bajo nivel la respuesta innata del huésped. El inicio de la enfermedad involucra cambio en concentración del lipopolisacárido. Los diversos L.P.S. de patógenos orales tienen una capacidad variada de estimular respuestas biológicas y promover la enfermedad por

activación de procesos inflamatorios destructivos y por modificación de la respuesta innata del huésped. (15)

REFERENCIAS

1. Moore, W., Moore L. (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Parodontology* 2000. 5: 66-77.
2. Darveau, RP, Tanner A, Page, RC. (1997) The microbial challenge in periodontitis. *Parodontology* 2000 14: 12-32
3. Page, RC, Schroeder, HE. (1981) Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J. Parodontol.* 52: 477-491.
4. Tonetti, MS, Imboden, M., Gerber L., Lang, N. (1994) Localized expression of mRNA for phagocyte specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infet. Immun.* 62: 4005-4014
5. Gemmell E., Walsh, L, Savage, N. (1994) Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J. Periodontal Res.* 29: 46-53
6. Moughal, NA, Adonogianaki, E, Thornhill, M, Kinane D. (1992) Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. *J. Periodont Res* 27: 623-630
7. Weintraub, A., Zahringer, U, Wollenwever H, Seydel S and Rietschel E. (1989) Structural characterization of the lipid A component of *Bacteroides fragilis* strain NCTC 9343 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 183: 425-431
8. Kumada, H., Haishima, Y, Umemoto T and Tamamoto K. (1995) Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 177: 2098-2106
9. Kumada H, Kondo S, Umemoto, T, Hisatsune K. (1997) Chemical structure of the 2-keto-3-deoxyoctonate region of lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS. Microbiol Lett.* 108(1): 75-79
10. Fujiwara T, Ogawa T, Sobue S, and Hamada S. (1990) Chemical immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. *J. Gen. Microbiol.* 136: 319-326

11. John B, Olsen, I, and Bryn K. (1983) Fatty acids and sugars in lipopolysaccharides from *Bacterioides intermedius*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides loescheii*. *Oral Microbiol Immunol* 3: 22-27
12. Mashimo J, Michiko Y, Ikeuchi K, Hata S. (1985) Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolysaccharides from oral bacteria. *Microbiol Immunol* 29(5):395-403
13. Mashimo J, Michiko Y, Ikeuchi K, Hata S. (1985) Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolysaccharides from oral bacteria. *Microbiol Immunol* 29(5):395-403
14. Sugiyama A, Arakaki R, Ohnishi T, Arakaki N, Daihara Y, Takada H. (1996) Lipoteichoic acid and Interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture. *Infect Immun* 64: 1426-1431.
15. Morrison DC, Ryan JL. (1992) Eds. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*. Vol I. Boca Raton CRC Press.

Figura 1. Curso clínico. El aumento de bacterias patógenas en la placa dental subgingival, producen reacciones inflamatorias, resorción ósea y pérdida del ligamento de inserción, con lo que se produce aumento de profundidad y ulceración del epitelio de unión o formación de bolsa. A) Proliferación apical de las células epiteliales de la inserción del epitelio de unión y del epitelio del surco. B) Movimiento apical del epitelio de la unión, degeneración de las fibras gingivales; reabsorción osteoclástica; fibrosis C) Periodontitis avanzada.

Figura 2. Estructura química de tres lipopolisacáridos ampliamente caracterizados. A) *E.coli*. B) *A. actinomicetemcomitans*. C) *P. gingivalis*.

Figura 3. Efecto de las bacterias sobre la superficie dental.

La interacción entre lipopolisacáridos (L.P.S.) y receptores celulares (CR3) conduce a la activación directa de las células endoteliales. Estas toxinas activan a monocitos mediante una vía indirecta lo que conlleva a la liberación de citocinas (IL-1 y TNF), prostaglandina E2 (PGE2) y metaloproteínasa (MMP). El resultado neto de esta interacción provoca la salida de leucocitos del flujo sanguíneo a los tejidos.

Figura 4. Mecanismo de destrucción ósea.

La presencia de lipopolisacáridos conduce a la activación de osteoclastos (células multinucleadas) que desmineralizan los huesos y forman una matriz no colágena. Las fibrillas de colágeno son fagocitadas por mononucleares (MΦ) o células similares a los fibroblastos. La activación de la resorción ósea se produce por la prostaglandina (PG), por el factor activador de los osteoclastos (OAF, procedente de las células T) y por la interleucina (IL-1 liberada por los macrófagos),

Artículo 2

Gloria Gutiérrez-Venegas, Mauricio Axayacatl Peña-Párraga y Erika Inés García-Ruíz.

Laboratorio de Bioquímica. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, c.p. 04510.

Tel/Fax: 56 22 55 54; correo electrónico: gloria@fo.odonto.unam.mx

Participación de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa como mecanismo de defensa celular en el estrés oxidativo.

Resumen: A pesar de los numerosos estudios que se han realizado en las propiedades de estos diferentes sistemas antioxidativos y del hecho de que participan en la defensa de radicales libres del oxígeno su importancia en la célula no ha sido esclarecida del todo. En particular por la heterogenidad de los modelos experimentales y por el tipo de condiciones oxidativas empleadas. Es por esta razón que la interpretación de los resultados varía enormemente porque se han seleccionado modelos de efectos protectores de enzimas antioxidativas, de proliferación celular, supervivencia celular, ruptura de DNA y tumorigenicidad.

El siguiente paso en el conocimiento del comportamiento de estas enzimas consiste en incrementar la concentración de enzimas antioxidativas usando varios sistemas y estudiar los efectos protectivos contra el estrés oxidativo. La actividad de la catalasa se incrementa para proteger a las células endoteliales de los radicales generados por el sistema de la xantina oxidasa. La enzima superóxido dismutasa protege a estas células de la hipoxia. Esta enzima también protege de hipoxia a fibroblastos y de la activación por paraquat.

Es posible que las tres principales enzimas tengan influencia entre sí aunque se encuentren en compartimentos separados. La enzima glutatión peroxidasa protege de la lipoperoxidación y superóxido dismutasa actúa en regiones hidrofílicas y de esta forma la protección de estructuras tanto hidrofóbicas como hidrofílicas son complementarias garantizándose así la integridad celular contra el ataque por radicales libres.

Introducción .

Todas las células eucariotas tienen un conjunto de enzimas responsables de la remoción de estos radicales libres, el superóxido se hidroliza por acción de la enzima superóxido dismutasa y el peróxido por la enzima peroxidasa.

Me permito referirme de manera muy somera en la enzimología de los intermediarios del oxígeno que es un campo de interés desde hace aproximadamente 100 años. En el periodo comprendido entre 1858 a 1886 el investigador Traube que se encontraba investigando en Alemania, llegó a la conclusión de que la oxidación biológica involucra la activación de molecular del oxígeno por enzimas intracelulares.

Y algunos años después particularmente en 1894 los investigadores Yoshida de Japón y Bertrand en Francia determinaron que había un grupo de enzimas que participaban en el oscurecimiento y endurecimiento de las hojas del árbol de látex de origen Oriental. Bertrand acuñó el nombre de laccasa al grupo de enzimas que participaban en este proceso y que catalizaban la oxidación de sustancias fenólicas como el lactol o ursinol presentes en estos árboles. Posteriormente encontró que la enzima laccasa se encontraba presente también en los hongos y estos contenían una laccasa distinta a la que denominó tirosinasa y que estaba involucrada en el oscurecimiento de los mismos. A partir de estos hallazgos Bertrand introdujo el término oxidasa al conjunto de enzimas que catalizan estas reacciones y sugirió que pertenecían al grupo de las metaloproteinasas.^(1,2)

En la actualidad se han caracterizado más de 200 enzimas que utilizan al oxígeno como sustrato, las cuales se han agrupado en:

- Oxigenasas
- Oxidasas

Las oxigenasas catalizan la incorporación de átomos de oxígeno en sustratos orgánicos. Y se agrupan a su vez en dioxigenasas (que catalizan la inserción del dioxígeno en susbtratos

orgánicos) y monoxigenasas (que catalizan la inserción de un átomo de dioxígeno hasta su reducción en agua).

En las reacciones catalizadas por oxidasas la molécula de dioxígeno funciona como un aceptor de electrones que es reducido a superóxido (O_2^-), peróxido (H_2O_2) o a dos moléculas de agua (H_2O).

En su conjunto todas las enzimas que activan y reducen al dioxígeno son proteínas conjugadas, en cuyos grupos prostéticos de estas enzimas está presente la flavina, el cobre o el hierro. Muchas de estas enzimas son hemo proteínas en particular las enzimas denominadas oxidasas ya que las enzimas agrupadas como oxigenasas carecen de grupos hemo. Algunas flavoproteínas contienen molibdeno, así como centros ferro-sulfurados pero estos grupos no aparecen directamente involucrados en la reducción del dioxígeno. La reacción del dioxígeno generalmente ocurre en el grupo prostético e involucra tres pasos fundamentales y que a continuación se mencionan:

- La combinación de oxígeno con una flavina que se encuentra en estado ampliamente reducida, en forma flavín-peróxido
- La asociación de oxígeno a un centro metal reducido con varios grados de transferencia electrónica del metal al oxígeno.
- La activación por un centro metal oxidado del sustrato orgánico, el cual puede reaccionar directamente con el dioxígeno unido al sitio activo.

Existen dos factores que hacen al dioxígeno cinéticamente inerte:

1. Su estado basal como triplete, ya que su spin promueve restricciones en la reacción.
2. La magnitud negativa en el potencial de reducción estándar del electrón del oxígeno para la formación del radical superóxido el cual realiza este proceso no espontáneo con donadores de electrones que tienen potenciales elevados.

Los procesos de formación de radicales libres se resumen en la figura 1 en la que se muestran los sistemas enzimáticos en la producción de las especies reactivas del oxígeno, así mismo los sistemas (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) depuradores de estas especies reactivas del oxígeno en particular el ión superóxido (O_2^-), y el peróxido (H_2O_2) hasta la formación de agua (H_2O).

En términos generales podemos afirmar que el oxígeno sirve como una molécula oxidativa en los organismos aeróbicos porque permite la producción de energía durante la respiración debido a su alto potencial electroquímico. Por su estructura electrónica la reducción del oxígeno se efectúa a través de pasos sencillos de transporte de electrones lo que produce la generación de radicales libres.

Hace algunas décadas Gershan, Mc Cord y Fridovich descubrieron al ión superóxido y su papel en la toxicidad del oxígeno.^(3,4)

Durante la respiración celular el oxígeno es reducido a la molécula agua por la enzima citocromo oxidasa, solamente del 3 al 5% del oxígeno usado se convierte en superóxido como resultado de la liberación de electrones en la cadena de transporte de electrones ubicada en la membrana interna mitocondrial.^(4,5) Así mismo el superóxido y el peróxido se forman en la célula por la activación de complejos enzimáticos como el xantín-oxidasa, citocromo P450 y NADPH

oxidasa, así como por la autooxidación de moléculas pequeñas como las catecolaminas, flavinas y como resultado de ciclos xenobióticos como el paraquat, nitrofurantoina y adriamicina.

El ión hidroxilo es formado por la reacción denominada de Haber-Weiss que se produce entre el peróxido y el superóxido. Esta reacción es catalizada por metales de transición en particular fierro y se denomina reacción de Fenton.⁽⁶⁾ Debido a su reactividad, estos radicales libres reaccionan de forma instantánea, dañando los componentes celulares.

Todos los componentes celulares pueden reaccionar con radicales libres derivados del oxígeno en uniones insaturadas y grupos tiol. En las proteínas algunos de sus aminoácidos son sumamente sensibles a este ataque induciendo alteraciones enzimáticas o cambios de conformación.⁽⁷⁾ El ión hidroxilo puede producir entrecruzamientos entre proteínas y la ruptura de aminoácidos lo que conduce a la fragmentación de macromoléculas.⁽⁸⁾ Los ácidos nucleicos también son blanco de radicales libres, cuyo aumento en concentración promueve la ruptura del DNA o modificación de las bases nitrogenadas lo que conlleva a mutaciones puntuales.⁽⁷⁾

Sin embargo el daño más importante es causado por lipoperoxidación en donde los ácidos grasos polinsaturados son muy sensibles al ataque por radicales libres lo que promueve su ruptura a aldehídos que son muy tóxicos a las células.^(9,10,11) Estos eventos ocasionan cambios muy profundos en la estructura de las membranas alterando el funcionamiento celular.

En la actualidad se ha propuesto que todos estos eventos es decir, la modificación de proteínas, la ruptura del DNA y la lipoperoxidación participan en la promoción de la muerte celular durante el estrés oxidativo.

SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Las células los utilizan para defenderse del ataque por radicales libres, se han descrito hasta el momento diferentes sistemas antioxidantes como el sistema α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión así mismo enzimas antioxidantes como isoformas de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. En condiciones fisiológicas estas enzimas mantienen concentraciones bajas de radicales libres y su actividad está acuciosamente regulada.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa fue descubierta por McCord y Friedovich en 1969, su función es dismutar dos iones superóxido (O_2^-) en peróxido (H_2O_2) y oxígeno (O_2), esta enzima es de suma importancia en el mantenimiento de condiciones aeróbicas. Se han descrito tres isoformas que presentan iguales propiedades cinéticas. En procariontes una de estas isoformas contiene fierro en su sitio activo,^(12,13) la forma que contiene manganeso está presente tanto en eucariontes como procariontes y la otra isoforma se encuentra en la mitocondria y el citoplasma, es una forma dependiente de cobre – zinc. Esta enzima es la primera defensa contra los radicales libres derivados del oxígeno y puede ser rápidamente inducida bajo determinadas condiciones cuando las células o los organismos son expuestos a estrés oxidativo. La catalasa es una enzima ubicua que se encuentra presente en todos los organismos. En las células eucariontes se encuentra en los peroxisomas. Esta enzima contiene un grupo hemo en el sitio activo que es el responsable de su actividad catalítica. La enzima utiliza como sustrato dos moléculas de peróxido y las transforma en dos moléculas de agua y oxígeno. Esta enzima al igual que la enzima superóxido dismutasa se induce cuando las células son sometidas a algún tipo de estrés.⁽¹⁴⁾

La enzima glutathione peroxidasa es una selenoproteína, tetramérica; cada subunidad tiene un peso molecular de 22,000 daltons, así mismo cada una de estas subunidades contiene un átomo de selenio en forma de selenocisteína y es la región de la enzima involucrada en la catálisis.⁽¹⁵⁾

Diversos estudios señalan que del sesenta al setenta por ciento de la actividad de esta enzima se encuentra ubicada en el citoplasma de las células y del veinticinco al cuarenta por ciento en la mitocondria. Chambers⁽¹⁶⁾ demostró que el residuo selenocisteína se encuentra codificado en el codón de término UGA en el mensajero. Este codón denominado también ópalo es reconocido por una molécula especial de RNA de transferencia que al inicio es cargado con serina y después la serina es convertida en selenocisteína. Este seleno aminoácido es incorporado post-traduccionalmente en el polipéptido de las subunidades de la enzima glutathione peroxidasa.⁽¹⁷⁾ La deficiencia de selenio *in vivo* e *in vitro* conduce a una dramática disminución en la actividad de esta enzima.

La enzima glutatión peroxidasa reduce hidroxiperóxidos lipídicos y no lipídicos también a la molécula de peróxido para catálisis de estas partículas oxida a dos moléculas de glutatión. El mecanismo enzimático de la catálisis es ter-uni-ping pong, la tasa de reacción enzimática se incrementa linealmente conforme aumenta la concentración de sustrato. Este tipo de cinética es la responsable de la alta tasa de reducción del peróxido. (Figura 2)

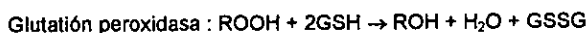
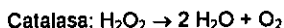
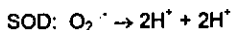


Figura 2. Reacciones catalizadas por las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. GSH: glutatión reducido, GSSG glutatión oxidado.

EFFECTOS PROTECTORES DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A pesar de los numerosos estudios que se han realizado en las propiedades de estos diferentes sistemas antioxidativos y del hecho de que participan en la defensa de radicales libres del oxígeno su importancia en la célula no ha sido esclarecida del todo. En particular por la heterogenidad de los modelos experimentales y por el tipo de condiciones oxidativas empleadas. Es por esta razón que la interpretación de los resultados varía enormemente porque se han seleccionado modelos de efectos protectores de enzimas antioxidativas, de proliferación celular, supervivencia celular, ruptura de DNA y tumorigenicidad. Todos estos estudios han llevado a interpretaciones contradictorias, como con la enzima superóxido dismutasa que en ocasiones actúa de forma protectora y en otras de manera deletérea.

COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS

Existen infinidad de protocolos experimentales que tratan de evaluar el potencial protector de las enzimas antioxidativas. Y que consiste en exponer a los animales o células a un sistema generador de radicales libres y determinar sus efectos. El mecanismo más sencillo es la adición de las enzimas de forma extracelular a las células expuestas *in vitro* a sistemas generadores de radicales libres.⁽¹⁸⁾ Se descubrió que solo la catalasa protege de los radicales libres generados del sistema de la xantín-oxidasa acetaldehído en fibroblastos humanos. Martín ⁽¹⁹⁾ así mismo encontró que la catalasa inhibe la toxicidad inducida por nitrofurantoína en células parenquimatosas.

El siguiente paso en el conocimiento del comportamiento de estas enzimas consiste en incrementar la concentración de enzimas antioxidativas usando varios sistemas y estudiar los efectos protectivos contra el estrés oxidativo. La actividad de la catalasa se incrementa para proteger a las células endoteliales de los radicales generados por el sistema de la xantín oxidasa.⁽²⁰⁾ La enzima superóxido dismutasa protege a estas células de la hipoxia. Esta enzima también protege de hipoxia a fibroblastos y de la activación por paraquat.⁽²¹⁾

Es posible que las tres principales enzimas tengan influencia entre sí aunque se encuentren en compartimentos separados. La enzima glutatión peroxidasa protege de la lipoperoxidación y superóxido dismutasa actúa en regiones hidrofílicas y de esta forma la protección de estructuras tanto hidrofóbicas como hidrofílicas son complementarias garantizándose así la integridad celular contra el ataque por radicales libres.

Algunos estudios señalan que la recuperación^(22,23,24) de las células expuestas a estrés oxidativo depende de la intensidad del estrés. Estos resultados sugieren que los daños oxidativos no pueden ser reparados completamente y esto altera la división celular. Se ha demostrado que la inyección a diferentes concentraciones de catalasa, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa en células con exposición a diferentes períodos de hipoxia tan prolongados como 20 horas no alteran la capacidad de las células de dividirse.

En los estudios mencionados anteriormente se describió el papel que tienen estas enzimas en mantener a las células en condiciones normales como consecuencia de la remoción de radicales libres derivados del oxígeno.

En los estudios realizados por Michelis⁽²⁵⁾ demostró que la microinyección con anticuerpos contra las enzimas superóxido dismutasa Cu-Zn y glutatión peroxidasa incrementa la mortalidad de fibroblastos por hipoxia. Estos resultados sugieren que ambas enzimas son necesarias para la protección de la célula contra el ataque por radicales libres cuando las células son expuestas a estrés oxidativo.

En otros experimentos Puglia y Powell demostraron que se incrementa la toxicidad por hipoxia en ratas cuando se utiliza biscloroetilnitrosourea⁽²⁶⁾ este fármaco inhibe a la glutatión peroxidasa. Posteriormente Suttorp⁽²⁷⁾ demostró que al inhibir el ciclo de la glutatión peroxidasa con butionina sulfoximina o biscloroetilnitrosourea decrece de forma importante la resistencia de células endoteliales a la generación de radicales libres por la vía de la glucosa oxidada.

En fechas recientes mediante la utilización de técnicas de transfección se ha establecido que la sobre expresión de la actividad de superóxido dismutasa promueva que las células de ratón sean más resistentes a paraquat o hipoxia, posteriormente Huag⁽²⁸⁾ demostró una clara correlación entre la magnitud en el incremento de la actividad de superóxido dismutasa y la resistencia a paraquat.

Sin embargo bacterias enriquecidas con superóxido dismutasa muestran un aumento en la sensibilidad a la hipoxia⁽²⁹⁾ y a radiaciones ionizantes⁽³⁰⁾ y en otros experimentos los fibroblastos humanos transfectados con superóxido dismutasa son más resistentes a paraquat pero más sensibles a la lipoperoxidación.⁽³¹⁾

Finalmente en condiciones normales la célula promueve el balance entre la producción de radicales libres derivados del oxígeno y su destrucción por sistemas antioxidantes. Sin embargo este balance puede romperse ya sea por incremento en la concentración de radicales libres o bien por decremento en los sistemas de defensa. Estas dos estrategias se han utilizado para comprender el papel de las enzimas antioxidantes en la protección celular.

Bibliografia.

- 1) Buechter D.D. Free radicals and Oxygen toxicity. P^harm. Res. 1988 57 (3) 231-2-37.
- 2) Keilin, D. 1966. The history of Cell Respiration and Cytochrome. London: Cambridge Univ. Press. 416 pp.
- 3) Hill, H.A. 1979. In oxygen Free Radicals and Tissue Damage. Pp 5-11. Amstedam: Excepta Medica. 381 pp.
- 4) Haugaard N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity. Physiol Rev. 48: 311-375: 1968.
- 5) Gerschman, R., Gilbert, DI, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and X-radiation. A mechanism in common.Science 119: 623-626. 1954.
- 6) McCord J, M. Fridovich I. Superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 244: 6049-6055: 1969.
- 7) Turrens, JF, Boveris, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J. 191: 421-437: 1980.
- 8) Halliwell, B., Gutteridge JMC. Oxygen toxicity oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J. 219: 1-14; 1984.
- 9) Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. Angew. Chem 25:1058-1071:1986.
- 10) Davies, KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. J. Biol. Chem. 262:9895-9901: 1987.
- 11) Comporty M. Biology of disease. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. Lab. Invest. 53: 599-623: 1985.
- 12) Kappus, H. Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In Seis H. ed. Oxidative Stress. London. Academic Press. 1985: 273-310.
- 13) Sullivan SJ, Oberley, TD, Roberts, RJ, Spitz DR. A stable O₂-resistant cells line. Role of lipid peroxidation by products in O₂-mediated injury. Am. J. Physiol 262:L747-L756.
- 14) Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. Biochem J. 266: 213-219: 1990.
- 15) Fridovich I. Superoxide dismutases. Regularities and irregularities. Harvey Lect 79: 51-75: 1985. Masters, C., Pegg, M. Cranc, D. On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. Mol. Cell. Biochem. 70: 113-120: 1986.

- 16) Masters, C., Pegg, M., Cranc, D. on the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol. Cell. Biochem.* 70: 113-120: 1986.
- 17) Flohe, L. Glutathione peroxidase brought into focus. In Pryor WA ed. *Free radicals in biology*. Vol V. London: Academic Press: 1982: 223-254.
- 18) Chambers, I., Frampton, J., Coldfarb, P., Affara, N., McBain, W., Harrison PR. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene. The selenocysteine in the active site is encoded by the termination codon TGA. *Embo J.* 5:1221-1227: 1986.
- 19) Burk, RF. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J.* 5: 2274-2279: 1991.
- 20) Simon, RH, Scoggin CH, Petterson, D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 256: 7181-7184: 1986.
- 21) Martin, WJ. Nitrofurantoin: Evidence for the oxidant injury of lung parenchymal cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:482-486: 1986.
- 22) Beckman, JS, Minor, RL, White CW, Repine JE, Rosen, GM, Freeman, BA. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylen glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J. Biol. Chem.* 263:6884-6892: 1988.
- 23) Bagley, AC, Krall, J, Lynch, RE. Superoxide mediates the toxicity of paraquat for chinese hamster ovary cells. *Proc Natl. Acad. Sci.* 83: 3189-3193: 1986.
- 24) Ody, C, Junod, AF. Direct toxic effects of paraquat and oxygen on cultured endothelial cells. *Lab. Invest.* 52:77-84: 1985.
- 25) Honda, S, Matsuo, M. Lack of recovery from oxygen-induced damage to colony formation and DNA synthesis in senescent human diploid fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* 40: 81-87: 1989.
- 26) Martin WJ, Kachel DL. Oxygen mediated impairment of human pulmonary endothelial cell growth. Evidence for a specific threshold of toxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 113: 413-421: 1989.
- 27) Michielis, C, Raes, M, Zachary MD, Delaive E., Remacle J. Microinjection of antibodies against superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *Exp. Cell Res.* 179: 581-589: 1988.
- 28) Powell, R, Puglia CD. Effects of inhibition of glutathione reductase by carmustine on central nervous system oxygen toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 111-117: 1987.
- 29) Suttorp N, Toepper, W, Roka L. Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: Glutathione redox cycle and catalase. *Pediatr Res.* 32: 360-365: 1992.

- 30)Huang, TT, Carlson EJ, Leadon, SA, Epstein, CJ. Relationship of resistance to oxygen free radicals to CuZn-superoxide dismutase activity in transgenic, transfected and trisomic cells. FASEB J. 6:903-910: 1992.
- 31)Scott, MD, Meshnick, SR, Eaton JW. Superoxide dismutase rich bacterial. Paradoxical increase in oxidant toxicity. J. Biol. Chem. 262: 3640-3645: 1987.

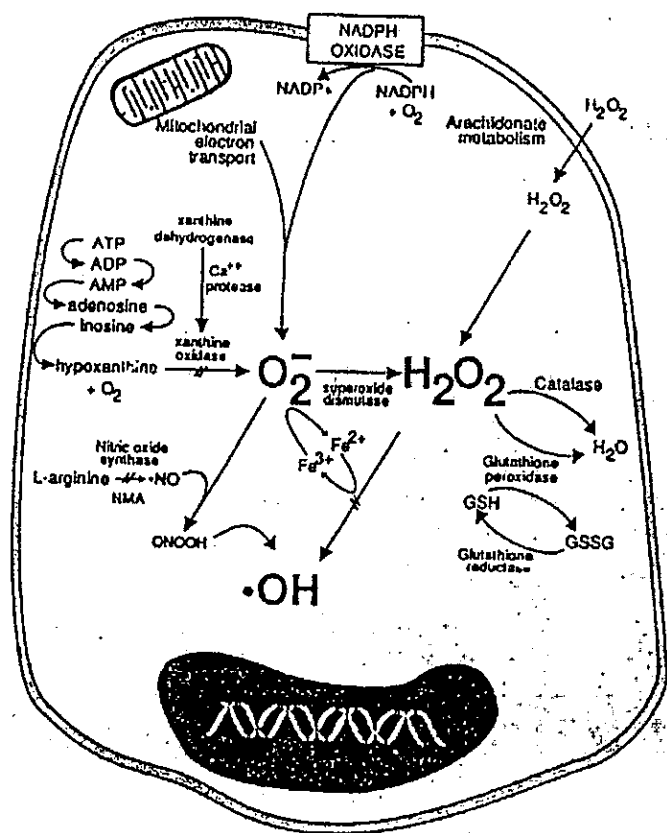


FIGURA 1. Mecanismos celulares de producción de óxido nítrico.