

478



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

EFFECTO DE LOS LIPOPOLISACARIDOS de *Actinobacillus
actinomycetemcomitans* SOBRE LA MOVILIZACION DE Ca^{2+}
EN LOS FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS
TRATADOS CON LAS HORMONAS BRADIQUININA
E HISTAMINA

28/6/68

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A:

ELIZABETH RUIZ CHARLES

TUTOR:

DRA. GLORIA GUTIERREZ-VENEGAS



MEXICO, D. F.

2001



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

- **A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (D.G.A.P.A. Proyecto IN224398), por el apoyo financiero brindado para la realización de este proyecto.**
- **A Alumna del laboratorio Silvia Maldonado.**
- **A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica, en especial a Ariadna López Toledo, José Molina López, y Filiberto Hernández García.**
- **A mi Madre y padre, mi familia.**
- **A Mauricio Chacón, que estuvo a mi lado y me brindó apoyo en todos aquellos momentos buenos y malos.**
- **Y muy especialmente a la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, por su tutoría, sus enseñanzas, su amistad, paciencia, confianza y consejos mi profundo agradecimiento.**

DEDICATORIA

A mi hermano Gabriel Ruíz Charles (1975-1997) por su maravilloso ejemplo y por la mejor herencia que pudo haberme dejado: luchar por mis ideales y sueños, esforzarme por lograr mis metas y dar lo mejor de mi cada día, y nunca darme por vencida.

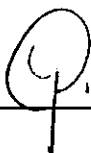
**Con amor para ti
*Por siempre juntos***

JURADO

PRESIDENTE C.D. Luz del Carmen González García
VOCAL MC Jaime Esquivel Soto
SECRETARIO Dra. Gloria Gutiérrez Venegas
SUPLENTE C.D. Verónica Vanegas Vidaurreta
SUPLENTE C.D. Gerardo Martínez Anaya

El presente trabajo de investigación titulado " EFECTO DE LOS LIPOPOLISACARIDOS de *Actinobacillus actinomycetencomitans* SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE Ca^{2+} EN LOS FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS TRATADOS CON LAS HORMONAS BRADIQUININA E HISTAMINA ". Se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, bajo la dirección de la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

Gloria Gutiérrez Venegas
Tutor.



Elizabeth Imelda Ruíz Charles
Sustentante.



INDICE

1. RESUMEN.

2. INTRODUCCIÓN.

3. ANTECEDENTES.

3.1.1 ENCÍA.

3.1.2 HUESO ALVEOLAR.

3.1.3 LIGAMENTO PERIODONTAL.

3.1.4 CEMENTO.

3.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL.

3.2.1 GINGIVITIS

3.2.2 PERIODONTITIS.

3.2.3 ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

3.2.4 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

3.3 MICROORGANISMOS ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

3.3.1 *Actinobacillus.*

3.3.1.1 Morfología y fisiología.

3.3.1.2 Aspecto clínico.

3.3.1.3 *Bacteroides no pigmentados.*

3.3.1.4 *Bacteroides gingivalis.*

3.3.1.5 *Bacteroides intermedius.*

3.4 LIPOPOLISACÁRIDOS.

3.4.1 Estructura de lipopolisacáridos.

3.5 Transducción de señales.

3.5.1 Transducción de señales asociadas a lipopolisacáridos.

3.5.2 Transducción de señales por histamina y bradiquinina.

4. JUSTIFICACIÓN.

5. HIPÓTESIS.

6. OBJETIVOS.

6.1 OBJETIVOS GENERALES.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Aislamiento y caracterización de bacterias.

7.2 Cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos.

7.3 Determinación de Calcio.

8. RESULTADOS.

9. DISCUSIÓN.

10. CONCLUSIONES.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

12 ANEXO.

1. - RESUMEN

Los Lipopolisacáridos, purificados de una gran variedad de bacterias gram negativas inhiben la proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos, y están implicados en la patogénesis de la enfermedad periodontal. Participan así mismo en prolongar el proceso de cicatrización posterior a la terapia periodontal.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar el mecanismo de los lipopolisacáridos y establecer si participan en la vía de transducción de fosfoinositidil-calcio.

Para la determinación de Ca^{2++} , se utilizó como indicador FURA2/AM. En este trabajo mostramos que el pretratamiento con lipopolisacáridos promueve la disminución en la respuesta de Ca^{2++} inducida por Bradiquinina ($1 \mu M$) e Histamina ($100 \mu M$). La disminución de la respuesta es dependiente de la concentración de LPS utilizado en la primera estimulación.

Nuestros datos sugieren que el pretratamiento con lipopolisacáridos participa en la disminución a la respuesta a Bradiquinina e Histamina en fibroblastos gingivales humanos mediante una vía diferente al sistema de fosfoinosítidos-calcio.

2. INTRODUCCIÓN.

Las endotoxinas o lipopolisacáridos son potentes mediadores de procesos inflamatorios y son además los componentes mayoritarios de las bacterias gram negativas. Ocupan aproximadamente el 75% de la superficie externa de la membrana exterior. Mientras que la porción restante la compone la proteína denominada porina de aproximadamente 6000 daltons que forma pequeños canales de difusión hidrofílica a través de la membrana externa.

Los lipopolisacáridos están formados por cuatro diferentes dominios estructurales: una estructura denominada lípido A, un núcleo interno de oligosacáridos (que presenta dos azúcares atípicos como una heptosa y el KDO), un núcleo oligosacárido externo y finalmente un polisacárido O-antigénico que provee a las bacterias de una apariencia lisa. Existen aproximadamente 3 a 4 millones de moléculas de lipopolisacárido por célula. Los grupos carboxilo en KDO, los residuos fosfato en el lípido A y heptosas hacen del lipopolisacárido una molécula aniónica. Los cationes calcio y magnesio se unen al lipopolisacárido para formar puentes iónicos y propician la formación de estructuras altamente organizadas. Diversos estudios señalan que la proteína receptora de la superficie celular denominada CD-14 participa de manera importante en la asociación de alta afinidad a los lipopolisacáridos ($K_d = 30 \text{ nM}$).

La parodontitis es una enfermedad inflamatoria en las encías que conduce a la pérdida progresiva de las células del ligamento parodontal y hueso alveolar que proveen el soporte a los dientes.

Las bacterias residentes en la placa dental son consideradas como los agentes etiológicos de la enfermedad; en específico las bacterias gram negativas que contienen lipopolisacáridos. Estas moléculas, promueven la activación de señales intracelulares en fibroblastos gingivales humanos lo que conduce al desarrollo de procesos inflamatorios.

Desde hace algunos años se ha determinado que los fibroblastos gingivales humanos responden a la acción de la bradiquinina e histamina,

hormonas que intervienen en procesos inflamatorios, se ha demostrado así mismo que estas hormonas activan la vía de fosfoinosítidos-calcio, es por este motivo que decidimos determinar si los lipopolisacáridos actúan a través de la misma vía de transducción o participan en modular la vía de transducción de estas importantes hormonas promotoras de procesos inflamatorios.

3.-ANTECEDENTES

3.1 PARODONTO

El parodonto es una estructura que esta constituida por cuatro regiones fundamentales: La Encía, el Ligamento Parodontal, el Cemento y el Hueso Alveolar (Fig.1).

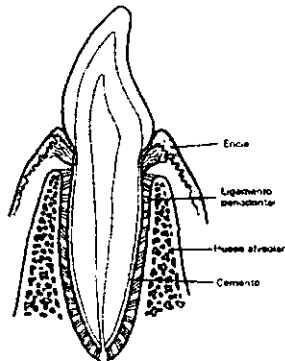


Fig. 1 Corte vestibulolingual que muestra los elementos del tejido periodontal (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P.H. y Pawlak E.A.)

3.1.1 Encía

La encía forma parte de la membrana mucosa bucal, incluida en la mucosa masticatoria, que recubre las apófisis alveolares y rodea las porciones cervicales de los órganos dentarios. Presenta un grosor de 1 a 9 mm y abarca desde el surco gingival hasta la unión mucogingival. Se caracteriza por presentar una coloración rosa pálido, gran vascularización y estar conformada de epitelio escamoso estratificado y tejido conjuntivo fibroso denso (Fig.2) ⁽¹⁾

El epitelio gingival de la encía, esta constituido, a su vez, por la capa basal o estrato germinativo; presenta células relativamente pequeñas, cuboidales, que están separadas por una lámina basal o membrana de las células del tejido conectivo. Después localizamos las células espinosas que constituyen el estrato

espinoso; estas células están unidas a pequeñas prolongaciones citoplasmáticas a las células que forman la capa granular, que es aplanada. Aquí encontramos gránulos de queratohialina (formación de queratina); la última capa, la más superficial, el estrato córneo, consistente en células aplanadas, queratinizadas, sin núcleo y con muy pocos organelos.

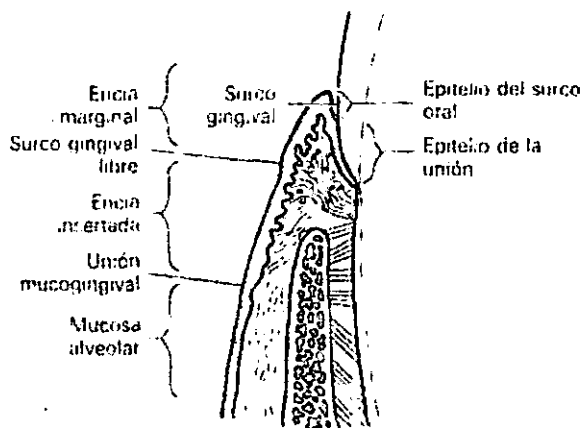


Figura 2 Corte histológico vestibulolingual del tejido periodontal en la cara facial del diente (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P.H. y Pawlak E.A.)

3.1.2 Hueso alveolar

El tejido conectivo supra-alveolar comprende la encía coronal y cresta del hueso alveolar, está constituido por células, siendo la principal de ellas el fibroblasto (alrededor del 5%), esta célula fusiforme y alargada (Fig 3), con un contenido del 15 % de retículo endoplasmático granuloso, esa célula es la responsable de la producción de la colágena. Sin embargo, se ha comprobado que tanto la colágena como la elastina pueden ser producidas por células del músculo liso, por lo menos en algunas partes del cuerpo ⁽²⁾.

La unidad dento-alveolar, ejerce funciones de nutrición, formación, sensibilidad y soporte; está compuesta por cementoblastos, fibroblastos, y osteoblastos, con presencia de vasos sanguíneos y red nerviosa.

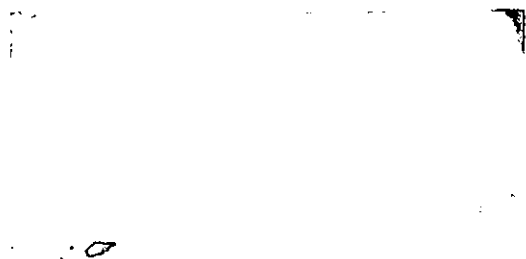


Fig.3 Microscopia de transmisión electrónica de fibroblastos gingivales humanos. En la micrografía se muestra un aumento de x1500 de fibroblasto gingival mediante la técnica de transmisión de electrones. (Tomada en el laboratorio de Bioquímica.)

3.1.3 Ligamento periodontal

Las fibras gingivales del ligamento parodontal, son sintetizadas por los fibroblastos gingivales, están formadas en un 80% por colágeno tipo I y un 20% del tipo III, disminuyendo estas con la edad. Así mismo, el ligamento esta constituido por glucosaminoglucanos, moléculas de la matriz extracelular, que mantienen unidas a las células y forman un medio poroso para la difusión de nutrientes y oxígeno en el entorno, en particular, dermatán sulfato, condroitín sulfato y fibronectina⁽³⁻⁵⁾

Las fibras colágenas se distribuyen al azar y se organizan en fascículos se denominan de acuerdo a su emplazamiento, dirección y volumen. Se dividen en fibras circulares que rodean la raíz y fibras transeptales que se extienden a través de la encía interdental y se anclan en los cementos de los dientes contiguos.

3.1.4 Cemento

El cemento es un tejido calcificado con un índice de recambio bajo, carece de irrigación linfática y sanguínea, así como de inervación y se presenta en capas alrededor de la raíz dental existiendo dos clases:

Acelular.- que cubre la parte cervical del diente y en ocasiones se extiende hasta casi toda la raíz, excepto en la región apical.

Celular.- Amorfo y transparente que contiene los cementoblastos.

El cemento tiene una función eminente como estructura del soporte dental en el hueso alveolar, y se ha establecido que dispone de componentes biológicos importantes para inducir la asociación, migración y proliferación de los fibroblastos. Se trata de una familia de moléculas que parecen ser exclusivas del cemento, debido a que no se han detectado en el área de la dentina⁽⁶⁾.

El proceso de formación del cemento, llamado también cementogénesis, se inicia con la aposición de matriz, sobre la dentina a través de las células de Hertwing y posteriormente, a través de las células ectomesenquimales de los folículos dentales, que migran y se asocian a la matriz para diferenciarse en un tipo celular denominado cementoblastos, que son, en última instancia, las células formadoras del cemento⁽⁷⁾.

Entre los componentes de la matriz se han caracterizado proteínas, denominadas "de asociación", derivadas del cemento (CAP); que ejercen entre otras muy importantes, la función de promover la asociación de los fibroblastos y de las células mesenquimales.

Otro grupo de investigadores ha caracterizado un factor del cemento, al que nombraron como "factor de crecimiento derivado del cemento", y que funciona como un potente mitógeno de los fibroblastos gingivales humanos, aunque no se ha dilucidado con certeza el mecanismo del que se valen para cumplir su misión. Se sabe sin embargo, que estimula la movilización de calcio (Ca^{2++}), la activación de cinasas, del tipo serin-treonina, de la proteína cinasa C y

la traslocación de esta última del citoplasma a la membrana, así mismo induce la expresión de los proto-oncogenes c-fos y c-jun. Este factor de crecimiento, derivado del cemento es una proteína de 13 kDa que se presenta en la matriz del cemento y está ausente por lo general en la dentina y tejidos blandos⁽⁸⁻⁹⁾. Sin embargo, en estrecha convivencia con estos factores se encuentra presente, así mismo, la placa dentobacteriana, que se compone de bacterias gram-negativas, y algunas espiroquetas. Algunos de estos microorganismos liberan lipopolisacáridos que provocan tanto la inhibición de la proliferación, como de la actividad sintética de fibroblastos gingivales y están involucrados en la patogénesis de la inflamación parodontal. (Fig3)¹⁰

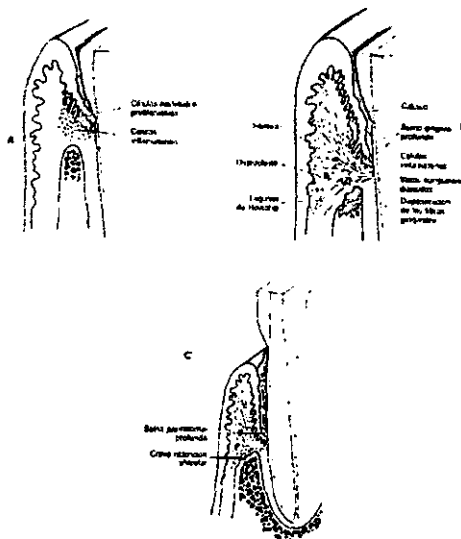


Fig 3. Formación de Bolsa

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 osteoclastica; fibrosis C. Periodontitis avanzada. (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P.H. y Pawlak E.A.)

3.2 ENFERMEDAD PARODONTAL

3.2.1 Gingivitis

Entre los padecimientos parodontales más frecuentes se encuentran la acumulación de placa dentobacteriana y de cálculos, lo que conduce al desarrollo de la enfermedad parodontal conocida como la gingivitis que se manifiesta como una inflamación de la encía, y en respuesta a la presencia de factores irritativos como los microorganismos de la placa dental que están asentados junto a la encía, lo que provoca signos clínicos muy importantes como la intensificación de la coloración rosa coral, cambiando hacia un rojo intenso; la primera respuesta a la irritación es el eritema caracterizado por la dilatación de capilares y el aumento del flujo sanguíneo. La intensificación del color rojo es consecuencia de la formación de nuevos capilares y el desarrollo de anastomosis entre arteriolas y venas. Cuando la inflamación se hace crónica los vasos sanguíneos se ingurgitan y congestionan, el retorno venoso se dificulta y el flujo sanguíneo se espesa; todo ello produce anoxemia (falta de oxígeno) en los tejidos lo que añade un tinte azulado a la encía enrojecida, la salida de glóbulos rojos de los vasos a los tejidos y la descomposición de la hemoglobina en sus pigmentos produce la coloración negruzca que se presenta en los casos de gingivitis crónica avanzada.

3.2.2 Parodontitis

3.2.3 Etiología

La parodontitis afecta a los tejidos del parodonto, se caracteriza por una destrucción progresiva del hueso alveolar, y por profundas alteraciones de encía y ligamento parodontal. Una de las características más importantes de la enfermedad parodontal es la formación de las bolsas parodontales que provocan la profundización patológica del surco gingival, y conduce indefectiblemente a la destrucción de los tejidos parodontales de soporte, lo que a su vez se traduce la movilidad de los dientes y su exfoliación final.

La parodontitis se debe principalmente a bacterias gram negativas entre las que se cuenta *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que es un coco-bacilo gram-negativo, sin embargo, también se relaciona con los bacteroides de las especies *melaninogenicus*, *gingivalis* e *intermedius*⁽¹¹⁾.

La patogenicidad de estas bacterias en estudios *in vitro* se relaciona con la habilidad de las bacterias presentes en la biopelícula dental para producir factores de virulencia, como endotoxinas, exotoxinas, enzimas y productos tóxicos derivados del metabolismo bacteriano.

El predominio de bacterias gram-negativas, ocasiona altas concentraciones locales de endotoxinas denominadas también lipopolisacáridos, estas moléculas son compuestos de alta toxicidad que ejercen efectos citotóxicos en los tejidos del huésped, en estudios *in vitro* se ha demostrado que estimulan la resorción ósea osteoclástica y causan una reacción de Schwartzman localizada con necrosis hística. Los efectos directos abarcan, leucopenia, activación del factor XII (o factor de Hageman), que traen como resultado la coagulación intravascular y la activación de la vía alterna del sistema de complemento.

Las enzimas producidas por bacterias bucales incrementan la permeabilidad del revestimiento epitelial del surco gingival, destruyen el tejido conectivo gingival y promueven la proliferación apical del epitelio de unión a lo largo de las superficies radiculares; entre estas enzimas se encuentra la colagenasa cuyo sustrato es la colágena y es producida por *B.gingivalis* y por el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y algunas otras enzimas como la hialuronidasa.

Otras enzimas bacterianas relacionadas con la enfermedad parodontal incluyen: proteinasas, gelatinasas y aminopeptidasas.

3.2.4 Clasificación

3.2.4.1 Parodontitis del Adulto.

Los padecimientos parodontales se relacionan con la aparición de bolsas parodontales, así como por la pérdida de inserción apical. Conforme el proceso de pérdida ósea avanza, los dientes son móviles y es posible advertir una migración patológica.

Entre los cambios más notables que presenta la encía se encuentran, enrojecimiento, tumefacción e inflamación, características típicas de la gingivitis. En algunos casos los pacientes con parodontitis muestran otros sitios de la encía con indicios de fibrosis o recesión, o bien aparecen sanos en su nivel superior.

Radiográficamente, se aprecian trastornos prematuros en el hueso, con el desarrollo de lesiones en forma de taza, dispuestas de manera interproximal y con pérdida de hueso en la cresta del proceso alveolar interproximal, aun sin daño a la lámina dura.

La pérdida vertical de hueso se presenta cuando la evolución de la pérdida es más veloz, la podemos encontrar en furcaciones, entre las raíces y puede llegar a alcanzar el ápice radicular, en cuyo caso es probable un pronóstico deficiente. La parodontitis infecciosa puede estar acompañada por espacios amplios de ligamento parodontal, zonas de recesión radicular y pérdida de lamina dura. ^(12,13)

3.2.4.2 Parodontitis Prepuberal.

Se inicia antes de los once años de edad y afecta la dentición primaria y permanente por lo general se presenta en pacientes que tienen alguna enfermedad sistémica de origen genético (síndrome de Down, Hipofosfatasa, síndrome de Papillon Lefevre).

Estas entidades patológicas son muy raras en la actualidad, pero producen un cuadro parodontal grave, de iniciación temprana y muy rápida evolución. Todas ellas se asocian con distintas deficiencias en los mecanismos de defensa

(función de neutrófilos, monocitos o ambos), y también alteraciones en la morfología y constitución de la placa (abundante placa no adherida y aumento de *A.a.*, *Porphyromonas gingivalis* y espiroquetas) ^(12,14).

Clínicamente presentan inflamación gingival moderada o severa, con bolsas profundas, gran destrucción ósea y pérdida prematura de dientes.

3.2.4.3 Parodontitis Juvenil.

Se presenta con mayor incidencia en adolescentes y adultos jóvenes (pubertad y los 20 años). Esta enfermedad afecta severamente el parodonto de uno o mas dientes en adolescentes, la magnitud de la destrucción es desproporcionada en relación con la cantidad de placa presente.

Hay escasa placa adherida, con abundante placa no adherida y flotante, mayor porcentaje de *A.a.*, también se encuentra *Capnocytophaga*, *Eikenella corrodens* y espiroquetas. Hay invasión bacteriana del tejido conectivo hasta del tejido óseo. Los pacientes presentan alteraciones funcionales de los leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos o los monocitos de sangre periférica o ambos, además de las alteraciones que los *A.a* producen en los neutrófilos gingivales. ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Se reconocen dos formas de la enfermedad: una localizada, que ataca principalmente a los primeros molares y los incisivos, y otra generalizada que abarca otros sectores.

Clínicamente, las lesiones se caracterizan por escasa inflamación gingival, bolsas profundas, escasa cantidad de placa, ausencia de cálculos, migración dentaria y movilidad, en especial de los incisivos superiores, con formación de diastemas.

Radiográficamente se observa pérdida ósea severa en la zona incisiva, y en los primeros molares una pérdida ósea angular desde distal del segundo premolar hasta mesial del segundo molar, la destrucción parodontal avanza 3 a 4

veces mas rápido que la parodontitis de avance lento.⁽¹¹⁻¹⁶⁾ La parodontitis juvenil, tiene tendencia familiar, se puede presentar en varios miembros de una misma familia.

3.2.4.4. Parodontitis Rápidamente Progresiva (PPR).

La PPR, puede presentarse en adultos o en pacientes jóvenes (antes de los 18 años), en los adultos comienza entre los 18 y los 30 años, y a los 30 o 35 años hay pérdida ósea severa, con movilidad dentaria, en general presenta una cantidad mínima de placa y cálculos.

En la parodontitis rápidamente progresiva puede haber tejidos gingivales con inflamación aguda severa, a menudo con proliferación y ulceración, supuración y hemorragia. Otras veces el tejido aparece rosado y sin inflamación.

Las lesiones suelen ser generalizadas aunque son mas graves en las furcaciones (Loe y Col 1986). La PPR se asocia con una placa bacteriana que incluye *A.a.*, *P.gingivalis*, *Prevotella intermedia* y espiroquetas. La mayoría de los pacientes tiene además alteraciones en la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos ^(10,13).

3.2.4.5. Parodontitis Refractaria (PR) y Recurrente.

Parodontitis Recurrente se denomina a la destrucción del aparato de inserción de un individuo cuyo tratamiento anterior comprobó ser exitoso y representa la aparición de una nueva fase del padecimiento clínico bien delineado, como resultado de cuidados inapropiados, y ocasiona de nuevo transtornos infectivos en el paciente después del tratamiento ⁽¹²⁾.

Parodontitis Refractaria, se refiere a la parodontitis que no responde al tratamiento convencional y se aplica a sujetos en quienes no funciona el tratamiento de una o varias lesiones ⁽¹²⁾.

La dificultad para definir la parodontitis refractaria consiste en que el cumplimiento y suficiencia terapéutica son difíciles de precisar. Haffajee y Col

en 1988 ⁽¹⁷⁾, descubrió que individuos con parodontitis refractaria, presentaban bolsas mas profundas y una mayor perdida de inserción que aquellos que reaccionaban favorablemente al tratamiento, además advirtió una combinación de gérmenes patógenos parodontales; *B.gingivalis*, *B.intermedius*, *A.a*, *Fusobacterium nucleatum* y valores de anticuerpos aumentado a un amplio orden de especies gram-negativas.

La definición de P.Refractaria, se aplica a individuos que no se sometieron a un tratamiento completo, bien fundamentado y que cumpliera con todos los principios para eliminación de infecciones, preparación de raíces, eliminación de todas las zonas de retención de placa, así como la motivación y éxito en la práctica de un apropiado control de placa por parte del paciente ⁽¹⁷⁾.

3.3 MICROORGANISMOS

3.3.1 A.a.(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)

El *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Actis = Rayo; Myces, Mycetis= Hongo; Comitans = Acompañado⁽¹⁷⁾, es un microorganismo que tiene que ver con la patogenia de la enfermedad parodontal. Fue aislado por primera vez por el microbiólogo alemán Klinger en 1912, de lesiones de actinomicosis cervicofacial.

3.3.1.1 Morfología y fisiología

Las colonias de *A.actinomycetemcomitans* (Fig.5) tienen una morfología interna con aspecto de estrella, sus células son esféricas o bacilares que miden 0.3 a 0.5 μm de ancho por 0.6 a 1.4 μm de largo. Son células gram-negativas, no encapsuladas, capnoflicas y coco bacilos inmóviles. Son anaerobios facultativos, que crecen mejor bajo condiciones microaeroflicas en una atmósfera de 10% de dióxido de carbono. El microorganismo fermenta azúcares, no requiere los factores X (hemina) o V (NADH), y es catalasa positivo.



Fig. 4 Colonias de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
En agar sangre.

Las colonias alcanzan un tamaño máximo de 1 mm después de dos a tres días a 37° C, son colonias translúcidas y no hemolíticas. La morfología de estas colonias puede variar de acuerdo al medio de inoculación, existen cepas que se cree poseen fimbrias que exhiben colonias de superficie rugosa con una forma estrellada que se adhieren firmemente al agar, mientras que las colonias que presentan componentes no fimbriales, como vesículas, material extracelular amorfo o extensiones fibrilares de la membrana, exhiben una morfología lisa y no adherente al agar. ^(20,26)

Ciertos serotipos de A.a y antígenos de los serotipos correspondientes se relacionan con sitios específicos de la infección: se identifican tres serotipos de este microorganismo. Los antígenos del serotipo de alto peso molecular, estable al calor. En la cavidad bucal los serotipos más frecuentes son los serotipos a y b, ya que el serotipo c integra sólo aproximadamente el 10% de las colonias de A.a.

3.3.1.2 Aspecto Clínico

El *A.actinomycetemcomitans* es un habitante en la mucosa oral humana. Se ha aislado en un gran número de muestras de placa subgingival y se le considera como un importante patógeno en la parodontitis del adulto, en algunos casos en la parodontitis refractaria y en la parodontitis de rápida progresión, pero más específicamente está relacionado en la etiología de la parodontitis juvenil localizada.⁽¹⁹⁾ Los patógenos parodontales como este microorganismo, son en verdad perjudiciales en el ser humano, ya que causan enfermedades en sitios extrabucales como resultado de la extensión directa o diseminación por vía sanguínea a partir de la cavidad bucal, por lo que este germen también puede causar abscesos de la glándula tiroides, infección del conducto urinario, abscesos cerebrales, osteomielitis vertebral, y otras infecciones, por lo general 19% de los casos referidos de infección extrabucal en seres humanos tienen pronóstico de muerte.

Se sabe que A.a tiene la capacidad de unirse a células epiteliales,⁽²¹⁾ fibroblastos gingivales,⁽²³⁾ Hidroxiapatita del esmalte,⁽²⁰⁾ y a componentes salivares.⁽²⁴⁾

Aunque aún no están bien establecidos los mecanismos de adhesión e invasión a estas estructuras se han realizado numerosas investigaciones para definir la actividad patogénica de la bacteria.

Los estudios serológicos y de la implantación, señalan que A.a puede transmitirse entre los miembros de la familia, sin embargo, no parece ser de fácil transmisión, es decir esta enfermedad no es "contagiosa".

El microorganismo produce muchos factores de virulencia que pueden estar relacionados con la patogénesis de la parodontitis. Estos se clasifican como factores que ayudan a la colonización de la placa dental o del surco gingival, o de ambos por ejemplo cápsulas bacterianas y fimbrias, que permiten evadir los

mecanismos de defensa del huésped, tales como una leucotoxina que puede destruir los leucocitos poliformonucleares y un componente que inhibe la quimiotaxis de estos leucocitos al sitio de la infección, y factores que pueden causar destrucción hística, entre ellos las endotoxinas lipopolisacáridas que estimulan la resorción ósea, una colagenasa que degrada el tejido conectivo gingival y un factor que evita la cicatrización.

Entre los factores de adherencia del germen están las cápsulas bacterianas y fimbrias. Un factor adicional de virulencia es el lipopolisacárido del *A.actinomycetemcomitans*, contiene carbohidratos, lípidos A, ácidos grasos C14 y β -OH C14, y cetodeoxioctonato (Lino y Hopps,1984).

La presencia de vesículas extracelulares (ExVes): brotes de las vesículas membranales, que son extrusiones de la membrana externa pueden funcionar en la adherencia de A.a. como sucede con otras especies gram-negativas (*Porphyromonas gingivalis*)^(22,25)

Existen cepas de A.a. asociadas con material extracelular amorfo (ExAmMat) que se adhieren mejor a células epiteliales que aquellas que no presentan este material. Sin embargo ExAmMat es capaz de interactuar con otras cepas de A.a. y proporcionar su adherencia.

Se cree que la invasión de A.a a células epiteliales se lleva a cabo por endocitosis aunque esta idea no esta clara aún. Se ha reportado que A.a entra a las células eucariotas mediante el sistema endosoma, pero, mas tarde se encuentra libre en el citoplasma celular⁽²⁴⁾ por lo tanto se supone que A.a es resistente a los efectos letales del endosoma. Investigaciones realizadas en donde se inhibe la acidificación del endosoma no se aprecia cambio en la invasión de A.a a células epiteliales proponiéndose así que A.a es capaz de inhibir la acidificación endosomal o bien requiere de la misma para librarse de la vacuola endocítica⁽²⁶⁾

3.3.2 Bacteroides negro-pigmentados

Otros miembros del género, en especial los bacteroides negro-pigmentados, son residentes importantes en la cavidad bucal de seres humanos, donde habitan muchos sitios bucales distantes, entre ellos: tonsilas, saliva, lengua y mucosa bucal.

La especies *Bacteroides* negro-pigmentadas fueron descritas por primera vez por Oliver y Werry (1921) como *Bacterium melaninogenicum*, que son bacilos gramnegativos anaerobios, sin movimiento, que producen colonias café a negro-pigmentadas cuando crecen en un medio que contiene elementos sanguíneos, al principio se les dividió en grupos de gran, poca o ninguna fermentación de azúcar, debido a las diferencias importantes de contenido guanina-citosina (G+C) entre los grupos.

3.3.3. Bacteroides Gingivales

B.gingivalis aparece a menudo y en cifras altas, por lo regular como componentes principal de la flora subgingival en las lesiones por parodontitis del adulto y se encuentra en la flora subgingival de mas del 90% de los pacientes que la padecen.

B.gingivalis, coloniza la saliva y la mayor parte de la superficie de la mucosa bucal, y dicho microorganismo puede, producir muchos factores de virulencia potencial. Estos factores destructivos, incluyen, colagenasa, con potente actividad proteolítica, una actividad "parecida a la tripsina", toxinas celulares y un lipopolisacárido que inhibe *in vitro* la formación ósea; esté último también es un gran estimulador de producción de interleucina 1 IL-1 a cargo de monocitos, los cuales es probable que participan en la resorción ósea mediada por osteoclastos ⁽³⁸⁾.

3.3.4 *Bacteriodes intermedius*

B.intermedius, es el microorganismo subgingival dominante en la gingivitis ulcero necrosante aguda (GUNA), donde constituye un 20% de la flora. Es heterogéneo, comprende dos grupos de homología de DNA y tres serogrupos (Nakazzawa y col, 1988).

Son bacterias que solo proliferan en ausencia de oxígeno, por lo cual se le llama anaerobio obligado, usando sulfato o nitrato como aceptor de electrones. Tienen forma de bastones y filamentos. Sin embargo, estas generan energía por el proceso de fermentación, que produce una diversidad de productos de desecho como alcoholes o ácidos orgánicos. ⁽³⁸⁻³⁹⁾

3.4 LIPOPOLISACARIDOS

Los Lipopolisacáridos (LPS) son los componentes principales de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, como la *Escherichia coli*, que es un anaerobio facultativo constituido por tres antígenos : el antígeno O de pared celular, el antígeno H o flagelar y el antígeno K o capsular. *Escherichia coli* produce dos enterotoxinas, la toxina CT de peso molecular alto y termolábil, actúa estimulando la adenilatociclasa, y la enterotoxina ST, de peso molecular bajo, termoestable, que estimula a la guanilatociclasa. ⁽⁴⁰⁾.

Los LPS son endotoxinas y las enzimas que catalizan la producción de LPS son codificadas por genes del cromosoma bacteriano, en tanto que el DNA de plásmidos y bacteriófagos codifican por lo general a las exotoxinas. Las endotoxinas tienen baja toxicidad en comparación con la exotoxinas, es decir antígenos débiles, inducen tan escasos anticuerpos que pueden producir episodios múltiples de toxicidad, por lo que todas las endotoxinas producen los mismos efectos generales de fiebre y choque (Tabla I).

Tabla I

Los Efectos biológicos de las endotoxinas son:

- 1.- Fiebre debido a que los macrófagos liberan pirógeno endógeno (IL-1), que actúa sobre el centro hipotalámico regulador de la temperatura.
- 2.- Hipotensión, choque y trastornos del riego a órganos esenciales debido a vasodilatación y reducción de la resistencia periférica inducidas por bradicina.
- 3.- Coagulación intravascular diseminada debido a la activación del sistema de la coagulación a través del factor de Hageman (factor XII).
- 4.- Activación de la vía alternativa de la cascada del complemento, que produce daño tisular.
- 5.- Neutropenia causada por secuestro de neutrófilos en capilares pulmonares y de otros órganos.

Ernest Jawets, Microbiología e Inmunología.

En la estructura de los LPS, la porción tóxica de la molécula es el lípido A, que se conforma de un disacárido y varios ácidos grasos. El centro del polisacárido sobresale de la superficie bacteriana y la unidad repetida de azúcares en el extremo, o también llamado antígeno "O" ó somático, se compone de 3, 4 ó 5 azúcares repetidos hasta 25 veces.(C)

Los LPS desempeñan un papel importante en la enfermedad parodontal, en la mitogénesis de fibroblastos gingivales humanos, en la inducción de la expresión de proto-oncogenes, en la activación del complemento por la vía alternativa, en la activación de macrófagos y en la estimulación de linfocitos B.

Se ha establecido que después de la detección de la enfermedad parodontal, el cemento contribuye a la reparación del daño con el auxilio de células y mediadores químicos que permiten la formación del cemento nuevo, y la asociación del tejido conectivo. Este proceso, sin embargo, exige la participación activa de los componentes de la matriz extracelular.

3.4.1 Estructura de lipopolisacáridos.

Los lipopolisacáridos varían de acuerdo a la longitud de la cadena de ácido graso en tres grupos: cadenas de ácidos grasos de longitud media (14C) LPS similar a *E. coli*; LPS con una longitud de ácido graso grande (17C) como los de *Bacteriodes fragilis*; finalmente con cadenas de ácido graso de longitud de (12-13C) similar a *Pseudomonas aeruginosa*.

LPS 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.

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 están relacionados con los de Bacteroides.

Otra bacteria oral que tiene LPS con cadenas de ácido graso menores a las determinadas en enterobacterias como *Eikenella corrodens* que tiene un LPS con 3-hidroxi-ácido dodecanoico y ácido dodecanoico. *Centipeda periodontia*, *Selenomonas sputigena* y *Veillonella spp* tienen LPS que contienen 3-hidroxi-ácido tridecanoico y el carbono 13, de ácido graso no hidroxilado. () Todos 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 LPS, pero hasta el momento no se ha determinado con convicción la presencia de LPS en estos microorganismos.

3.5 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Quizá se podría afirmar que uno de los factores que participan de modo más activo en la salud parodontal es la capacidad de comunicación celular, para lo que la naturaleza ha diseñado un complejo mecanismo que permite la remisión de señales entre células contiguas y en ocasiones entre células distantes. Las células se comunican unas con otras a través de mensajeros químicos. Dentro de un tejido determinado, algunas sustancias químicas se mueven de una célula a otra a través de uniones de hendiduras o de resquicio, sin que pasen al líquido extracelular.

Estas señales de comunicación han sido clasificadas en tres grupos esenciales.

1) Comunicación Autócrina: las células liberan factores que actúan sobre la misma célula que los sintetizó. Las células secretan mensajeros químicos que se fijan a los receptores de la misma. Abarcan Factores de Crecimiento cuya función es inducir un cambio biológico en la célula donde se originó la señal.

2) Comunicación Endócrina: producen su efecto en sitios alejados de aquel en el que fueron sintetizadas y en la cuál, las hormonas llegan a las células por medio de la sangre circulante.

3) Comunicación Parácrina: en la cual los productos de las células se difunden en el líquido extracelular y ejerce su efecto sobre células adyacentes. Un ejemplo de este mecanismo de comunicación se presenta en el sistema nervioso.

En la actualidad se define una forma adicional de comunicación intercelular llamada comunicación Yuxtácrina, algunas células expresan múltiples repeticiones de factores de crecimiento, como el Factor Transformador del Crecimiento Alfa ($TGF\alpha$ Transforming growth factor alpha), y lo presentan en

posición extracelular sobre las proteínas que atraviesan la membrana, que le dan fijación con relación a la célula.

El proceso de transmisión de la señal se realiza de una serie de pasos específicos, el primero de los cuales se inicia en la superficie membranal de la célula blanco, que es la destinataria del mensaje, y que lo captura mediante un conjunto de receptores de naturaleza proteica que son sintetizados en el interior de la propia célula. El siguiente paso se efectúa cuando el receptor transfiere la señal externa al entorno celular a través de una serie de cambios químicos que se reflejan de manera instantánea, en la conducta celular recibe el nombre de segundo mensajero, del que existen diversos tipos, entre los que se encuentran el AMPc, la proteína Kinasa C, Ca^{2++} , tirosín cinasas como MAP, MEK y ERK. Todos los segundos mensajeros participan en la fosforilación de diferentes proteínas celulares y estas rutas de síntesis de los mensajeros reciben el nombre de Sistemas de Transducción de la Señal Hormonal ⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾.

En células sensibles a hormonas, en neuronas, en células musculares, el Ca^{2++} actúa como un segundo mensajero que desencadena, respuestas intracelulares. Entre los procesos iniciados por el Ca^{2+} se hallan la exocitosis en las células nerviosas y endocrinas y la contracción en el músculo.

La concentración de Ca^{2++} Citosólica se mantiene normalmente a niveles muy bajos ($<10^{-7}$ M) por acción de bombas de Ca^{2++} situadas en el retículo endoplasmático, en la mitocondria y en la membrana plasmática, gran parte del Ca^{2++} intracelular es fijado por las mitocondrias y el retículo endoplásmico (figura 5), y estos organelos ofrecen Ca^{2++} para incrementar la concentración libre del mismo en el citoplasma. Estímulos hormonales, nerviosos o de otro tipo producen la entrada de Ca^{2++} en las células a través de canales Ca^{2+} específicos en la membrana plasmática o la liberación de Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplasmático o en la mitocondria, aumentando la $[Ca^{2++}]$ citosólica y desencadenando una respuesta celular.

3.5.1 Transducción de señales asociadas a LPS

La naturaleza de la interacción entre LPS y sus células blanco ha sido materia de mucha especulación. En un principio se pensó que el amplio espectro de actividades del LPS, se debió a su estructura anfipática, por lo que se sugirió que el LPS actuaba inespecíficamente vía la interacción hidrofóbica del lípido A con los lípidos de membrana celulares blanco. Sin embargo, la activación selectiva por LPS de linfocitos T, la existencia de varias líneas de ratones que presentaban respuestas inmunológicas y fisiológicas disminuidas a LPS, la existencia de mutantes y la identificación de antagonistas a la bioactividad de la endotoxina⁽⁴⁹⁾, sugirieron la presencia de un receptor o receptores de membrana específicos para el lípido A del LPS.

Los lipopolisacáridos interactúan con las células huésped a través de diferentes proteínas receptoras de la superficie celular entre las que se encuentran la proteína CD-14 y los receptores scavenger, de estos últimos se han caracterizado los tipo I y tipo II y consisten de seis dominios transmembranales. La asociación es favorecida por la proteína de asociación a lipopolisacáridos (LBP). El descubrimiento de esta proteína plasmática (1986) LBP (lipopolysaccharide binding protein), fue el evento más importante para descifrar los mecanismos de activación celular inducidos por LPS. La proteína LBP es una glucoproteína sérica de 60-kDa, presente en el suero normal a concentraciones menores a 0.5 μg/ml, y que se eleva hasta 50 μg/ml después de una respuesta de fase aguda. LBP es sintetizada en los hepatocitos como un polipéptido sencillo de 50-kDa y luego es liberada en plasma como la forma glucosilada de 60-kDa⁽⁵¹⁾.

Se sugiere que la síntesis de LPB por los hepatocitos es controlada por LPS, IL-1, TNF, IL-6 y glucocorticoides y el pretratamiento con LPS predispone a los hepatocitos a responder a LPS, TNF e IL-1 para la síntesis de LPB.

La unión específica de la LPB se da a través del lípido A. Se han sugerido dos funciones para LB, opsonización de partículas unidas a LPS y aumento de la sensibilidad de leucocitos en la que Lps funciona como opsonina al unirse a

bacterias gram-negativas o a eritrocitos cubiertos por LPS⁽⁵²⁾. El LBP puede tener importancia en la movilización de defensas del huésped para combatir infecciones por gram-negativos. En los neutrófilos, la LBP participa en la producción del anión superóxido inducido por ésteres de forbol⁽⁵³⁾. Los complejos LBP-LPS son mil veces más activos que el LPS por sí solo en la inducción de TNF y de IL β .

Al entrar el LPS a la circulación, la proteína LBP se le une rápidamente, y los complejos LPS-LBP resultantes son reconocidos por el receptor CD14 de células mononucleares. Éste, unido al complejo, puede activar la síntesis de TNF en las células ya sea de manera directa o indirecta, transportando al LPS a la superficie celular, de manera que otras proteínas son estimuladas.

El camino completo de señales inducidas por LPS que resulta en la activación de la expresión y secreción de citocinas aún no está completamente caracterizado. Weinstein y colaboradores⁽⁵⁴⁾, encontraron que el LPS induce fosforilación de tirosinas de una proteína de 74-kDa que es estrictamente dependiente de CD14. Entre las señales de transducción inicial se ha detectado la activación de tirosín cinasas, lo que conduce a la liberación del factor de necrosis tumoral tipo alfa (12-14- 481). Se ha observado así mismo que al inhibir la vía de tirosín cinasas se bloquea el shock endotóxico en ratones.⁽³³⁾ Entre los intermediarios en la activación de la tirosín cinasas se ha encontrado que participan las proteínas adaptadoras Shc, que están involucradas en la señal de la proteína Ras⁽³⁴⁾, y el protooncogene Vav⁽³⁵⁾, la fosfatasa de inositol⁽³⁴⁾ y las tres clases mayoritarias de MAP cinasa⁽³⁶⁻³⁷⁾. Se ha demostrado de igual manera que los lipopolisacáridos activan la vía de la PI3-cinasa lo que conduce a la activación de óxido nítrico.⁽⁵⁷⁻⁴⁸¹⁾

Se demostrado que ceramida participa en las acciones de los lipopolisacárido en diversas células, la producción de ceramida puede activar la vía de transducción de fosfoinosítidos-calcio.⁽⁵⁰⁵⁾ La activación de estos segundos mensajeros

conduce a procesos de respuesta celular que desencadenan eventos como los procesos inflamatorios.

Pero no solamente los lipopolisacáridos derivados de las bacterias gram negativas participan en los eventos de inflamación de los tejidos gingivales. Algunas otras moléculas producidas en los tejidos gingivales participan en los fenómenos de inflamación como la histamina y la bradiquinina, mensajeros a los que los fibroblastos gingivales humanos responden.

3.6 Vías de Transducción para LPS.

El tratamiento con LPS de un tipo celular definido causa tres cambios principales en el núcleo:

1) Hay un cambio rápido en la sensibilidad de la región de unión a la DNasa I, lo que sugiere que se está abriendo la configuración de la cromatina del gen determinado.

2) Aumentan dos factores nucleares: NF κ B que se une al sitio E κ B en la región promotora intrónica, y OTF-2, que se une a un octámetro en la región promotora.

El siguiente paso en la cascada de transducción de señales inducidas por LPS es la activación de NF κ B, factor de transcripción que se encuentra en citoplasma formando un complejo inactivo unido a la proteína inhibidora I κ B. Una de las cinasas que fosforila directamente a I κ B es la PKC. Cuando I κ B es fosforilada, NF κ B se disocia y se transloca al núcleo en una forma activa que se une al DNA, permitiendo la transcripción génica y la síntesis de TNF- α y de IL-1 β .

Otro camino intracelular de señales activado por el Lps es el MAP cinasa (*mitogen activated protein kinase pathway*). La MAP es una proteína asociada a los microtúbulos del citoesqueleto, y a través de ella, el LPS podría afectar la fisiología celular al perturbar el sistema de cinasas y fosfatasa asociadas con el citoesqueleto, un organelo que tiene efectos profundos sobre

transcripción génica, síntesis de proteínas, transporte intracelular, endocitosis, secreción y forma celular. Varios ligandos extracelulares, como el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento nervioso, ésteres de forbol e insulina pueden estimular el camino de la MAP cinasa. Entre los miembros de este camino está una familia de proteín-cinasa de serina/treonina de 40-45 kDa, llamada ERKs (*extracellularly regulated protein kinases*). Al menos tres diferentes miembros de las ERKs, ERK1, ERK2 y otra proteína de 38-kDa son activadas por la fosforilación de tirosinas en monocitos después de la estimulación con LPS⁽⁵⁵⁾.

3.7 AMINAS BIOGENAS Y QUININAS PLASMÁTICAS.

El término "*die biogenen amine*" fue introducido por Guggenheim(1951) refiriéndose a "bases orgánicas de bajo peso molecular que se desarrolla a consecuencia de procesos metabólicos en animales, plantas y microorganismos. Comprenden compuestos alifáticos, acilácidos y heterocíclicos simples, y aparecen en el metabolismo celular como productos intermediarios o catabólicos de importancia fisiológica diversa". El término "*biógena*" sugiere "*generador de vida*". Las principales aminas biógenas son productos descarboxilados de aminoácidos o sus derivados.

La histamina, fue sintetizada en 1907, y su actividad farmacológica se reconoció después de descubrirse, en 1910. Se detectó primeramente como estimulante uterino en extractos de cornezuelo de centeno, del cual se aisló, donde se producía por descarboxilación bacteriana de la histidina⁽⁵⁶⁾.

Aunque la histamina se había identificado químicamente en extractos de tejidos, se sospechaba que podía ser un producto de la putrefacción. Solo en 1927 Best, Dale, Dudley y Thorpe aislaron histamina de muestras impecablemente frescas de hígado y pulmón, estableciendo que esta

amina es un constituyente natural del organismo. Se demostró su presencia en diferentes tejidos y así surgió el nombre de histamina (griego *histos*, tejidos)⁽⁵⁷⁾.

Dentro de su actividad farmacológica, la histamina contrae muchos músculos lisos, como los bronquiales e intestinales, pero dilata vasos sanguíneos pequeños (arteriolas). Constituye un poderoso estimulante de la secreción de ácido por la mucosa gástrica e interviene como mediador humoral en muchos procesos patológicos.

Existen tres tipos de receptores de histamina conocidos H₁, H₂ y H₃; los tres se encuentran en los tejidos periféricos y el cerebro. Casi todos los receptores H₃ son presinápticos e intervienen en la inhibición de la secreción de histamina y de otros transmisores, mediante proteína G. Los receptores H₁ activan la Fosfolipasa C y los receptores H₂ aumentan el AMPcíclico intracelular.

El descubrimiento de las quininas plasmáticas tuvo su origen en el antifiujo observación de que la inyección intravenosa de orina disminuye la presión arterial. En las décadas de 1920 y 1930 Frey y col. Caracterizaron la sustancia hipotensiva y demostraron que un material similar podía obtenerse de la saliva, el plasma y diferentes tejidos. Como el páncreas era una fuente rica, llamaron a este material *Kallikréas*.⁽⁵⁷⁾

El interés en este campo de la investigación se intensificó cuando Rocha e Silva y col. (1949) anunciaron que los venenos de ciertas serpientes, así como la enzima tripsina, actuaban sobre la globulina plasmática produciendo una sustancia, probablemente un polipéptido, que también disminuía la presión arterial y causaba una contracción lenta del intestino. Debido a la respuesta lenta de éste denominaron a la sustancia *Bradiquinina*, término derivado de las palabras griegas *bradis* "lento", y *kinein*, "moverse".⁽⁵⁸⁾

Las quininas plasmáticas poseen un grado extraordinariamente elevado de actividad farmacológica. Son los autocoides vasodilatadores más potentes de Iso mamíferos, y en concentración muy baja aumentan la permeabilidad capilar,

producen edema, dolor y reflejos actuando sobre las terminaciones nerviosas, contraen o relajan diversos músculos lisos (directamente o mediante vías nerviosas cortas o largas) y provocan muchas otras respuestas⁽⁵⁹⁾

3.6 Transducción de Señales activadas por histamina y braquinina.

Histamina y bradiquinina son los mediadores de procesos inflamatorios más ampliamente estudiados. En procesos inflamatorios la histamina es liberada por mastocitos y leucocitos basofílicos y actúa así mismo como factor de crecimiento y quemoattractante⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾

Por su parte la bradiquinina es un mensajero de naturaleza proteica formado por nueve aminoácidos y participa en procesos vasodilatadores e incrementa la permeabilidad vascular y la proliferación celular.⁽⁴⁸⁾

Estos mensajeros promueven la liberación de prostaglandina E₂ en fibroblastos gingivales humanos^(4,5) la liberación de éste producto derivado del ácido araquidónico participa en el desarrollo de la enfermedad ya que promueve incrementos en la permeabilidad vascular, altera la función inmune y regula la proliferación celular, así como la síntesis de colágena y la diferenciación celular.
(7)

Estas hormonas presentan receptores en la superficie celular acoplados al sistema de fosfoinosítidos calcio vía la proteína acopladora Gq, lo que conduce a la activación de la enzima fosfolipasa C que hidroliza el fosfatidil inositol en inositol trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato moviliza el calcio de las reservas intracelulares y en conjunto con la proteína cinasa C activa a la proteína cinasa C.^(9,10)

En trabajos previos (Gloria Gutiérrez-Venegas, Martha Robles Flores y Javier Portilla-Robertson. Lipopolysaccharide induces the expression of atypical protein kinases C in human gingival fibroblasts in press.) encontramos que la proteína cinasa C induce la expresión de formas atípicas de la proteína cinasa C es por

4.- JUSTIFICACIÓN.

Durante el desarrollo de la enfermedad periodontal participan sin duda alguna procesos inflamatorios en los que colaboran un gran número de moléculas derivadas de la biopelícula subgingival y en específico por moléculas provenientes de bacterias gram negativas que presentan como componente externo mayoritario moléculas denominadas lipopolisacáridos conocidos también como endotoxinas.

En el complejo proceso de intermediarios moleculares se ha demostrado también que los lipopolisacáridos activan a los diferentes componentes del parodonto lo que conduce a la liberación de mediadores químicos que aceleran los procesos inflamatorios como el factor de necrosis tumoral, citocinas y algunos mensajeros como histamina y bradisinina.

El tratamiento de la enfermedad podrá mejorar en la medida en la que se conozca con certeza la participación de estos mediadores en los procesos inflamatorios y más aún en la medida en la que se determine la vía de transducción mediante la cual activan los procesos inflamatorios.

Es por este motivo que la presente investigación pretende determinar si estos agentes comparten vías de transducción o bien si sus efectos los realizan mediante vías alternas u opuestas.

5.- HIPÓTESIS.

7.1 HIPÓTESIS VERDADERA

- Si los fibroblastos gingivales humanos son tratados con Lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, entonces modulará las señales de transducción de hormonas que participan en regular los procesos inflamatorios ocasionados por estos agentes como la histamina y la bradiquinina.

7.2 HIPÓTESIS FALSA

- Si los fibroblastos gingivales humanos son tratados con los Lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, no participarán en la vía de transducción de hormonas protectoras de procesos inflamatorios.

6.- OBJETIVO

6.1 Objetivo General

El proyecto tiene la intención de analizar el efecto de los LPS, derivados de algunos microorganismos A.a (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), sobre la movilización de Ca^{2++} inducida por Bradicinina e Histamina por la vía de activación de proteína cinasa C en fibroblastos gingivales humanos.

6.1.1 Objetivos Específicos

- Se determinará la capacidad del LPS de A.a para adherirse a los fibroblastos gingivales humanos.
- Determinar la movilización de Ca^{2++} en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS, mediante la inducción por hormonas Histamina y Bradicinina.
- Se cuantificara la liberación de Ca^{2++} vía retículo endoplásmico que provoca la unión del LPS de A.a sobre los fibroblastos gingivales humanos, mediante el tratamiento de células con el fluoróforo FURA2/AM.

7.-MATERIALES Y MÉTODOS

Material y Equipo:

Reactivos:

Medio de cultivo celular Dulbecco modificado por Eagle (GIBCO).

Solución isotónica de Hanks (GIBCO).

Suero Bovino Fetal (GIBCO).

Antibiótico – Antimicótico (GIBCO).

Buffer de Fosfatos salino (Baker).

Fura 2-AM (SIGMA)

Trisma (SIGMA)

Cloruro de Magnesio (Baker)

Cloruro de Calcio (Baker)

Glucosa (Baker)

Sulfato de Magnesio (Baker)

Suero albúmina de bovino (SIGMA)

HEPES (SIGMA)

Bradiquinina (RBI)

Histamina (SIGMA)

Etilendiaminotetraácetio (EDTA) (SIGMA)

Suero Bovino Fetal (GIBCO)

Equipo

Incubadora CO₂

Estufa.

Baño de temperatura controlada.

Fluorosacan.

Potenciómetro.

Agitador.

Cajas Nunclon de 24 pozos.

7.1 Aislamiento y Caracterización de Bacterias.

Las cepas bacterianas usadas en este estudio fueron A.a aisladas de paciente con parodontitis juvenil activa. Se caracterizó mediante pruebas bioquímicas y tinción de Gram. El lipopolisacáridos se obtuvo mediante la extracción fenólica descrita por Westphal ⁽⁶⁰⁾

7.2 Cultivo Primario de Fibroblastos Gingivales Humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos, mediante un proceso de cultivo primario en el cual se tomaron muestras de tejido de encía y ligamento parodontal de diferentes pacientes que fueron sometidos a clurgías y extracciones quirúrgicas. Dichas muestras se colocaron en solución de Hanks. Mediante procesos de centrifugación y tripsinización se obtuvo un cultivo de fibroblastos libre de otro tipo de células. Estos cultivos se dejaron en medio DMEM, + 10% de SBF (Suero Bovino Fetal) y 1% antibiótico-antimicótico, se colocaron en cajas de pos con 2 mm del medio DMEM y se incubaron en atmósfera húmeda y en presencia de una mezcla de 95 % aire y 5% de CO_2 a 37° C. Los cultivos se alimentaron semanalmente y las células se utilizaron entre los pases 5-15 ⁽⁷¹⁾.

7.3 Determinación de Calcio intracelular.

Las células se crecieron en cajas de 48 pozos hasta subconfluencia. Las células se preincubaron con 2 μM FURA/2AM en DMEM por 30 min. a 37° C . Al término se lavaron en tres ocasiones con buffer de fosfatos salino. Después de que las células se cargaron con el indicador fluorescente (FURA2/AM,) las células se incubaron en Krebs-Ringer-HEPES buffer que contiene 120mM de NaCl, 5mM de KCl, 1mM de MgSO_4 , 0.96mM de NaH_2PO_4 , 0.2 % de glucosa, 0.1% de Suero Albúmina Bovina, 1mM de CaCl_2 , 20mM de HEPES buffer (pH 7.4). El cultivo se trató con diferentes dosis de las hormonas Bradiquinina e Histamina o lipopolisacárido.

La flouescencia de las células marcadas con FURA2/AM fue medida con Flouroscan a 340 nm de longitud de onda en excitación y a 510 nm de longitud de onda en emisión. La lectura en Flouroscan se hizo a diferentes tiempos ⁽⁷⁴⁾ . Los niveles de flouescencia se estimaron con la ecuación: $F = (F - F_{\text{min}} / F_{\text{max}} - F) * 100$, F_{max} (flouescencia máxima), se estimó a agregar al cultivo celular tritón al 10% F_{min} (Flouescencia mínima) se determinó con el quelante EDTA 1mM. El ensayo se realizó en cinco ocasiones por triplicado, los resultados representan la media para cada condición \pm error standard. Para la comparación de los intervalos de confianza entre medias se realizó el análisis ANOVA de significancia.

8. Resultados.

Concentración intracelular de calcio en fibroblastos gingivales humanos:

La histamina y la bradiquinina son los moduladores químicos que han sido estudiados extensivamente como mediadores de procesos inflamatorios. La histamina es liberada por mastocitos y leucocitos y en ocasiones actúa como un factor de crecimiento y quimio-atractivo. La bradiquinina es un péptido formado por nueve aminoácidos, presenta varias acciones farmacológicas entre las que se encuentran efectos vasodilatadores, aumento en la permeabilidad vascular, dolor y proliferación celular. ⁽⁵⁹⁾

Algunas investigaciones señalan que estas hormonas promueven la liberación de prostaglandina E₂ en fibroblastos gingivales humanos⁽⁶⁰⁾ La producción de PGE₂ participa de manera importante en los procesos inflamatorios, se detecta en el fluido crevicular especialmente en sitios periodontales en donde se ha producido una pérdida de ligamento parodontal así mismo la PGE₂ incrementa la permeabilidad vascular, altera la función inmune y regula la proliferación, síntesis de colágena y la diferenciación celular de fibroblastos gingivales humanos.

Estas células presentan receptores a histamina y bradiquinina acoplados a la vía de fosfoinosítidos-calcio lo que conduce a incrementar la concentración de calcio intracelular y este calcio es esencial para la liberación de PGE₂ ⁽⁶¹⁾

Con la finalidad de caracterizar los efectos de los lipopolisacáridos sobre la movilización de calcio intracelular, se utilizó el compuesto FURA-2AM, nuestros datos sugieren que los fibroblastos gingivales humanos presentan una concentración intracelular de calcio de 95 ± 7 nM.

Efecto de bradiquinina sobre la movilización de calcio.

Los fibroblastos gingivales humanos movilizan calcio del retículo en respuesta a bradiquinina (1 μ M) el incremento en la concentración de calcio se presenta de forma rápida y transitoria. (Figura 6).

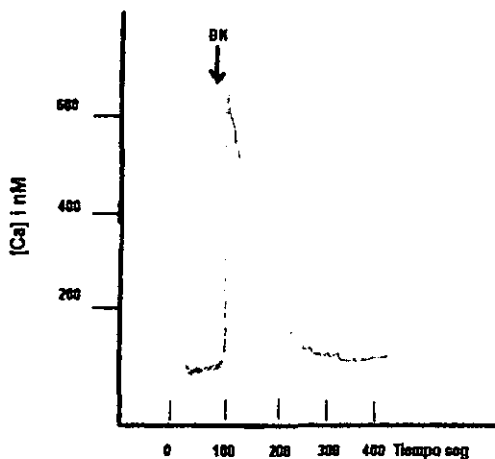


Fig. 6 Efecto de bradiquinina ($1\mu M$) sobre la movilización intracelular de calcio en fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos se cargaron con FURA-2AM y se expusieron a bradiquinina durante 3 min.

El incremento en la concentración de calcio inducido por esta hormona produce un aumento de 6 veces sobre la actividad basal.

Efecto de la histamina sobre la movilización de calcio en fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos se trataron con histamina ($100\mu M$) durante 3 minutos el incremento en la movilización de calcio fue inmediato y transitorio. La estimulación inducida por esta hormona fue de 4 veces sobre la concentración basal del calcio en el citoplasma de las células. (Fig. 7)

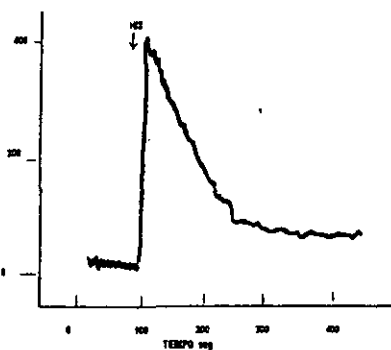


Fig. 7 Efecto de la histamina sobre la movilización de calcio en fibroblastos gingivales humanos.

Las células se cargaron con FURA-2AM y se incubaron durante 3 minutos con histamina $100\mu M$

Efecto de los lipopolisacáridos sobre la movilización de calcio estimulada por bradiquinina e histamina.

En la figura 8-A se muestra la movilización de calcio por bradiquinina que produjo un aumento de 5 veces sobre la actividad basal en un tratamiento durante 3 minutos. En la misma figura se muestra que la adición de lipopolisacáridos (50 ng/ml) promueve una disminución en el basal de calcio y la adición de bradiquinina (1 μ M) produce un discreto aumento de solo dos veces sobre la actividad basal.

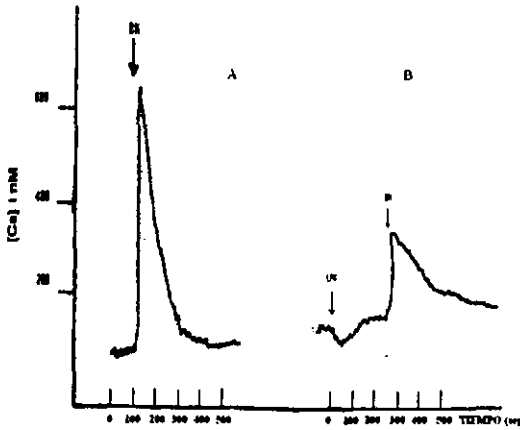


Fig. 8 Efecto de bradiquinina y lipopolisacáridos sobre la movilización de calcio.
A) Se trataron las células con bradiquinina (1 μ M) y en otra condición se trataron con lipopolisacáridos (50 ng/ml) y bradiquinina (1 ng/ml)

En la figura 9 se muestran los efectos de histamina sobre la movilización de calcio y el efecto de los lipopolisacáridos sobre las acciones de histamina, nuestros datos señalan que los lipopolisacáridos regulan la respuesta a histamina. (Fig. 9-B)

Nuestros resultados muestran que a las dosis utilizadas el tratamiento con lipopolisacáridos (50 ng / ml) induce una disminución en un 50 % de la movilización de calcio en fibroblastos gingivales humanos.

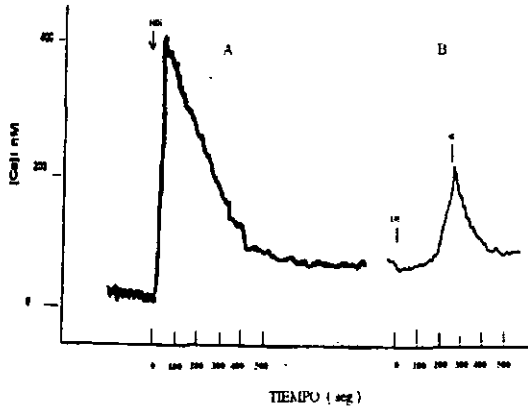


Fig. 9 Efecto de los lipopolisacáridos sobre la movilización intracelular de calcio inducida por histamina en fibroblastos gingivales humanos. Los fibroblastos gingivales humanos se cargaron con FURA-2AM y posteriormente se trataron con histamina ($100 \mu M$) durante 3 minutos (A) y así mismo las células se trataron con lipopolisacárido (50 ng/ml) y posteriormente se trataron con histamina ($100 \mu M$)

Atenuación de la respuesta a histamina y bradiquinina en fibroblastos gingivales humanos pretratados con lipopolisacárido.

En la figura 10 se resume el efecto de diferentes dosis de lipopolisacáridos sobre la movilización de calcio inducida por histamina ($100 \mu M$) y bradiquinina ($1 \mu M$).

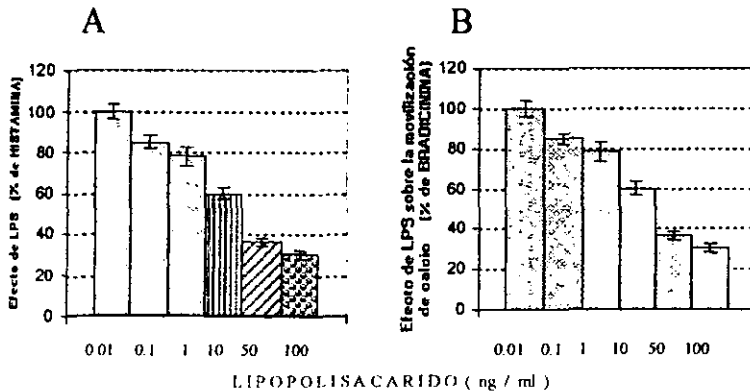


Fig.10 Dosis respuesta al tratamiento con lipopolisacáridos en la movilización de calcio estimulada por Histamina ($1 \mu M$) e Histamina ($100 \mu M$). Los fibroblastos gingivales humanos se cargaron con FURA-2AM con varias concentraciones de lipopolisacárido por 3 min. y se estimularon con $100 \mu M$ de histamina y $1 \mu M$ de bradiquinina.

9. Discusión.

En trabajos realizados previamente se demostró que la bradiquinina e histamina causan un incremento en la concentración intracelular de calcio de manera inmediata y transitoria en fibroblastos gingivales humanos.

Otros autores en trabajos posteriores utilizando el mismo sistema demostraron que bradiquinina disminuye la respuesta a histamina a través de desensibilización heteróloga.⁽⁶³⁾

Como he mencionado en líneas anteriores estas hormonas juegan un papel relevante en procesos de vasodilatación, participan en incrementar la permeabilidad vascular y promover la proliferación celular.^(60,61)

Durante los procesos inflamatorios en el fluido extracelular se concentran un gran número de moléculas activas biológicamente por mencionar algunos de estos componentes se encuentran los factores de crecimiento, hormonas, metabolitos, enzimas digestivas y lipopolisacáridos.

Estas últimas son productos bacterianos que reciben también la denominación de endotoxinas, por su naturaleza química pueden atravesar las membranas de la encía y actuar sobre diferentes tipos celulares y promover una gran infinidad de acciones fisiológicas.

En fibroblastos gingivales humanos se ha reportado con anterioridad que los lipopolisacáridos disminuyen la proliferación celular y promueven la expresión de genes como el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento transformante (TGF) e interleucinas (IL-1 β).

En esta investigación estudiamos los efectos de los lipopolisacáridos sobre la regulación de la vía de transducción de histamina y bradiquinina, el interés por determinar si los lipopolisacáridos modulan la acción de estas hormonas se debe a que estos agentes actúan de manera específica y ejerciendo efectos antagónicos en fibroblastos gingivales humanos.

Nuestros datos señalan que los lipopolisacáridos regulan la vía de transducción de histamina y bradiginina a nivel de la movilización intracelular de calcio.

Estos hallazgos son de suma importancia porque para que estas hormonas realicen sus funciones fisiológicas requieren de la producción de diacilglicerol e inositol trifosfato estos segundos mensajeros se sintetizan en respuesta a la activación de la fosfolipasa C mediada por un proteína Gq. La síntesis de inositol trifosfato promueve la movilización de calcio del retículo endoplasmático y es precisamente la movilización de calcio junto con el diacilglicerol los responsables de activar al último mensajero de esta vía de transducción que es la proteína cinasa C, desde hace ya algunos años se demostró que esta enzima cuya función es la fosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina promueve la activación de un gran número de respuestas celulares entre las que se cuentan regulación de síntesis de DNA y expresión génica.

Es por este motivo que si la vía fosfoinosítidos-calcio es bloqueada a nivel de movilización de calcio, efecto ocasionado propiamente por los lipopolisacáridos, entonces no se realiza la activación de la proteína cinasa C y por tanto no obstruye la respuesta fisiológica promovida por la histamina y bradiquinina.

Por último queremos señalar que es necesario realizar un mayor número de estudios que nos permitan dilucidar el mecanismo a través del cual los lipopolisacáridos realizan la inhibición en la movilización de calcio.

10. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir:

1. Los fibroblastos gingivales humanos promueven la movilización de calcio intracelular en respuesta al tratamiento con bradiquinina e histamina.
2. Los lipopolisacáridos promueven una disminución en la concentración basal de esta hormona.
3. Se determinó que los lipopolisacáridos inhiben la movilización de calcio promovida por dos hormonas que gran relevancia en el proceso de defensa del organismo contra la enfermedad periodontal como histamina y bradiquinina.

11. Referencias Bibliográficas.

1. Genco, R. J. Periodoncia Ed. Interamericana (1990)
2. Ainamoj. And Loe H. (1966) Anatomical characteristics of gingival.I.A clinical and microscopia study of the free and attached gingiva. J.Periodontal 37:5
3. Shuttleworth, C.A, and malley J.W. (1983) periodontal ligament int. Rev.Connec Tiss. Res 10:211-247
4. Embery,G (1990). An update on the biochemistry of the periodontal ligament. Eurl J. Of Orthodont 12:77-80.
5. Ferranova,V.P.Martin,G.R. (1982) Molecular Factor determining gingival tissue interaction with tooth structure, J.Periodont Res 17: 530-533.
6. Knox, B., Auknill,I. (1988) Ultrastructural study of experimental cementum regeneration in rats. J. Periodont Res 23: 60-67.
7. Skakti,P. (1986) Chondrogenic potential of mesenchymal cell elicited by bone matrix in vitro. Differentiación 32:353-359.
8. Arzate, H., Olson,S.W., Page,R.C.,Allen,M.G, and Navayanan,S. (1992) FASE BJ. 6:2990-2995.
9. Yohemura,K., Raines,E.W.,Ahn,N.G and Navayanan,s. (1993) Mitogenic Signaling mechanism of human cemento-derived growth factor. J.Biol Chem 268:26120-26126.
- 10.Genco RJ. Zambon JJ,and Christersson LA. (1988) The origin of periodontal infections, ADV. Dent. Res 2:364.
- 11.Christersson L.A. (1987a) Tissue localization of A.a. in human periodontitis. I lighth immunofluorescence and electron microscopic studies. J. Periodontol 58: 529,
- 12.American Academy of periodontology: current procedural terminology for periodontics, Ed 5, 1986.
- 13.Christersson L.A. (1987b) Tissue localization of A.a in human periodontitis. II. J.Periodontol 58:540.
- 14.Horman J and Frandsen A. (1979) Juvenile periodontitis localization of bone loss in relation to age, sex, and teeth. J Clin Periodontol 6:407.
- 15.Lindhe J. (1982) Treatment of localized juvenile periodontitis. In Mergenhausen SE and Genco RJ editors: Host-paraste interactions in periodontal diseases, Washington, DC, ASM publications.
- 16.Van Dyke T.E. (1985) Neutrophil chemotaxis in families with localized juvenile periodontitis, J perodontol Res 20:503.
- 17.Haffajee A.P. (1988) Clinical and microbiologic features of subjects with refractory periodontal diseases, J. Clin Periodontl 15:390.
- 18.Zambon, J.J., et al. (1988). *Actinobacillus actinomyce temcomitans* in the pathogenesis of human periorontoal disease. Adv Dent Res2(2):269.274.

19. Slots, J. (1982) J. Clin. Microbiol. 15:606-616.
20. Zambon, J.J. (1985) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 12:1-15.
21. Meyer, D.H., and Fives-Taylor P.M. (1993) Characteristics of Adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to Epithelial Cells. Infect Immun 62(3):928-935.
22. Kagermeier, A.S., and London, J. (1985) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27 adhere to hydroxyapatite by distinctive mechanisms. Infect Immun 47:654-658.
23. Nowotny, Et al. (1982) Release of toxic microvesicles of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect immun 37:151-154.
24. Stevens, R.H., Gatewood, C., Hammond, B.F. (1983) Cytotoxicity of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* extracts in human gingival fibroblasts. Archs Oral Biol 28(11):981-987.
25. Mintz, K.P., and Fives-Taylor, P.M. (1994) Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a human oral cell line. Infect Immun. 62:3672-3678.
26. Meyer, D.H., Fives-Taylor, P. M. (1993) Evidence that extracellular components function in adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. Infect IMMUN. 61(11):4933-4936.
27. Sreenivasa, P.K., Meyer, D.H., and Fives-Taylor, P.M. (1993) Requirements for invasion of Epithelial Cells By *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun. 61(4):1239-1245.
28. Somerman, M.J., et al. (1988) A comparative study of human periodontal ligament cell and gingival fibroblast *in vitro*. J. Dent Res. 67:66-70.
29. Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y.A. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260:3440-2450.
30. Page, R.C., y cols. (1983) Prepuberal Periodontitis. I Definition of a clinical entity. J. Periodontol 54: 257-271.
31. Page, R.C., y cols. (1983) Rapidly progressive periodontitis: A distinct clinical condition. J. Periodontol 54:197-209.
32. Beaty CD, Franklin TI, Vechera y Wilson CB. (1994) Lipopolisaccharides-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. Eur J. Immunol 24:1278-1284.
33. Shapiaral, Takashiba S, Champagne C, AMARS, Van Dyke TE. (1994) Involvement of protein Kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolisaccharides induced TNF α and IL-1 β production by human monocytes. J. Immunol 153: 1818-1824.
34. Novogrodsky A, Vanichkin A, Patya M, Gazit A, Osherov N, Levitzki A. (1994) Prevention of LPS induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. Science 264:1319-1322.

35. Crowley MT, Harmer SL, De Franco AL. (1996) Activation induced association of a 145 kDa tyrosine-phosphorylated protein with shc and syk in B lymphocytes and macrophages. *J. Biol Chem* 271:1145-1152.
36. Gen Y, Gulbins E, Attman A., Lotz M. (1994) Monocyte the activation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the ras signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8602-8606.
37. Weinstein SL, Sanghera JS, Lemke, DeFranco AL, Delech SL. (1992) Bacterial lipopolisaccharide induced tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J. Biol Chem* 267:14955-14962.
38. Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, DeFranco AL. (1996) Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolisaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2774-2778.
39. Philip, M.H., Pawlak, E.A. *Fundamentos de periodoncia. España 1992 4ª Edición. Editorial Mosby.*
40. Page, R.C., and Schroeder, H. (1976) Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. *Lab Invest* 33:235-241.
41. Zambon, J.J. (1985) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin Periodontol* 12:1-20.
42. Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 361:315-325.
43. Bulkacz, J. (1988) Enzymatic activities in gingival fluid with special emphasis on phospholipases. *Periodont.* 36:145-153.
44. Cho, M., Garant P., Lee, Y. (1988) Periodontal ligament fibroblast, preosteoblast and prechondrocytes express receptors for epidermal growth factor in vivo. *J. Periodont Res.* 23:287-297.
45. Cho, MI and Ramakrishnan PR. (1995) Identification of platelet-derived growth factor receptors on periodontal ligament cells. *J. Dent Res.* 71:176.
46. Mc. Allister, BS, Leeb-Lundberg, F., Javors, MA and Olson MS. (1993) Bradykinin receptors and signal transduction pathways in human gingival fibroblast: integral role for extracellular calcium. *Arch. Biochem. Biophys.* 304:249-301.
47. Johnson, C. L., Johnson C. G., Bazan, E. Graver, D., Gruenstein, E, Ahluwalia, M. (1990) Histamine receptors in human fibroblast inositol phosphates Ca^{2+} and cell growth. *Am J. Physiol.* 258:C533-C543.
48. Tilly B.C., Tertoolen I.G.J, Remoie, R. (1990) Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells. *J. Cell Biol.* 110:1211-1215.
49. Regoll, D, Batabe J. (1980) Pharmacology of bradikinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 32:1-46.
50. Takayama K, Qureshi N, Beutler B y Kirkland T N (1989) Diphosphoryl lipid A from *Rhodospseudomonas sphaeroides* ATTC 17023 blocks induction of cachectin in macrophages by lipopolysaccharides. *Infect Immunol*; 57:1336-1338.

51. Writth S.D, Ramos R A, Tobias PS, Ulevitch R J y Mathison J.C. (1990) CD14: a receptor for complexes of lipopolysaccharides (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
52. Ramadori G, Meyer zum Buschenfelde K H, Tobias PS, Mathison J C y Ulevitch R J (1990) Biosynthesis of lipopolisaccharide/binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology* 58:89-94.
53. Wright S D, Tobias P S, Ulevitch R J y Ramos R. (1989) Lipopolisaccharide binding protein opsonizes LPS bearing particles for recognition by novel receptor on macrophages. *J Exp Med* 170 :1231-1241.
54. Vosbeck K, Tobias P S, Mueller H, Allen R A, Arfors K E, Ulevitch R J y Sklar L A (1990) Priming of polymorphonuclear granulocytes by lipopolysaccharides and its complexes with lipopolysaccharide-binding protein and high density lipoprotein. *J Leuk Biol.* 47:97-104.
55. Weinstein S L, June C H y DeFranco AL, (1993) Lipopolysaccharide-induced protein tyrosine phosphorylation in human macrophages is mediated by CD14. *J Immunol.* 151:3829.
56. Willis S y Nisen P. (1996) Differential induction of the mitogen-activated protein kinase pathway by bacterial lipopolysaccharide in cultured monocytes and astrocytes. *Biochem J.* 313:519-524.
57. W.C. Bowman, M.J. Rand. (1990) *Farmacología Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas*, Ed.interamericana, 2da edición, pag.12.2. (70.15).
58. Goodman y Gilman. (1999) *Las Bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Médica Panamericana, 7ma edición.
59. Doyle.A.E., and Beam,A.G.(1984). *Hypertension and the Angiotensin System: Therapeutic approaches*. Raven Press, New York.
60. Regoli, D., Barabe J. (1980) *Pharmacology of bradykinin and related kinins*. *Pharmacol Rev.* 32: 1-46.
61. Offenbacher, S., Farr D.H. , Goodson, J.M. (1981) Measurement of prostalandin E in crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.* 8: 359-367.
62. Yamaguchi, D.T., Hahn, T.J., Beeker, T.G., Kleeman, C.R. and Mullen S. (1988) Relationship of cAMP and calcium messenger systems in prostaglandin-stimulated UMR-106 cells. *J. Biol. Chem.* 263: 10745-10753.
63. Nisato, N., Ogata, Y., Nakao, S, Furuyama, Sh. and Suglya H. (1997) *Cell Calcium* 21(5):345-352.