

## DISCUSIÓN.

Como hemos mencionado los lipopolisacáridos son toxinas sintetizadas por bacterias gram negativas entre las que se encuentran *Actinomyces actinimicetemcomitans* que son uno de los agentes causales de la enfermedad periodontal. Se sabe que los fibroblastos gingivales humanos son sensibles al tratamiento de lipopolisacáridos, ocasionando disminución en la actividad sintética de estas células pero a la fecha no se ha dilucidado cuales serían los intermediarios moleculares responsables de estos fenómenos.

Con la finalidad de determinar cuales mediadores biológicos pudieran estar involucrados en activar la respuesta inhibitoria de estas células, se realizaron estudios encaminados a corroborar los resultados que han obtenido otros autores en los que señalan que los lipopolisacáridos ocasionan una inhibición de la proliferación y en donde se establece que los fibroblastos son sensibles al tratamiento con lipopolisacáridos.

La proteína cinasa C es una enzima trascendental en los procesos de transducción de señales hormonales, de diferenciación celular y de tumorigénesis. Esta enzima pertenece a una familia de serina-treonina cinasas (se han identificado hasta el momento 12 isoformas) que son activadas por fosfolípidos ácidos, particularmente por fosfatidilserina, pero poseen diferentes requerimientos por calcio, diacilglicerol y ésteres de forbol para su activación. La fosforilación de PKC constituye también un proceso fundamental para su activación, tanto en residuos de serina localizados en su dominio catalítico como en residuos de tirosina en respuesta a factores de crecimiento indicando un modelo de regulación complejo que involucra intercomunicación entre diferentes mecanismos de transducción de señales en las células.



## **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 está 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.

## **CONCLUSION.**

El resultado de este trabajo corrobora que los lipopolisacáridos producen una inhibición de la síntesis de DNA de los fibroblastos gingivales humanos. Siendo el máximo efecto inhibitorio en una dosis de 100 microgramos por mililitro.

Así mismo se observa que el factor de crecimiento fibroblástico es un potente mitógeno puesto que promueve la síntesis de DNA en forma dosis dependiente.

También se observa que el factor de crecimiento fibroblástico bloquea los efectos inhibitorios de los lipopolisacáridos sobre la proliferación celular y la inhibición de la expresión de las isoformas de la proteína cinasa C.

## ANEXO I.

### CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *ACTINOBACILLUS ACTINOYCETEMCOMITANS*.

Características del donador.

Ficha periodontal con dx. Enfermedad periodontal.

Un día antes sin aseo

Cultivo primario.

La muestra recogida se llevó en medio enriquecido de agar chocolate y agar sangre e inoculada por estría cruzada.

Se incuba a 37°C en jarra de anaerobiosis.

Cultivo selectivo.

La colonia identificada de cultivo primario se transporta al medio agar-soya-tripticasa suplementado con bacitracina –vancomicina.

Incubar a 37°C en jarra de anaerobiosis de 3 a 7 días.

### AGAR SANGRE.

Base agar gelosa.

Agua Sangre desfibrilada.

Base:

Extracto de músculo de corazón.

Triptosa.

Sodio

Agar-agar.

Preparación.

Agregar el medio en agua y hervir hasta completa disolución.

Vaciar en tubos o matraces y esterilizar en autoclave. Al bajar la temperatura del medio mezclar homogéneamente la sangre estéril desfibrilada. Posteriormente el medio se vacía en cajas petri.

## ANEXO II.

### AGAR CHOCOLATE.

Base agar.

Agua.

Hemoglobina.

Preparación:

La mezcla del medio y H<sub>2</sub>O se esteriliza. Por otra parte se esteriliza a igual condición igual volumen de hemoglobina. Se deja enfriar y se agrega suero fetal bovino. Posteriormente se vacía en cajas petri.

### **ANEXO III.**

TSBV

Tripticase soy agar.

Yeast Extract.

Agua.

Suero de caballo estéril.

Bacitracina.

Vancomicina.

Vit. K.

Hemina.

#### **ANEXO IV.**

##### **CULTIVO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.**

A partir de una muestra de tejido tomada de un paciente:

En caja de petri se coloca solución de Hanks.

Se coloca la muestra de tejido y se raspa.

Se recolecta la muestra y se pone en tubos de ensaye.

Se centrifuga.

Se recoge el sobrenadante y se agrega sol de Hanks, se resuspende y se centrifuga.

Se vuelve a recuperar el sobrenadante y se agrega solución de Hanks y se homogeniza.

Centrifugar nuevamente y recolectar el sobrenadante.

Agregar la tripsina y colocar en baño maría.

Se agrega DMEM.

Se agrega solución de Hanks, se resuspende y se centrifuga.

Retirar el sobrenadante poner DMEM, resuspender y poner en cajas petri.

## ANEXO V.

### CARACTERIZACIÓN DE LIPOPOLISACARIDO.

1. Suspender las colonias en soluciones isotónicas.
2. Centrifugar.
3. Decantar el sobrenadante hasta obtener el botón.
4. Resuspender en agua con fenol.
5. Centrifugar.
6. Separar las fases y dializar.
7. La porción fenólica se lava y se centrifuga.
8. La fase acuosa ya dializada se centrifuga.
9. El botón se lava con agua.
10. Tratar con desoxirribonucleasa y ribonucleasa.
11. Lavar con agua y ultracentrifugar.
12. Liofilizar.



## BIBLIOGRAFIA.

1. Genco, R. J: Periodoncia. Ed. Interamericana 1994 3-54, 155-177 pp.
2. Schluger, D.D.S. Ralph A. Youdelis, D.D.S. Enfermedad Periodontal. Compañía Editorial Continental, S.A., 1981, 195-209.
3. Rietschel. E.T., Galanos, Bacterial endotoxinas, *Aci Am*, 1992. 157-158.
4. Rietschel. E.T., Galanos. The Chemistry and biology of lipopolisaccharides and their lipid A component. *Immunopharmacology and the Regulation of Leukocyte Function*. New York 1990, 183-229.
5. Kristen Helgeland. Cell cycle specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblast of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal Res* 1993 28:161-165.
6. Ghanil Gary C. Biochemical alterations in inflammatory periodontal diseases poly sintetase and activity in gingiva and gingival fibroblast from humans with periodontitis. *J periodontol. Res.* 1994:234: 165.
7. Rietschel. E.T., Galanos Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB: J.* 1994, 8: 217-225.
8. Sanders LAM: Human Immunoglobulin G (IgG) *Infect Immun.* 1995;63:73-81
9. Califano J.V. Influence of anti *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and lipopolisaccharide on severity of generalized periodontitis. *Infect Immun.* 1996; 64:3908-3920.
10. Bowersideleton. Histologic comparison in human and bovine collagen. *J. Periodontol* 1991, 62; 690-701.
11. Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Histología*. México. 1988. 3a Edición. Editorial Salvat.
12. Fleming, T. *Compendio de Periodoncia*. España. 1995. Editorial Masson.
13. Nolte, W. *Microbiología Odontológica*. 1985. México. 4a Edición. Editorial Interamericana.
14. Zambon, J.J., Umemoto, T. et al. 1988. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Pathogenesis of Human Periodontal Disease. *Adv Dent Res* 2(2):269-274.
15. Slots, J., Reynolds, H.S. and Genco, R.J. 1980. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Human Periodontal Disease: a Cross-sectional Microbiological Investigation. *Infect Immun* 29: 1013-1020.

16. Zambon, J.J. 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Human Periodontal Disease. J Clin Periodontol 12:1-20.
17. Dzink, J.L., Tanner, A.C.R et al. 1985. Gram Negative Species Associated with Active Destructive Periodontal Lesions. J Clin Periodontal 12:648-659.
18. Simpson, J., et al. 1980. Identification of collagenase in cultured blood mononuclear cells. J Den Res 59:2.
19. Hausmann, E., et al. 1974. Structural requirements for bone resorption by endotoxin an lipoteichoic acid. J Den Res. 54:B94.
20. Aleo, J., De Renzis, F. and Farber, P. 1975. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. J periodontol 11:639-645.
21. Attstrom, R., Homstrup, P., Nattestad, A. Dinamarca. 1997. Departments of Informatics and Periodontology.
22. Carranza, F.A. Periodontología Clínica de Glickman. México. 1987. 3a Edición. Editorial Interamericana.
23. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee 1992. The bacterial etiology of destructive periodontal disease, current concepts. J. Periodontol. 63 (Suppl): 322-331.
24. Saarelam M., Asikainen, S., Alaluusua, S., Pyhala, L., Lai CH and Jousimies-Sommer, H. 1992. Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a,b,c,d or e Oral Microbiol. Immunol. 7:277-279.
25. Zambon, J.J., Christersson, A., and Slots, J. 1983. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes. J. Periodontol. 54: 707-711.
26. Zambon, J.J., Sunday, G.J. and Smutko, J. 1990. Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. J. Periodontol. 61: 75-80.
27. Dewhirst, F.E., Chen, C.K., Paster, B.J., and Zambon, J.J. 1993. Phylogenetic position of *Eikenella corrodens*-like human oral isolates in the family *Neisseriaceae* and description of *Kingella orales* sp. Int. Syst. Bacterial. 43: 490-499.
28. Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic. Acids Res. 18: 7213-7218.
29. Preus, H.R., Zambon, J.J., Machei, E.E., Dunford, R.G. and Genco R.J. 1994. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. J. Periodontol. 65:2-7.

30. Socransky, S.S., Gibbons, R.J., Dale, A.C., Bortnick, L., Rosenthal, E. and Mc Donald, J.B. 1963. The microbiota of the gingival crevice in man. *Arch. Oral Biol.* 8: 275-280.
31. Aaronson, S.(1991). Growth factors and cancer. *Science* 254: 1146-1152.
32. Nyraayan, AS, Page, R.C., Kuzan F. Collagens synthesized in vitro by diploid fibroblasts obtained from chronically inflamed human connective tissue. *Lab. Invest.* 1978; 39: 61-65
33. Bartold, PM, Page, RC. Isolation and characterization of proteoglycans synthesized by adult human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1987; 253: 399-412. )
34. Westphal O, Luderitz O, Bister F . Uber die Extraction von bakterien mit phenol/wasser. *Z Natur forsh* 1952;7:148-155.
35. Bartold, (1976) Regulation of human gingival fibroblasts growth and syntethic activity by cyclosporine A in vitro. *J. Periodontol. Res.* (1989) 24: 314-321).
36. Steven J. Hill and Jeffrey L. Ebersole. The effect of lipopolisaccharide on growth factor-induced mitogenesis in HGF. *J. Periodontal.* Vol 67 1274-1279.
37. Derek Leroith and Carolyn Bondy. *Growth Factors and Citokines in health and disease.* Ed Jai Pressinc. Vol 1°. 1996.
38. Yasutomi Nishizuka. *Studies and Perspectives of Protein Kinase C.* Departament of Bioquimistry, Japan. 1986, 305-311.