

01421
85



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE LOS LIPOPOLISACARIDOS
SOBRE LA ACTIVACION DE AKT

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

BLANCA ESMERALDA DELGADO ACEVEDO

DIRECTOR: DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS



MEXICO, D. F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

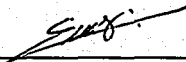
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

La Tesis titulada: **Efecto de los Lipopolisacáridos sobre la activación de AKT**, se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM, bajo la tutoría de: Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.



Director
Dra. Gloria Gutiérrez Venegas



Sustentante
Blanca Esmeralda Delgado Acevedo

B

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Por guiar mi camino proporcionándome sabiduría , amor, fé y esperanza para realizar mi labor en este mundo.

A la Facultad de Odontología de la UNAM por todo el apoyo, a todos mis profesores por los conocimientos brindados en la licenciatura.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, por permitirme participar en una parte de su proyecto, por su comprensión, confianza y paciencia.

A mi Mamá, por todo su amor a lo largo de mi vida por su apoyo incondicional tanto moral como material, por todas las preocupaciones compartidas , por sus palabras de aliento para seguir adelante..... Gracias.

A mi hermana Mez, por su ternura , su cariño y sus sabios consejos que me dan fuerza siempre.

A mi hermano Poncho, por quererme, ayudarme, y enseñarme más de las computadoras para esta tesis.

A Adolfo Miranda, por el amor que me ha dado, por estar siempre conmigo apoyándome en todo, por ayudarme a lograr mi sueño, por enseñarme ha vivir intensamente cada día y valorar lo hermosa que es la vida

A la familia Miranda Zaldivar, por su confianza, y por considerarme siempre parte de ustedes.

A mi hermana clau, por su entusiasmo y sus alegrías compartidas.

A mis amigos: Javier, Perla; Dora, Silvia R, Rita, Miguel, Tere, Nayeli, Esteban, Fabio, Lulú, Bety, Armando, Silvia M., Cesar, Conchita, Nereo, por enseñarme lo maravillosa que es la amistad, por estar conmigo en las buenas y en las malas y por sus consejos.



DEDICATORIA

Quiero Dedicarle este esfuerzo a mi abuelo, el Teniente coronel Santos Acevedo López (†), y a mi Madre la Señora Sulamita Acevedo Cabello, que son la base fundamental en mi familia, y ejemplo de dedicación, tenacidad y perseverancia. Gracias por todo.



ÍNDICE

1.	Abreviaturas	1
2.	Resumen	2
3.	Antecedentes	3
4.	Introducción	4
	4.1. Parodonto	4
	4.1.1. Encía	4
	4.1.2. Ligamento Periodontal	5
	4.1.3. Cemento Radicular	6
	4.1.4. Hueso Alveolar	7
5.	Placa Dentobacteriana	7
6.	Gingivitis y Enfermedad Periodontal	9
7.	Estructura de la célula bacteriana	11
	7.1. Nucleoide	11
	7.2. Estructuras citoplásmicas	11
	7.3. Membrana citoplásmica	11
	7.4. Pared celular	11
	7.5. Espacio periplasmático	12
	7.6. Cápsula	12
	7.7. Flagelos o cilios	12
	7.8. Fimbrias o pilis	12
8.	Componentes de la pared celular de las bacterias Gram-positivas	13
9.	Componentes de la pared celular de las bacterias Gram-negativas	13
10.	Lipopolisacáridos	14
	10.1. Efectos biológicos	16
	10.2. Efecto de los LPS sobre las células del parodonto	17
11.	Actinobacillus actinomycetemcomitans	18
12.	Receptores de membrana	19
	12.1. Receptores fosforiladores	20
	12.2. LBP	21
	12.3. Receptor CD14	21
	12.4. TRL4	22
13.	Señales de transducción	22
14.	Proteínas cinasas	24
15.	AKT/PKB	24
16.	Proteínas relacionadas con AKT	25
17.	Inhibidores	27
18.	Planteamiento del problema	28
19.	Justificación	28
20.	Objetivos	28
	20.1. Objetivo general	28
	20.2. Objetivos específicos	28
21.	Hipótesis	28
22.	Material	29
23.	Tamaño de la muestra	29
24.	Métodos	30
	24.1. Cultivo de fibroblastos gingivales humanos	30
	24.2. Detección de AKT por ensayo de Western Blot	30

25.	Registro y procesamiento de datos	30
26.	Resultados	31
27.	Discusión	35
28.	Conclusiones	36
29.	Bibliografía	37



1. ABREVIATURAS

A.a. = **Actinobacillus actinomycetencomitans**

LPS. = **lipopolisacárido**

CD14. = **receptor**

IL-1. = **Interleucina 1**

IL-8. = **Interleucina 8**

TNF. = **factor de necrosis tumoral**

KDO. = **octosa 2-ceto-desoxioctanato**

LBP. = **proteína de unión a lipopolisacáridos**

DMEM. = **medio Eagle modificado por Dulbecco**

TLR. = **receptor Toll**

PMN. = **leucocitos polimorfonucleares**

2. RESUMEN

Las causas principales de la pérdida dental están dadas por problemas patológicos en los tejidos de soporte del diente, estos daños dan inicio por infecciones bacterianas que ocasionan desde inflamación gingival y la destrucción de los tejidos de sostén, hasta la pérdida de hueso alveolar y por lo tanto la pérdida dental.

Se ha reportado que *Actinobacillus actinomycescomitans* es una de las bacterias patógenas más destructivas del periodonto, principalmente en la periodontitis juvenil localizada, cuyos lipopolisacáridos han sido caracterizados anteriormente en el laboratorio de Bioquímica como componentes de acción de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, entre sus blancos de acción se encuentran los fibroblastos gingivales humanos.

La finalidad de ésta investigación es determinar si los lipopolisacáridos inducen la activación de la enzima AKT, que se activa mediante la fosforilación de la serina 473 por la enzima PDK-1 en fibroblastos gingivales humanos; induciendo de esta forma la supervivencia celular.

Para el desarrollo de esta investigación se realizaron cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos, se obtuvieron lipopolisacáridos de *Actinobacillus actinomycescomitans* con los que se trataron los cultivos celulares; se realizaron ensayos curso-temporal, dosis-respuesta, ensayos de inhibición con el fármaco wortmanina, todo esto con la finalidad de determinar el tiempo y dosis de lipopolisacáridos en que se activa la enzima.

Los resultados obtenidos en la presente investigación señalan que los lipopolisacáridos inducen la activación de AKT mediante la fosforilación en la serina 473 desde dosis de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y desde los 15 minutos de tratamiento. Encontramos así mismo que la fosforilación de esta enzima es sensible al tratamiento con wortmanina.

3. ANTECEDENTES

En 1980 los investigadores analizaban una invasión bacteriana en tejidos blandos del periodonto, en la pared epitelial, en los espacios intracelulares, en la superficie epitelial de las bolsas periodontales (epitelio de la bolsa), en la lámina basal y en el tejido conectivo. Esa invasión bacteriana de tejido periodontal y hueso era común en periodontitis avanzada y periodontitis juvenil localizada.

Los resultados de diferentes estudios, coinciden en que *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Peptostreptococcus*, están asociados con periodontitis del adulto, y la prevalencia de éstos y otros importantes patógenos son potenciales para la enfermedad.

Las bacterias, fueron encontradas en sitios intracelulares específicos y presentaban un patrón definido de penetración; después de estudiar las muestras definieron que se trataba de bacterias Gram-negativas instaladas en los tejidos bucales, pero sus especies todavía no eran determinadas. Posteriormente por medio de inmunofluorescencia, algunas bacterias se identificaron como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que fue una de las primeras bacterias en ser identificadas y definidas como bacteria patógena invasora, presente en desordenes gingivales en los que disminuían o decrecían los niveles de keratina.^{1,2,3,4,5,6}

En los últimos años, las investigaciones se han centrado alrededor de la adhesión y penetración a las células del epitelio por tres periodontopatógenos importantes: *A. actinomycetemcomitans*., *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*.

La periodontitis juvenil localizada, es una enfermedad en la que se ven alterados los elementos de soporte de los dientes (periodonto), y está directamente relacionada con *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

En proyectos realizados con anterioridad en el laboratorio de Bioquímica de la UNAM, se ha estudiado que el lipopolisacárido purificado de esta bacteria provoca una disminución en la proliferación de fibroblastos gingivales humanos, induce la expresión de la enzima ciclooxigenasa y c-fos y también que los lipopolisacáridos ejercen sus efectos mediante la asociación al receptor CD14 y TLR-4.

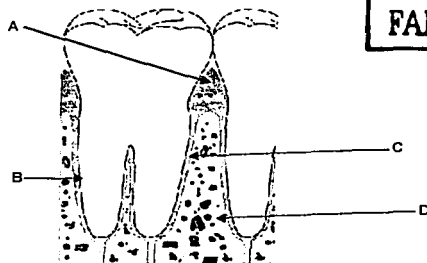
Una característica común de todos los organismos es la capacidad dinámica de coordinar constantemente su actividad en respuesta a los cambios ambientales. Esta función de comunicación celular con el entorno se lleva a cabo a través de varias vías o cascadas intracelulares que reciben y procesan señales externas, no sólo del entorno extracelular sino también de distintas regiones de una misma célula. Estas cascadas transmiten señales que resultan en la regulación de funciones celulares determinadas. Esta transferencia de información constituye una parte importante del repertorio celular de mecanismos reguladores. Sin embargo, a medida que el número de componentes y cascadas de señalización identificados aumenta, parece obvio que estas vías no constituyen entidades aisladas sino que forman parte de redes mucho más extensas.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. PARODONTO (peri = alrededor, odontos = diente)

El periodonto, es un sistema de la cavidad oral que está formado por los tejidos de revestimiento y soporte del diente (fig.1), el cual presenta estructuras como:

1. Encía
2. Ligamento periodontal
3. Cemento radicular
4. Hueso alveolar



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Estructuras que forman el periodonto, (A) Encía, (B)Cemento radicular, (C) Ligamento periodontal, (D) Hueso alveolar. Compendio de Periodoncia. Thomas F. Flemmig

La función principal del periodonto, es unir el diente al tejido óseo del maxilar y la mandíbula y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. El periodonto, también llamado "aparato de inserción" o "tejidos de sostén del diente", establece una unidad funcional, biológica y evolutiva que experimenta algunas modificaciones con la edad y, además, está sujeto a alteraciones morfológicas y funcionales, así como a modificaciones debidas a alteraciones del medio bucal.⁸

4.1.1 ENCÍA

La encía es parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes; adquiere su forma y textura finales con la erupción de los dientes.

En sentido coronario, la encía presenta un color rosa coral, termina en el margen gingival libre, que tiene un contorno festoneado. En sentido apical, la encía se continúa con la mucosa alveolar laxa y de un rojo oscuro, de la cual está separada por el límite mucogingival o línea mucogingival. Se pueden distinguir dos partes de la encía.

1. La encía libre
2. La encía adherida⁹

4.1.2 LIGAMENTO PERIODONTAL

El ligamento periodontal está formado por un tejido conectivo denso muy vascularizado y es el que mantiene el diente en su alvéolo, uniendo el cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar propio. Constituye un mecanismo de soporte para el diente sometido a fuerzas funcionales. Las funciones del ligamento periodontal son: físicas, formativas, nutritivas y sensoriales.

Función física: es la que se da por la unión del diente al hueso, la conservación de los tejidos gingivales, la distribución y absorción de las fuerzas oclusales al hueso, generadas durante la función masticatoria por último la protección de los vasos y nervios contra fuerzas mecánicas.

Función formativa: funge como periostio para el hueso y el cemento, ya que sus células participan en la formación y resorción de éstos tejidos durante los movimientos fisiológicos de adaptación a las fuerzas oclusales.

Función nutritiva y sensorial: es la que proporciona nutrimentos al cemento, hueso y encía a través de los vasos sanguíneos, y brinda drenaje linfático. La inervación del ligamento proporciona sensibilidad propioceptiva y táctil.

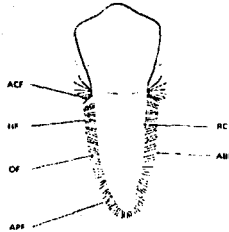
El ligamento periodontal está comunicado por conductos vasculares (conductos de Volkmann) en el hueso alveolar propio con los espacios medulares del hueso alveolar. El espacio del ligamento periodontal tiene la forma de un reloj de arena, más estrecho a nivel radicular medio.

El ligamento periodontal es esencial también para la movilidad de los dientes; ésta se determina en gran medida por la anchura, altura y calidad del ligamento periodontal.

En la (fig.2.) podemos observar el ligamento periodontal que se encuentra entre el hueso alveolar propio (ABP) y el cemento radicular (RC)

Las fibras del ligamento que fijan los dientes en los alvéolos se clasifican en:

- a) Fibras cresta alveolares ACF: que se extienden desde el área cervical de la raíz hasta la cresta alveolar y su función es impedir la extrusión del diente.
- b) Fibras horizontales FH: corren de manera perpendicular, desde el diente hasta el hueso alveolar.
- c) Fibras oblicuas OF: están orientadas oblicuamente con inserciones en el cemento y se extienden más oclusalmente en el alveolo.
- d) Fibras apicales APF: Se diseminan desde el ápice del diente hasta el hueso



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 2. Esquema de las fibras del ligamento periodontal. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang

Es importante señalar que dentro de la estructura del ligamento, además de la parte fibrosa y de los canales neurovasculares, existen elementos celulares como cementoblastos, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, restos de células epiteliales (restos epiteliales de Malassez que son restos de la vaina epitelial de Hertwig.)

Las porciones de los haces fibrilares incluidas en el cemento radicular o en el hueso alveolar se conocen como fibras de Scharpey. El ligamento periodontal se encuentra muy vascularizado y contiene nervios. El dolor y la presión son reconocidos por los receptores del ligamento periodontal.^{7,9}

4.1.3 CEMENTO RADICULAR

El cemento es el tejido mesenquimatoso calcificado que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica y, en ocasiones partes diminutas de las coronas dentarias. Se deposita continuamente durante toda la vida. Como otros tejidos mineralizados, consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica.

La hidroxiapatita forma gran parte de su contenido mineral hasta en un 65%. El cemento cumple distintas funciones. Como la de permitir la inserción en él de las fibras periodontales dirigidas a la raíz y contribuye al proceso de reparación consecutivo a un daño en la superficie radicular.

Existen dos clases de cemento radicular:

- **Cemento primario o acelular** que se forma conjuntamente con la raíz y la erupción dentaria, es transparente y amorfo, compuesto por cementoblastos que depositan la sustancia sin llegar a incluirse en el cemento, cubre la parte cervical del diente y en ocasiones se extiende hasta casi toda la raíz excepto la porción apical.
- **Cemento secundario o celular**, que se forma después de la erupción dentaria y en respuesta a las exigencias funcionales. Su disposición es menos uniforme que la del cemento acelular; los haces de fibras principales (fibras de Sharpey) permanecen dentro del cemento.

Sin embargo, sobre la superficie radicular pueden alternar áreas de cemento acelular y celular.

Ambos cementos son producidos por cementoblastos que cubren la superficie radicular algunas de estas células se incorporan al cementoide, que posteriormente se mineraliza para formar cemento.^{7,8,9}

4.1.4 HUESO ALVEOLAR.

El proceso alveolar o la apófisis alveolar es la parte del maxilar y de mandíbula que sirve de soporte a los dientes, puede dividirse en dos partes según su función:

1. El hueso alveolar propio que está formado por un hueso cortical delgado que rodea la raíz del diente. En este hueso se hallan embebidas fibras de los diferentes grupos del ligamento periodontal.
2. El hueso alveolar de soporte que proporciona un soporte adicional, formado por láminas externas corticales (cortical vestibular y lingual) con hueso esponjoso entre ellas a modo de sándwich.

El contenido mineral del hueso, que es principalmente hidroxapatita, representa un 60% en peso. Las unidades estructurales básicas del hueso son los osteoblastos y osteoclastos. Los osteoblastos producen osteoide, constituido por fibras colágenas y una matriz que contiene principalmente proteoglicanos y glucoproteínas. Esta matriz ósea experimenta una mineralización por depósito de minerales, como calcio y fosfato, que posteriormente se transforma en hidroxapatita.⁹

5. PLACA DENTOBACTERIANA

El término placa se utiliza universalmente para describir la asociación de bacterias con la superficie dentaria⁷ (fig3), se compone de bacterias en una matriz compuesta principalmente por polímeros bacterianos extracelulares y productos salivales o exudados gingivales o ambos. Basada en la relación con el margen gingival, la placa se considera supragingival y subgingival.

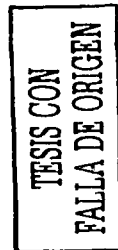


Figura 3. Microscopía que nos muestra microorganismos coagregados formando la placa dentobacteriana Rolf Bos, H. J. Busscher, W. L. Jongebloed, and H. C. van der Mei, Laboratorio de Materia Técnica, Universidad de de Groningen, Groningen, Holanda

La placa supragingival está formada principalmente por microorganismos en proliferación, algunas células epiteliales, leucocitos y macrófagos en una matriz intercelular adherente. Las bacterias forman aproximadamente el 70 a 80% del material sólido; el resto es la matriz que son los sólidos orgánicos e inorgánicos y forman 20% o más de la placa; lo demás es agua.⁷

El principal carbohidrato existente en la matriz, es el dextrano, polisacárido producido por las bacterias; otros carbohidratos de la matriz son levano, galactosa y metilpentosa en forma de ramnosa (fig.4). Los restos bacterianos proporcionan ácido murámico, lípidos y proteínas para la matriz, y la principal fuente son las lipoproteínas salivales. Los principales componentes inorgánicos de la placa supragingival y de su matriz son calcio y fósforo; también hay pequeñas cantidades de magnesio, potasio y sodio.

La formación de la placa se inicia con la adherencia de bacterias a la película adquirida o a la superficie dentaria, ya sea esmalte, dentina o cemento.^{7,9}

La masa de la placa crece por:

1. adherencia de bacterias nuevas
2. multiplicación de bacterias
3. acumulación de productos bacterianos y del huésped

La tasa de formación de placa y las zonas de localización varían entre individuos, en diferentes dientes de la misma boca. Estos factores son influidos por la dieta, edad, composición de la saliva, higiene bucal, alineación de los dientes, enfermedades generales y susceptibilidad del huésped.

A la placa subgingival, como su nombre lo indica la podemos encontrar en el surco gingival; la naturaleza de los organismos que colonizan estos sitios de retención difiere de la de los organismos encontrados en la placa supragingival, estas zonas de retención forman un entorno relativamente estancado en el que los organismos que no pueden adherirse con facilidad a la superficie dentaria tienen la oportunidad de formar colonias, por lo que la mayor parte de las bacterias móviles colonizan estos sitios: el carácter anaerobio de la zona permite que proliferen organismos que solo pueden sobrevivir en áreas de baja concentración de oxígeno.^{7,8,9}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Esta micrografía electrónica de color muestra las células bacterianas y la matriz de dextrano de la placa. (10, 200X). Microbiology, a human perspective, Nester.

En estado normal de salud periodontal, la flora microbiana de la placa es en su mayor parte supragingival confinada a la superficie del esmalte; consiste en una capa delgada de células formadas principalmente por cocos Gram-positivos. Los cultivos han revelado predominancia de estreptococos (principalmente de *Streptococcus sanguis*), *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii* y *Actinomyces israelii*. También pueden aislarse microorganismos Gram-negativos como *Capnocytophaga*, especies de bacteroides, *Campylobacter* y *Fusobacterium*. *Micoplasma* coloniza con regularidad el surco gingival.⁷

6. GINGIVITIS Y ENFERMEDAD PERIODONTAL

Estas patologías se instalan en los tejidos de sostén de las piezas dentarias, inflamando en un primer momento el tejido gingival, lo que le da un aspecto edematoso, rojo, brillante, tumefacto y que sangra con facilidad. Si la enfermedad avanza, afecta también al hueso que disminuye en altura y la inserción de la encía baja, dejando poco a poco la raíz al descubierto, produciendo movilidad dentaria, dolor y lo que conlleva a la exodoncia (extracción). Es una enfermedad crónica y afecta a individuos que tienen predisposición a la misma, tales como: diabéticos, leucémicos, inmunosuprimidos, fumadores, SIDA, etc. Presenta agentes patógenos periodontales como Bacterias aerobias y anaerobias, algunas de las cuales son: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*.

Las bacterias fusiformes Gram-negativas pueden liberar endotoxinas bacterianas, proveen un reservorio de lipopolisacáridos que pueden inducir la expresión de citotoxinas, mediadores de inflamación, como interleucina. Muchos de estos microorganismos pueden generar β -Lactamasa lo que las hace resistentes a la penicilina.

El desarrollo inicial de la gingivitis es consecuencia importante de las bacterias relacionadas con aumento de la formación de placa supragingival. Los aumentos en el número de bastones y filamentos Gram-negativos, principalmente *Actinomyces*, parecen ser de gran importancia en la secuencia del desarrollo de la placa supragingival.¹⁰

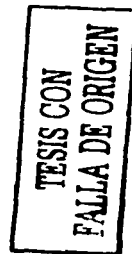
La aparición de formas Gram-negativas, como espiroquetas, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *vibriones* y otras formas móviles en las etapas tardías de desarrollo del enrojecimiento gingival e inflamación, indican claramente un proceso en secuencia del desarrollo de la gingivitis, ya que estos microorganismos se relacionan con la placa subgingival. Sin embargo, la agresión inicial a las estructuras periodontales en la gingivitis puede relacionarse con elementos nocivos de grandes masas de bacterias Gram-positivas y de la placa supragingival. En las primeras etapas de la gingivitis, los cambios edematosos en la encía marginal pueden contribuir a la adquisición sucesiva de especies subgingivales patógenas proporcionando retención mecánica y nutrientes debido al aumento de flujo de líquido gingival.

Muchos investigadores han sugerido que los episodios repetidos de gingivitis pueden conducir a la pérdida de hueso, (periodontitis). Sin embargo, es muy claro que algunos individuos pueden presentar episodios recurrentes de gingivitis sin desarrollar periodontitis, y que la gingivitis por sí sola es reversible cuando se elimina la placa. La invasión epitelial de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en gingivitis avanzada puede ser el acontecimiento inicial en la progresión de la gingivitis a periodontitis.^{7,9}

Algunos microorganismos específicos, o grupos de microorganismos, se relacionan con diferentes formas de enfermedades periodontales humanas; y la tendencia a la colonización bacteriana en las bolsas periodontales es un hecho. La naturaleza de la flora microbiana depende del estado de destrucción periodontal, actividad de la enfermedad y resistencia del huésped. También es importante considerar si la lesión se relaciona con enfermedad crónica o con una forma más rápida de destrucción periodontal.⁷

Tabla I
Padecimientos y otras anomalías en los tejidos
periodontales

- I. Enfermedades y trastornos gingivales
 - A. Gingivitis (sin complicaciones sistémicas)
 - B. Gingivitis y alteraciones gingivales con complicaciones sistémicas
 - C. Alteraciones gingivales diversas
- II. Enfermedades y trastornos periodontales
 - A. Periodontitis del adulto sin complicaciones sistémicas
 - B. Periodontitis juvenil
 - C. Periodontitis con complicaciones sistémicas
 - D. Trastornos diversos que afectan al periodonto
- III. Cambios periodontales relacionados con traumatismo oclusal
 - A. Traumatismo oclusal primario: movilidad y otras alteraciones periodontales relacionadas con bruxismo y otros hábitos parafuncionales
 - B. Traumatismo oclusal secundario: movilidad y otras alteraciones periodontales relacionadas con fuerzas normales en un periodonto gravemente dañado



7. ESTRUCTURA DE LA CÉLULA BACTERIANA

7.1 NUCLEOIDE

Equivalente al núcleo eucariótico, puede observarse mediante microscopio de luz en material teñido. Indicando la presencia de DNA. (DNA constituido por cadenas complementarias antiparalelas de nucleótidos asociados a proteínas) es circular y en algunos casos lineal. Presenta dominios de superenrollamiento debido a que se dobla y tuerce para ser almacenado en la célula,

7.2 ESTRUCTURAS CITOPLÁSMICAS

Las células procarióticas carecen de mitocondria y cloroplastos; en su lugar, las enzimas de transporte electrónico están situadas en la membrana citoplásmica. Los pigmentos fotosintéticos (Carotenoides, bacterioclorofila) de las bacterias fotosintéticas se encuentran en arreglos especializados de la membrana que pueden tener un aspecto de vesículas esféricas o de capas aplanadas como láminas situadas por debajo de la membrana celular.

Las bacterias frecuentemente almacenan materiales de reserva bajo la forma de gránulos insolubles, que están depositados como polímeros neutros, osmóticamente inertes. Los gránulos se usan como fuente de carbono cuando se restablece la síntesis de proteínas y de ácido nucleico.

7.3 MEMBRANA CITOPLÁSMICA

La membrana citoplásmica de las bacterias, también conocida como membrana celular, es una "membrana unitaria" típica que se compone de fosfolípidos y proteínas. Sus funciones son la permeabilidad selectiva y transporte de solutos (la mayor parte de las moléculas que la atraviesan no lo hacen de forma pasiva).

7.4 PARED CELULAR

Se encuentra entre la membrana citoplásmica y la cápsula, da forma a la célula y su composición varía entre bacterias

En las bacterias Gram-positivas, la pared celular está constituida principalmente por peptidoglucano (retiene el cristal violeta utilizado en la tinción de Gram) y ácido teicoico (polímeros solubles en agua) ; en las Gram-negativas, la pared celular incluye al peptidoglucano y a la membrana exterior.

Las bacterias se clasifican como Gram-positivas o Gram-negativas según su respuesta a la técnica de tinción de Gram. este procedimiento es denominado así por el histólogo Christian Gram, quien desarrolló este procedimiento diferencial de tinción en un intento para teñir bacterias en tejido infectados. para ésta técnica se tiene el frotis fijado unos tres minutos con solución de cristal violeta, lavar con solución de yodo de lugol, y dejar secar durante unos dos minutos, lavar cuidadosamente con agua y destañir con acetona-alcohol, lavar nuevamente con agua; las bacterias Gram-positivas retienen el cristal violeta y el yodo a pesar del alcohol; las bacterias Gram-negativas no conservan el colorante y el yodo cuando se les aplica alcohol y acetona, por lo tanto, para observar estas bacterias se efectúa una contratinción de unos 30 segundos con colorante rojo (safranina) se lava, se deja secar y se examina con la lente del microscopio de inmersión de aceite. Las bacterias de color púrpura son Gram-positivas, las rojas, pardas o verdes , según el caso son Gram-negativas.

Además de la protección osmótica que proporciona, la pared celular desempeña una función esencial en la división celular.

• Capa de péptidoglucano

Es un polímero complejo que consiste para fines descriptivos de tres partes: Compuesto de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico alternantes, un conjunto de cadenas laterales tetrapeptídicas idénticas, fijadas al ácido N₂-acetilmurámico y un conjunto de puentes peptídicos transversos idénticos.

7.5 ESPACIO PERIPLASMÁTICO

Se considera como un compartimento que contiene enzimas y que está localizado entre las membrana externa y citoplasmática. Presenta una capa de mureína y una solución de proteína similar a un gel.

Las proteínas periplasmáticas incluyen proteínas de fijación para sustratos específicos (por ejemplo aminoácidos, azúcares, vitaminas e iones), enzimas hidrolíticas (por ejemplo, fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa) que rompen sustratos no transportables en transportables, y enzimas detoxificantes (por ejemplo, β lactamasa y aminoglucósidosfosforilasa) que inactivan a ciertos antibióticos.

7.6 CÁPSULA

Presente en numerosas bacterias, parece ser el producto de la pared celular, se mantiene adherida como una envoltura al germen sin interferir con la permeabilidad.

Está constituida en la generalidad de los microorganismos capsulados por carbohidratos complejos de alto peso molecular, en ciertos gérmenes por una mezcla de polisacáridos con mucoproteínas o como en el caso del báculo de carbunco, por un polipéptido polímero del ácido D-glutámico sin unión al carbohidrato.

Su existencia tiene doble importancia, antigénica y de virulencia; antigénica por cuanto condiciona la especificidad de sustancias defensivas (anticuerpos) y de virulencia ya que interfiere la acción fagocítica de los leucocitos.

7.7 FLAGELOS O CILIOS

Los flagelos son largos apéndices filamentosos extracelulares, helicoidales, responsables del desplazamiento en medios líquidos de la mayor parte de las bacterias móviles, situados en el lado exterior del cuerpo celular, con origen en unos gránulos basales. Estos gránulos basales (son la estructura que, inmersa en la membrana citoplásmica y en la pared celular, ancla el flagelo a la célula), están inmersos en las envueltas (membrana citoplásmica y pared); generalmente se presentan en las bacterias de forma alargada, la longitud promedio es de 25 μ y el diámetro de 10 μ .

Se observan tres partes diferenciadas: filamento helicoidal largo, que es la única parte visible a microscopía óptica; está conectado a un corto segmento curvado denominado codo o gancho, que a su vez está unido al corpúsculo basal, y consta esencialmente de un cilindro que ensarta 1 o 2 parejas de anillos.

Su existencia, como la de la cápsula, no es indispensable para la vida del germen; según el número y localización de los flagelos en las células bacterianas se clasifican en:

- a) monotricos, con un solo flagelo polar
- b) anfitricos, con un flagelo en cada extremo
- c) lofotricos, grupo de flagelos en uno o ambos extremos
- d) peritricos, varios flagelos alrededor.

Se denominan atricos, aquellos que no tienen flagelos

7.8 FIMBRIAS O PILIS

Apéndices más cortos, delgados y numerosos que los flagelos con origen en cuerpos basales de la membrana citoplásmica y sin función locomotriz. Son visibles al microscopio electrónico en ciertos gérmenes Gram-negativos. Están integrados por subunidades proteicas en una estructura tubular de 2 a 3 μ de diámetro interno y se distinguen dos tipos: uno numeroso y pequeño, sirve de sostén a superficies, y otro,

escaso y largo llamado sexual, juega un papel en el paso de factores genéticos extra cromosómicos. Tiene importancia en la transferencia de resistencia a antibióticos entre bacterias.

8. COMPONENTES DE LA PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

La pared celular de las células Gram-positivas es relativamente sencilla; está constituida por una gruesa capa de peptidoglicano. La mayor parte de las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas contienen considerables cantidades de ácidos teicoico y teicurónico.

- **Ácidos teicoico y teicurónico:** Son polímeros hidrosolubles que contienen ribitol o residuos de glicerol unidos por medio de enlaces fosfodiéster, y que tienen uno o más aminoácidos o sustitutos del azúcar. Hay dos tipos de ácidos teicoicos, el ácido teicoico de la pared unido de manera covalente al peptidoglicano y el ácido teicoico de la membrana (ácido lipoteicoico).

Los ácidos teicurónicos son polímeros semejantes, pero en las unidades repetidas hay carbohidratos con radicales ácidos (como el ácido N-acetilmanosurónico o el O-glucosurónico) en lugar de ácidos fosfóricos. Estos compuestos se sintetizan en lugar de los ácidos teicoicos cuando la existencia de fosfatos es limitada.^{11,12,13}

9. COMPONENTES DE LA PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas contienen tres componentes que están exteriores a la capa de péptidoglicano: Lipoproteínas, membrana externa y lipopolisacáridos.

- **Lipoproteínas:** Las moléculas de una lipoproteína sirven para inter cruzar la membrana exterior y las capas de péptidoglicano su función consiste en estabilizar la membrana exterior y fijarla en la capa de péptidoglicano.
- **Membrana externa:** La membrana externa es una estructura de dos capas; su hoja interna semeja en composición a la de la membrana citoplásmica, mientras que los fosfolípidos de la hoja externa son sustituidos por moléculas de Lipopolisacárido (LPS). Como resultado las hojas de esta membrana son asimétricas.

La capacidad de la membrana externa para excluir moléculas hidrófobas constituye una característica poco común entre las membranas biológicas y actúa protegiendo a la célula (en el caso de las bacterias entéricas) de las sales biliares.

Tiene conductos especiales, constituidos por moléculas de proteína denominadas porinas, que permiten la difusión pasiva de compuestos hidrófilos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos y ciertos iones. Las moléculas grandes de antibióticos penetran la membrana externa de manera relativamente lenta, lo cual explica la resistencia relativamente alta a los antibióticos de las bacterias Gram-negativas.

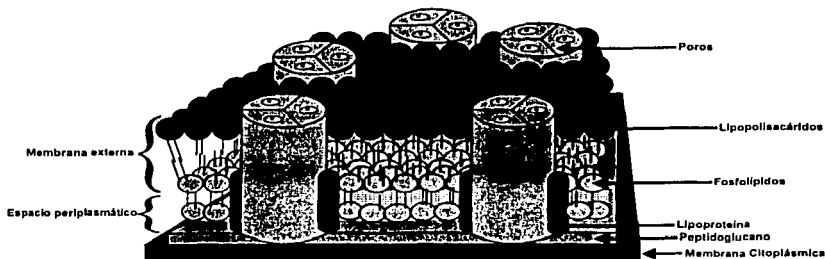
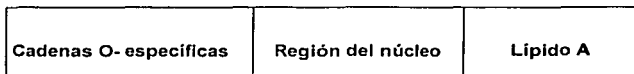


Figura 6. Dibujo esquemático de la estructura de la envoltura celular de bacterias Gram-negativas.

10. LIPOPOLISACÁRIDOS

Son una parte de la membrana externa, aparecen exclusivamente en bacterias Gram-negativas y son componentes estructurales y funcionales de la superficie celular.⁹ Los lipopolisacáridos son los principales componentes antigénicos de superficie, representa el antígeno somático O. Se puede considerar que estos complejos de alto peso molecular tienen tres regiones: una porción lipídica, llamada lípido A; un núcleo de polisacáridos que puede ser similar dentro de un mismo género, y una región polisacárida, las cadenas O-específicas. Los lipopolisacáridos se representan esquemáticamente a continuación:



Las cadenas O-específicas sobresalen de la superficie de la membrana externa y protegen así a la célula de la acción de los anticuerpos y complemento, para impedir su contacto íntimo con la membrana externa.¹⁶

Se cree que la región del lípido A es responsable de la actividad endotóxica del lipopolisacárido bacteriano. Esta porción lipídica del complejo está orientada hacia la zona hidrofóbica de la membrana externa.

La especificidad serológica de los LPS radica en el polisacárido O-específico, mientras que el centro bioactivo o endotoxina como tal, corresponde al lípido A, que en un extremo tiene ácidos grasos y en el otro grupos fosfato, por lo cual es anfifílico; cuando los LPS están aislados, forman micelas biológicamente activas.

Las células bacterianas Gram-negativas vivas o muertas son tóxicas cuando se inyectan a animales de experimentación, se denomina endotoxina para distinguirla de las exotoxinas, que son liberadas fácilmente de las células en que exista lisis. El término endotoxina no es el más idóneo, teniendo en cuenta que la sustancia tóxica puede encontrarse en pequeñas cantidades en el sobrenadante de los cultivos pero sigue utilizándose como término descriptivo.



La endotoxina es en general lo mismo que el lipopolisacárido (LPS) que es el componente estructural de la pared celular de las bacterias.

Las endotoxinas tienen las siguientes características diferenciales con las exotoxinas:

1. Son estables a altas temperaturas; es decir resisten la ebullición en soluciones neutras.
2. No son destruidas por enzimas proteolíticas
3. La toxicidad es neutralizada sólo parcialmente por el antisuero específico.
4. No son convertibles en toxoides.

Los LPS pueden obtenerse a partir de células bacterianas Gram-negativas intactas mediante diversos procedimientos de extracción; la complejidad de las preparaciones depende mucho del método utilizado. La extracción con mezclas de agua y fenol dan lugar al LPS más homogéneo que representa al principio endotóxico.

La composición química y la potencia tóxica de los LPS varía con el tipo de células extraídas, las condiciones de cultivo y los métodos de purificación aplicados. La mayor parte de la información sobre la composición y estructura del LPS endotóxico se ha obtenido a partir de estudios de bacterias entéricas, principalmente *Salmonella*.

El componente lipídico del LPS, que es la región del lípido A, está unido a la estructura de sostén constituida por el polisacárido central.

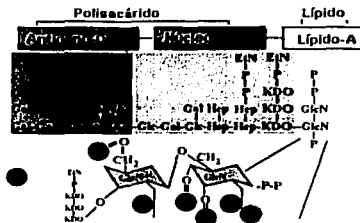
El polisacárido central está ligado por una parte al lípido A y por la otra a las cadenas laterales O-específicas. Consiste en una estructura básica constituida por azúcares que tienen como sustituyentes otros azúcares, etanolamina y fosfato. Mientras que en esta región puede encontrarse un gran número de azúcares diferentes, el ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO) es el único que aparece invariablemente en el LPS. La estructura central polisacarídica del LPS de las bacterias entéricas es específica del grupo; por ejemplo, la región central resulta idéntica en todas las especies de *Salmonella*, pero difiere de las de otros bacilos entéricos.

La posición química de las cadenas laterales de las regiones O-específicas varía mucho, tal y como es de suponer, si se considera el gran número de serotipos de bacilos lisos Gram-negativos. Aunque puede encontrarse un gran número de azúcares, los que aparecen con mayor frecuencia son manosa, fucosa, ramnosa y galactosamina. La naturaleza química de los polisacáridos de las cadenas laterales O-específicas determina la especificidad del antígeno O de la cepa bacteriana.

El lípido A, toxóforo del LPS, está constituido por D-glucosamina, fósforo y, como sustituyentes principales, diversos ácidos grasos entre éstos se encuentran el láurico, el palmítico y el mirístico y el β -hidroxi-mirístico. Salvo unas cuantas excepciones, el último parece ser un constituyente específico del lípido A.

A causa del lípido A, los lipopolisacáridos aislados forman grandes agregados; los pesos moleculares llegan hasta 24×10^6 daltons.

Aunque se ha creído durante mucho tiempo que la antigenicidad de la endotoxina (LPS) y su especificidad serológica residían exclusivamente en el componente de polisacárido, existen datos que indican que la parte correspondiente al Lípido A también es inmunogénica e induce anticuerpos específicos contra éste. Estos anticuerpos presentan reactividad cruzada con el lípido A procedente de otras muchas bacterias Gram-negativas y, en algunas circunstancias, ejercen un efecto protector contra la toxicidad del lípido A.⁹



TEST
FALLA DE ORIGEN

Lipopolisacárido LPS

Figura 7. Esquema que muestra la estructura del LPS de bacterias Gram-negativas.

10.1 EFECTOS BIOLÓGICOS

A pesar de sus diferencias químicas y físicas, las endotoxinas presentan actividades sustancialmente similares, independientemente de su origen. Resulta sorprendente la cantidad de efectos biológicos que presentan las endotoxinas cuando se administran al hombre y a los animales, y posiblemente no pueden compararse con ninguna otra sustancia natural. Los efectos más importantes se recogen en la tabla II:

Tabla # II Principales efectos biológicos observados tras la administración de Endotoxinas	
Pirogenicidad	Mitogenicidad linfocitaria
Resistencia a la infección	Activación de los macrófagos
Shock y letalidad	Disminución de la fagocitosis
Diarrea	Inflamación
Swartzman generalizado	Leucopenia
Protección contra las radiaciones	Leucocitosis
Necrosis tumorales	Hematopoyesis
Aduvancia	Tolerancia a la endotoxina
inmunosupresión	Activación del complemento

Cuando se inoculan por vía parenteral, los LPS reaccionan con una serie de células blanco primarias, entre las que se encuentran macrófagos, granulocitos, plaquetas, linfocitos B y fibroblastos. Estas reacciones celulares están controladas probablemente por receptores situados en la célula blanco, posiblemente glicerofosfátidos, que se unen a la región del lípido A. La acción directa de la endotoxina sobre el sistema diana primario puede dar lugar a una toxicidad inicial, que se manifiesta en forma de perturbaciones metabólicas de la célula blanco, activación de macrófagos, exocitosis lisosomal, etcétera.

Sin embargo, lo más frecuente es que se induzca en la célula blanco la liberación de mediadores o efectores solubles que estimulan o activan sistemas blanco secundarios, dando como resultado los efectos biológicos que constituyen en resumen la endotoxicidad. Se han descrito diversos mediadores, como factores activadores de los linfocitos, antagonistas de un glucocorticoide., factores estimulantes de las colonias, factores

tumorales necróticos, pirógenos endógenos y factores vasoactivos. Es de destacar que algunos de estos mediadores pueden ser similares o idénticos. También es posible que algunos de ellos estén potenciados por la endotoxina, pudiendo volver a iniciar esta secuencia de acción a nivel del sistema blanco secundario.

Como puede apreciarse, el número y variedad de las células blanco primarias, mediadores y sistemas blanco secundarios sirve para amplificar y diversificar los efectos de los LPS, lo que conduce a una variedad casi ilimitada de efectos biológicos.

La mayor parte de estas reacciones frente al huésped están inducidas por los LPS, independientemente de su origen biológico; sin embargo, la potencia relativa individual de los efectos biológicos que producen difiere en las preparaciones obtenidas a partir de bacterias Gram-negativas distintas, variando también según el aislamiento y la purificación.

10.2 EFECTO DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS SOBRE LAS CÉLULAS DEL PARODONTO

Se ha demostrado que los 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 (Interleucina-8) guía a los leucocitos al sitio de la colonización bacteriana.

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.

De igual forma las células epiteliales de la encía, que constituyen el primer punto de contacto con los lipopolisacáridos en el parodonto, liberan IL-1⁴⁴.

Las endotoxinas actúan también sobre los fibroblastos gingivales que sintetizan y liberan tanto IL-8 como la proteína quimiotáctica monocítica (MCP-1). Se ha demostrado, 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*. Los monocitos son capaces de responder a concentraciones muy bajas de lipopolisacáridos 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 LPS; 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 LPS promueven la síntesis de IL-1 β , que a su vez estimula a células no mieloides (endoteliales y fibroblastos) a secretar prostaglandinas y metaloproteinasas mismas que se encuentran en altas concentraciones en tejidos periodontales 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 LPS. El TNF- α estimula la resorción ósea pero es menos potente que la IL-1 así mismo, incrementa la permeabilidad vascular, la degranulación de neutrófilos e induce la respuesta de varios tipos celulares incluyendo la liberación PGE₂, por los fibroblastos y de IL-1 por los 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 periodontal.⁴⁵

Las metaloproteinasas son proteínas de la matriz (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 LPS 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 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.

11. *ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS*

Es un bacilo pequeño, no móvil, Gram-negativo, sacarolítico, capnofílico, de extremos redondeados, forma pequeñas colonias convexas con un centro en forma de estrella. Esta especie fue reconocida por primera vez como posible patógeno periodontal por su mayor frecuencia de detección y sus mayores cantidades en las lesiones de periodontitis juvenil localizada, ya que en pacientes con PJI se encontraban concentraciones elevadas de anticuerpos en sangre para esta especie.⁶

A. actinomycetemcomitans es una bacteria que está asociada con una variedad de enfermedades infecciosas o procesos infecciosos en los que se incluye la endocarditis, abscesos cerebrales, osteomielitis, abscesos subcutáneos y enfermedad periodontal.^{17,21}

A. actinomycetemcomitans ha sido fuertemente asociado a la patogénesis de formas tempranas de periodontitis, periodontitis del adulto y formas refractarias a la terapia periodontal convencional.¹⁸ Se han realizado investigaciones, donde *A. actinomycetemcomitans* no fue identificado en sitios con salud periodontal y detectado en 23% de los sitios con diagnóstico de periodontitis moderada y severa del adulto, evidenciando una tendencia al aumento. Resultados similares han sido observados por Muller y col. que mostraron aumento de *A. actinomycetemcomitans*; A.a, es capaz de asociarse a la hidroxiapatita, un material del diente natural, y a las células de un cultivo epitelial^{14,15}. La habilidad de este organismo para presentarse en las células epiteliales cultivadas se ha demostrado.

El mecanismo que usa para mantenerse en la cavidad oral presenta varias opciones como la adhesión a las células del epitelio, la adhesión al esmalte del diente, penetración a la célula epitelial directamente o a través de los espacios intracelulares y la coagregación con otros microorganismos que se atan firmemente a los tejidos orales.

Para identificar las macromoléculas involucradas en la adherencia e invasión de las células epiteliales por *A. actinomycetemcomitans*, se han empleado anticuerpos monoclonales y se descubrieron 2 anticuerpos que inhiben a la bacteria pero no su adherencia a las células epiteliales. (Anticuerpo monoclonal K26). Este dato implica que las diferentes macromoléculas, están involucradas en la invasión y adherencia de este organismo a las células epiteliales.

El *A. actinomycetemcomitans* entra en las células por medio de receptores que median la endocitosis y en estadios tempranos por membranas endosomales que desintegra con tiempo.

La invasión de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, es un proceso activo que requiere energía de ambas células tanto la eucariótica como la procariótica en la síntesis de proteínas. La célula eucariótica requiere de los microfilamentos pero no de los microtubulos para la internalización. Por otro lado, las células K.B forman numerosas microvellosidades

en presencia de A.a y en muchas bacterias se ha observado la unión a estas microvellosidades.

La patogénesis de *A. actinomycetemcomitans* aún no está muy entendida, pero este organismo produce una variedad de factores de virulencia incluyendo potentes leucotoxinas (RTX) y familias de citolisinas bacterianas.

La leucotoxina exhibe una característica citolítica específica, que destruye LPMN humanos y macrófagos, mientras que otros tipos celulares como epiteliales y endoteliales, fibroblastos, eritrocitos y plaquetas son resistentes a la lisis.

La leucotoxina (RTX) de *A. actinomycetemcomitans* se expresan por cuatro genes. Estos genes son designados: ItxB, ItxA, ItxB, e ItxD.^{17,21} el gen estructural que pone en código a la leucotoxina es ItxA es un péptido de 116 kDa^{20,21}; los tres genes Itx restantes (el ItxB, ItxC, y ItxD) se requieren para activar y transportar la leucotoxina.

Finalmente, el organismo produce un sin número de factores de virulencia potenciales que pueden contribuir a la patogénesis de Periodontitis juvenil localizada (LJP). Éstos incluyen a la leucotoxina, epiteliotoxina, la colagenasa, la inmuno globulina no proteasa, el factor inhibitorio de fibroblastos, la toxina que induce la resorción de hueso, un activador celular policlonal B, y un potente lipopolisacárido.²²

12. RECEPTORES DE MEMBRANA

Un receptor básicamente, es una estructura química (proteína) capaz de recibir al mensajero y de transmitir el mensaje para que se produzca la respuesta de la célula.

Es decir, el receptor como tal tiene dos características fundamentales:

- 1) reconocer al mensajero para interactuar con él
- 2) activar la secuencia de eventos que conducen a la respuesta celular.²⁵

En la actualidad ya se conoce la naturaleza química de muchos receptores; Podemos dividir a los receptores por su localización en la célula en dos grandes familias: los que se localizan en la *membrana plasmática* y los *intracelulares*.

Una de las observaciones más sorprendentes obtenidas en los estudios iniciales realizados en distintos tipos celulares es el de la existencia de una red de señalización general. Los componentes celulares (por ejemplo, los receptores de membrana) reciben señales específicas (*inputs*) y llevarían a la célula a entrar en un engranaje específico. La identidad molecular de los componentes de la señalización y sus moléculas de interacción pueden ser específicos del tipo celular, pero la lógica de actuación y la función global es la misma en todos los tipos celulares. Por ejemplo, la célula es capaz de reconocer cambios extracelulares ligados a la presencia de un factor de crecimiento extracelular (FGF), ya que presenta los receptores adecuados en su membrana. Estos receptores una vez unidos a su ligando (FGF) van a poner en marcha la maquinaria de señalización específica. En eucariotas, el rol de las proteínas fosfatasa y cinasa citoplasmáticas en esta etapa es muy importante, ya que constituyen los reguladores principales del proceso. Son los que van a permitir una respuesta precisa y específica para cada señal.

Este proceso de transducción de señales va a finalizar con la activación o represión de la transcripción de uno o varios genes específicos que se lleva a cabo en el núcleo de la célula.²⁷

Las células se comunican con su medio ambiente a través de una serie de receptores de superficie celular que reconocen y unen moléculas presentes en el medio ambiente extracelular. Todas las células que responden a estímulos externos usualmente por

receptores sobre la superficie externa de la célula, lo que produce cambios dentro de la célula.

12.1 RECEPTORES CON ACTIVIDAD DE FOSFORILACIÓN

Se ha reportado que algunos receptores como el de la insulina o el del factor de crecimiento epidérmico poseen, en su estructura, actividades enzimáticas de proteína cinasa; es decir, que tienen la capacidad de fosforilar a otras proteínas y a sí mismos. Aunque la evidencia es incompleta, es muy posible que esta actividad de fosforilación sea fundamental para la propagación intracelular de la señal.²⁷ Las hormonas, al activar al receptor, aumentan su actividad enzimática de proteína cinasa causando, en muchos casos, la fosforilación del mismo receptor (autofosforilación).

La función básica de los segundos mensajeros es activar a proteínas cinasas, las cuales, a su vez, fosforilan a otras proteínas para modificar su actividad, realizándose así la propagación intracelular de la señal. Así, en el caso de estos receptores, con actividad de proteína cinasa, parecería que la naturaleza se saltó el paso de la generación del segundo mensajero. Aquí el agonista activa directamente a una enzima fosforilante: el mismo receptor.²⁶

Existen receptores con actividad de tirosina cinasa, es decir, que fosforilan a proteínas en residuos de tirosina, otros con actividad de serina/treonina cinasa, es decir que fosforilan a las proteínas en estos aminoácidos. Dentro de los receptores con actividad de tirosina cinasa podemos mencionar a los receptores de la insulina, del factor de crecimiento epidérmico y del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Estos receptores tienen una porción extracelular con la que fijan al ligando, una zona transmembranal y la porción citoplásmica. En el caso de los receptores para el factor de crecimiento epidérmico y del derivado de plaquetas, se trata de una sola cadena polipeptídica. En el caso del receptor de la insulina, éste está formado por dos cadenas denominadas beta (parecidas a los receptores mencionados anteriormente) y dos subunidades alfa localizadas en el exterior celular; estas cuatro cadenas están unidas por puentes disulfuro (unión a través de dos átomos de azufre).

Todos estos receptores, al ser activados, se autofosforilan; es decir que un receptor fosforila a otro igual, y esto ocurre en varios lugares. Al fosforilarse ese dominio es como si le cambiase la cara a la zona; después de fosforilarse adquiere una enorme afinidad por una serie de proteínas que se fijan al receptor formando un enorme complejo. Estos lugares han sido identificados y corresponden a dominios llamados SH-2. Entre las proteínas que se han identificado están una proteína cinasa citoplásmica llamada Src, la fosfolipasa C gamma y otras proteínas sin actividad propiamente dicha pero que permiten que otras nuevas proteínas se acoplen al complejo (como por ejemplo la proteína p85 que permite que se acople a la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-3-cinasa). Al activarse este tipo de receptores se autofosforilan en algunas de sus tirosinas, estas tirosinas fosforiladas son críticas para que se una, directamente o por medio de otras proteínas intermedias, una serie de enzimas que aumentan su actividad y que así conducen a los efectos finales.

Una de las proteínas que participa en este complejo de activación es la fosfolipasa C gamma, que es fosforilada al estimular su actividad. Ello conduce a un aumento en el sistema de transducción de los fosfoinosítidos, por un proceso diferente. Otra de las proteínas que se activa por la formación de estos complejos es la MAP cinasa (proteína quinasa activada mitógenamente) que viaja al núcleo para favorecer la expresión de algunos genes de respuesta rápida.

Los receptores para los factores de crecimiento y transformación beta (TGF β) son quizá de los mejor conocidos entre los receptores con actividad de cinasa de serina treonina. Estos factores, como su nombre lo indica, participan en la regulación del ciclo celular de muchas de nuestras células, controlando su proliferación y su diferenciación.

Son proteínas enormemente especializadas y de las cuales no se sabía prácticamente nada hace unos años.^{26, 28}

Existen algunos receptores como los de la prolactina o los de la hormona de crecimiento que están formados, como en los casos anteriores, por una porción extracelular que fija a la hormona, una transmembranal y una intracelular. Sorprendentemente, la porción intracelular es bastante pequeña y no se le ha podido detectar actividad enzimática alguna. Sin embargo, cuando purificamos el receptor se encuentra asociado con una actividad de proteína cinasa. La interpretación que se ha hecho de estos hallazgos es la suposición de que estos receptores se asocian con proteínas cinasas itinerantes, que se encuentran libres en el citoplasma, como esperando ser llamadas por los receptores activos.²⁸

12.2 LBP (proteína de unión a lipopolisacáridos)

Es una glucoproteína sérica de 60- kDa, presente en el suero normal a concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, y que se eleva hasta 50 $\mu\text{g/ml}$ después de una respuesta de fase aguda. 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.²³ La síntesis de LBP por los hepatocitos es controlada por LPS, IL-1, TNF, IL-6 y glucocorticoides. La unión específica de la LBP al LPS se da a través del lípido A. La caracterización de la función de LBP como determinante de las respuestas celulares a LPS reveló un mecanismo para la activación celular inducida por LPS que involucra un receptor de membrana para los complejos LPS-LBP.²⁴

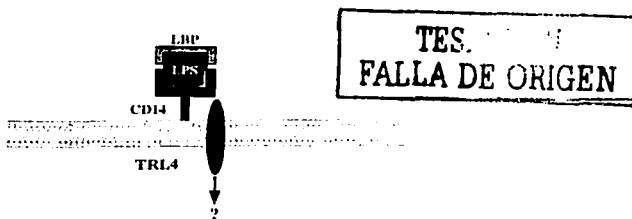


Figura 8. Dibujo esquemático que muestra la unión del complejo LPS-LBP

12.3. RECEPTOR CD14

Glucoproteína de 55-kDa descrita anteriormente como un antígeno de diferenciación de monocitos y macrófagos, hoy se le conoce como clave en la activación celular inducida por LPS. Al penetrar el LPS (Fig. 8) 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, una vez unido al complejo, puede activar la síntesis de TNF en estas células, transportando al LPS a la superficie celular, de manera que otras proteínas son estimuladas.

La unión es mediada por una proteína soluble en vez de una proteína unida a la membrana. Después de la formación de un complejo soluble, es posible que el LPS se asocie con un receptor de membrana.²⁴

12.4. TLR 4

Los receptores Toll, (Toll like receptors) sirven como medio de señalización para los LPS. Toll es un tipo de proteína transmembranal que cuenta con un sitio extracelular que es rico en leucina y un sitio citoplasmático con una secuencia homóloga al receptor humano de interleucina 1 (IL-1).

Se ha visto que en monolitos de ratón y monolitos humanos hay expresión de TLR2 y TLR4 y que estos son receptores para los LPS.¹⁹ más, en otros estudios, se vio que TLR2 y TLR4 son expresados y están involucrados en la producción de citoquinas proinflamatorias en células no mieloides (fibroblastos gingivales) seguidos de la estimulación con LPS.

13. SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN

Denominamos transducción de señales al proceso que ocurre dentro de una célula luego de que ésta recibe una señal o indicación externa.

Tal señal, en la mayoría de los casos, se produce cuando una molécula (o ligando) se une específicamente con un receptor presente en la membrana celular. El efecto del ligando es desencadenar una cascada de sucesos, apertura de canales iónicos, activación de enzimas y de genes, etc. que permiten que la célula se active, prolifere, comience a secretar algún compuesto o se diferencie en otro tipo celular, etc.²⁷

Se han encontrado diferentes familias de tirosín cinasas que participan en el proceso de fosforilación. Los componentes de los miembros de una de estas familias tienen dos regiones, o dominios, semejantes, denominados SH2 y SH3. Los SH2 son responsables de la interacción entre la enzima y la proteína a fosforilar, mientras que los SH3 pueden unirse con otras proteínas capaces, a su vez, de transducir señales. La actividad de las tirosín cinasas reside en la región C-terminal de estas enzimas.

En ese dominio hay dos tirosinas, ubicadas en las posiciones 394 y 505; la fosforilación de la tirosina 394 por otra cinasa produce la activación de la enzima, mientras que la fosforilación de la 505 la inactiva.

Las cinasas activadas fosforilan también a la fosfolipasa C- γ (PLC), la que hidroliza un fosfolípido de la membrana, el fosfatidilinositol difosfato (PIP2), en inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 estimula la salida de Ca^{2+} de los reservorios celulares y promueve también su entrada desde el exterior, activando a su vez una cinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (Ca^{2+} /CaM).

El Ca^{2+} y el DAG provocan la translocación de otra cinasa (PKC) a la membrana citoplasmática, donde la enzima altera el transporte de varios iones. Todos estos hechos hacen que el linfocito B progrese hacia una fase del ciclo celular caracterizada por la síntesis de ADN. La célula continúa diferenciándose hasta llegar al estado de célula plasmática, que secreta un anticuerpo con un sitio de unión con el antígeno idéntico al de la IgM que formaba el receptor del linfocito B que se activó.

Durante la activación del linfocito T, cuando el complejo TCR/CD3 interactúa con el correspondiente HLA/péptido, ocurre un mecanismo de fosforilación similar al expuesto para el linfocito B. En una o varias de las subunidades del receptor se advierten cambios conformacionales, con la consecuente activación de las cinasas asociadas, que fosforilan diferentes componentes intracelulares. La cadena ζ es la única subunidad del TCR/CD3 en la que se han detectado tirosinas fosforiladas; a su vez, la porción citoplasmática de esta cadena puede transducir señales durante el proceso de activación del linfocito.

En forma semejante a lo que ocurre con los linfocitos B, la PLC- γ de los linfocitos T activados experimenta una rápida y transitoria fosforilación de sus tirosinas; la enzima activada hidroliza PIP2. y origina IP3 y DAG, que estimulan a la PKC. Esta enzima fosforila

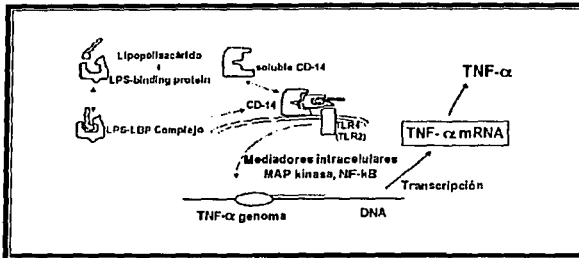
una variedad de moléculas, siguiendo la cascada ya indicada en la activación del linfocito B.

Actualmente sabemos que múltiples cascadas de señalización en una misma célula comparten numerosos componentes. Esta cierta promiscuidad puede entenderse por el hecho de que todos estos "circuitos" están interconectados, y así las respuestas pueden generarse de forma más rápida. Estas cascadas de señalización implican interacciones de sus componentes con estructuras del citoesqueleto, complejos de proteínas adaptadoras, membranas subcelulares.

Si comparamos las distintas clases de componentes de señalización como son las cinasas solubles, las fosfatasa, proteínas adaptadoras y los elementos del citoesqueleto entre dos células completamente distintas (tanto en morfología como en función) como el la neurona y célula T, vemos que la organización y composición de los "circuitos" son muy similares. Cada célula presentará variaciones específicas ya que los mensajeros fisiológicos son completamente distintos (en una neurona habrá un cambio de potencial post-sináptico mientras que en una célula T se dará una secreción de IL-2), pero el engranaje celular es el mismo.

La endotoxina (LPS) es uno de los estímulos más poderosos y mejor estudiados en la activación del sistema inflamatorio. Es un lipopolisacárido compuesto, formado por un componente antigénico variable (cadena O específica más un oligosacárido) y por una porción mas o menos constante denominada Lípido A. Esta última es una molécula estructuralmente compleja, compuesta por un componente hidrofílico (azúcar) y otro lipofílico (ácido graso). El Lípido A es el responsable de activar la respuesta del huésped frente a infecciones por gérmenes Gram-negativos, cuando este proceso es activado en forma local, participa en el control de la infección y en la activación de los mecanismos de reparación. Cuando la endotoxina invade el torrente circulatorio, se une a una variada gama de proteínas (albúmina, lipoproteínas, complemento, etc) destacando sin embargo una especial afinidad por una proteína ligante específica (proteína de fase aguda de síntesis hepática) denominada proteína ligante de lipopolisacáridos (LBP). Este complejo LPS-LBP entra en contacto con el monocito a nivel sanguíneo o con el macrófago a nivel tisular, produciendo la activación celular.

Esta interacción es mediada por un receptor específico de membrana (CD14) presente en células inmunocompetentes, el cual al ser activado transmite la señal intracelular a través de una proteína transmembranal (TLR4 para Gram-negativos y TLR2 para Gram-positivos) las cuales inducen la activación de mediadores intracelulares (proteína cinasas y NF- κ B) que inician los procesos de transcripción génica para TNF α , el cual es sintetizado en forma de pre-proteína, que posteriormente es procesada a nivel citoplasmático para finalmente ser excretada como TNF α maduro.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 9. Proceso de traducción de TNF α inducido por lipopolisacárido

En su gran mayoría, los efectos biológicos atribuidos a TNF α son derivados de la acción de la molécula sobre receptores de membrana (TNF-R1 y TNF-R2) presente en casi todas las células de la economía.

14. PROTEINAS CINASAS

Son enzimas que catalizan el proceso de fosforilación de proteínas blanco, constituyen un mecanismo de regulación esencial en las células, ya que junto con las fosfatasa, son parte fundamental de la maquinaria del aparato de transducción de señales actuando como elementos amplificadores de los mensajes hormonales.

Para efectuar la tarea monumental de la desfosforilación de las proteínas otro grupo de enzimas denominado fosfatasa, es el responsable de reestablecer el equilibrio celular.

Se estima que hay más de mil cinasa,²⁹ que difieren en su regulación, su especificidad por el sustrato y su situación celular, permitiendo a cada uno así para regular las funciones específicas.

Los subgrupos principales de proteínas cinasa son serín/treonin cinasa y la tirosin /cinasa: Estas catalizan la transferencia del γ fosfato del ATP al hidroxil de la serín/treonine, o a la tirosin/cinasa. La estructura de la cinasa es aproximadamente de 30 kDa y comprende de 12 subdominios.²⁹

15. AKT O PKB

Akt es una serín/treonin cinasa que se fosforila en residuos de treonina 308 y serina 473 para su activación, se han identificado tres isoformas de Akt^{30,31}. Aunque Akt 1 y Akt 2 son ubicuamente expresadas, Akt 3 parece ser expresada predominantemente en el cerebro, corazón, y riñón³⁰. Algunos investigadores han demostrado que AKT, fosforila a mTOR (blanco de la Rapamicina en mamíferos), un activador de la cinasa p70s6. La serín/threonin cinasa Akt (también conocido como proteína cinasa B) se activa en respuesta a varios estímulos por un mecanismo que involucra a la enzima fosfoinosítido 3-cinasa (PI3-K).

La fosforilación de estas cinasa regula una extensa variedad de procesos celulares involucrados en la respuesta mitogénica, incluyendo la síntesis de proteínas, la

traducción de ARN mensajeros específicos, y la progresión de la fase G1 a la S del ciclo celular.

Akt proporciona un signo de supervivencia que protege las células de la apoptosis inducido por el retiro de factor de crecimiento, a esta molécula en varios trabajos previos la han identificado como reguladora de crecimiento y supervivencia celular, metabolismo de glucógeno, tono vasomotor y generación de óxido nítrico. También se ha demostrado que Akt regula la translocación de GLUT-4 a la membrana del plasma^{30,32} para contribuir en la regulación vesicular, y la endocitosis³⁰. Akt es homólogo a las cinasas de la proteína cAMP-dependientes y familias de PKC.³³

La transducción de señales de proliferación y sobrevida desde los receptores de la membrana celular hasta el núcleo involucra muchas vías bien descritas y mutuamente no-excluyentes. Una de las vías principales y mejor caracterizadas es la del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI3K). La ligadura de factores de crecimiento a sus receptores de membrana resulta en la dimerización del receptor y su auto-fosforilación. Mediante la cooperación de varias moléculas "adaptadoras" intracelulares, este efecto resulta en la activación por fosforilación del PI3K, el que a su vez activa la cinasa Akt.

La activación de la vía de PI3K/Akt ha sido vinculada con el proceso oncogénico. Además, la activación de esta vía en modelos tumorales se ha asociado con agresividad tumoral y resistencia a la quimioterapia.

En el carboxilo-terminal de Akt el dominio catalizador se relaciona estrechamente a los dominios catalizadores de todos los miembros conocidos de la familia de la proteína cinasa C (PKC). Akt, sin embargo, difiere de PKC en su región del N-terminal que contiene un dominio relacionado a distancia al dominio citoplásmico de tirosin-cinasas SH2 y otras proteínas de la señalización, y qué se ha nombrado la homología de Akt (AH).³⁴

16. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON AKT

Los Lipopolisacáridos activan la enzima fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3K), que es una enzima que participa en múltiples procesos celulares; consta de un regulador de peso molecular de P85 y un catalizador p110. Esta enzima se une a la superficie de la membrana interna por la región SRC-homóloga 2 (SH2) que son dominios en la unidad reguladora, lo que cataliza la transferencia de un grupo fosfato proveniente del ATP a la posición D-3 del anillo de inositol.

Dependiendo del sustrato lipídico PI3K puede generar especies posibles (PI 3, 4, 5), que normalmente están ausentes en la mayoría de las células. Después de que PI3K se activa, está enzima a su vez promueve la activación de la cinasa dependiente de 3 fosfoinositol dependiente (PDK-1), que se activa por PI3K fosforilada.³⁴

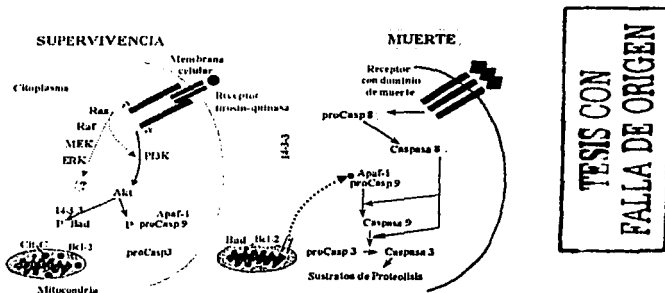
Akt fosforilada y activada por PDK-1 en la treonina 308, da como resultado la fosforilación de varios sustratos que tienen gran importancia en la señalización de LPS. Como por ejemplo, otras proteínas que están ampliamente relacionadas con AKT son proteínas que inhiben muerte celular, como Bcl-2.

Los principales reguladores intracelulares de la muerte celular programada son la familia de proteínas relacionadas con Bcl-2, es la proteína presente en los mamíferos y que homóloga estructural y funcionalmente a la proteína CED-9, esencial para la prevención de la muerte celular en *C. Elegans*³⁵. La familia de Bcl-2 en mamíferos está constituida hasta el momento por 15 miembros³⁵ y todos ellos presentan al menos uno de los cuatro dominios conservados de homología a Bcl-2 (BH1 a BH4). Algunos miembros de la familia inhiben la muerte celular (Bcl-2, Bcl-X_L) y otros la activan (Bax, Bad, Bid). Puesto que ambos tipos pueden formar heterodímeros, sus concentraciones relativas pueden regular el balance entre muerte y supervivencia³⁷.

Muchas de estas proteínas presentan un dominio carboxilo terminal hidrofóbico que les permite anclarse a la cara citoplasmática de las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y envoltura nuclear, de forma que pueden registrar daños en dichos orgánelos³⁸.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 y las procaspasas, a su vez, son reguladas por señales extracelulares de supervivencia o de muerte. Diversas familias de neurotrofinas y factores de crecimiento forman parte de las moléculas señalizadoras de supervivencia en el sistema nervioso. Sus señales de supervivencia se pueden transducir por la vía intracelular que implica a la PI3K (del Inglés, Phosphatidylinositol-3-Kinase),³⁹ y la consecuente activación de la proteína-cinasa B ó Akt, o por la vía que implica a las MAPK (del Inglés, Mitogen-Activated Protein Kinases).^{40, 41}

La activación de Akt supone la fosforilación directa de Bad (Datta et al., 1997) que se mantiene unido a la proteína 14-3-3. Por el contrario, Bad no fosforilado se une a Bcl-X_L (ó Bcl-2) impidiendo que ejerza su acción de supervivencia.^{42, 43}



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Esquema que muestra como actúa AKT/PKB en relación con otras proteínas

17. INHIBIDORES

Wortmannina, es un inhibidor específico de la vía fosfatidil-inositol 3 cinasa, suprime la producción del superóxido de PMNs.

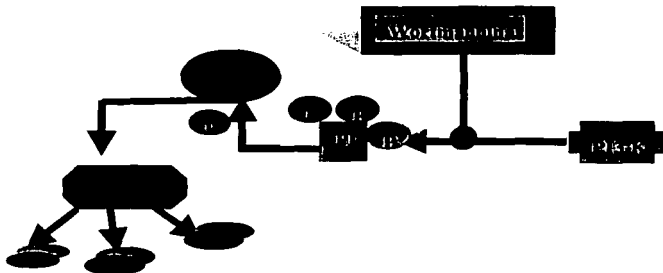
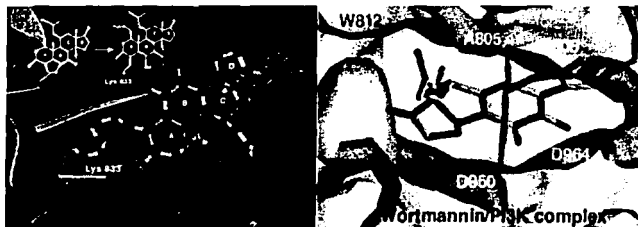


Figura 11. Donde muestra el sitio desde donde actúa el inhibidor Wortmannina

Es un metabolito fúngico que tiene una estructura del tipo esteroide y que se aisló inicialmente de los filtrados de la célula de roidium de *Myrothecium*. Esta sustancia pasa en las células por difusión simple selectivamente e irreversiblemente. Con un peso molecular de 110-kDa. Los estudios anteriores han mostrado que wortmannina inhibe PMN, la adhesión, y la quimiotaxis.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Dibujo donde se representa la estructura del inhibidor wortmannina

De los inhibidores de PI3-K empleados (wortmannina y LY294002) comprobamos que fue inactivada la vía con el inhibidor Wortmannina.

18. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La placa periodontal es un factor etiológico determinante en la enfermedad periodontal, ya que se compone de microorganismos que favorecen su desarrollo; por lo tanto es importante efectuar el control de la placa dentobacteriana y de esta forma dar salud a los tejidos del periodonto.

Durante el proceso de infección de los fibroblastos por LPS bacterianos, específicamente con lipopolisacárido purificado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, hemos encontrado que se realiza la activación de un gran número de vías y señales dentro de las células; y una de estas es la de AKT; siendo la activación de PKB el propósito de nuestro estudio. Ya que nos es importante conocer a AKT/PKB por su gran participación en torno a la apoptosis y como consecuencia a la alteración de la homeostasis del periodonto. Estudiar esta vía es de gran importancia por que se encuentra involucrada en la activación de procesos como la apoptosis.

19. JUSTIFICACIÓN.

Debido a que las enfermedades periodontales afectan en gran medida al aparato de inserción dental, produciéndose la reabsorción de hueso alveolar, la formación de bolsas periodontales y la pérdida del diente y tomando en cuenta que estas enfermedades son causadas por agentes microbianos como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que es una bacteria muy agresiva involucrada en la periodontitis juvenil y del adulto entre otros, es importante determinar si es activada la vía de la enzima Akt para poder realizar estudios posteriores como un buen modelo referente a la supervivencia celular, así como determinar si existe algún tipo de inhibición hacia esta misma vía.

20. OBJETIVOS.

20.1 OBJETIVO GENERAL

- El propósito de este trabajo experimental consiste en determinar mediante lipopolisacáridos purificados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* si existe la activación de una vía de transducción específica en los fibroblastos gingivales humanos.

20.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto que causan los lipopolisacáridos bacterianos del *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, sobre la activación de AKT.
- Caracterización de la vía de transducción involucrada en la activación de AKT.

21. HIPÓTESIS.

• VERDADERA

Si los fibroblastos gingivales humanos son expuestos a los efectos tóxicos de los lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, entonces se inducirá la señalización intracelular con la activación de AKT/PKB

• FALSA

Si los fibroblastos gingivales humanos son expuestos a los efectos tóxicos de los lipopolisacáridos extraídos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, no se realizará la señalización intracelular como una respuesta en la activación de AKT/PKB.

22. MATERIAL

Reactivos	Marca
Acrilamida.	Sigma.
Antibiótico – antimicótico.	Life Technologies.
Anticuerpos fosfo-Akt y Akt.	Upstate.
Bis-acrilamida.	Sigma.
Bisindolilmaleimida.	Sigma.
Dodecil sulfato de sodio.	Sigma
ECL-plus.	Amersham.
Glicina.	Sigma
Medio de Cultivo Dulbecco modificado por Eagle.	Life Technologies.
Metanol	BAKER
Nitrocelulosa.	Bio-Rad.
Película de alto contraste.	Amersham.
Persulfato de amonio	Sigma.
Suero bovino fetal.	Life Technologies.
TEMED.	Sigma.
Trisma base.	Sigma.
U-73122.	Sigma.
Wortmanina.	Sigma.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

23. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Los fibroblastos gingivales se crecieron en diferentes cajas de 6 pozos cada una, en un medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle adicionando suero bovino fetal al 10% , 1% de antibiótico-antimicótico en una atmosfera húmeda y en presencia de 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C. Respecto al tamaño de la muestra que se utilizó fue de 1x10⁶.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Fibroblastos gingivales humanos.

Lipopolisacárido de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

EQUIPO.

EQUIPO	MARCA
Agitador orbital.	Lab line.
Cámara de electroforesis.	Hoeffer.
Cámara de transferencia.	Hoeffer.
Campana de Flujo laminar.	Nuaire.
Centrífuga clínica.	Cole Palmer
Fuente de Poder.	Pharmacia.
Incubadora de dióxido de carbono.	Nuaire.
Microcentrífuga.	Sorvall.
Micro pipetas.	Gilson.
Microscopio de objetivos invertidos.	Olympus.

24. MÉTODO

24.1. CULTIVO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Los fibroblastos gingivales humanos se obtendrán mediante la técnica de explante a partir de encías sanas de pacientes que acudan a la clínica de exodoncia (odontopediatría). Las células se mantienen en medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2mM de glutamina en presencia de 1% antibiótico-antimicótico en una atmósfera de dióxido de carbono al 5.0%.

24.2. DETECCIÓN DE AKT POR ENSAYO DE WESTERN BLOT.

Se estudiaron los efectos de los lipopolisacáridos de A.a sobre la activación de Akt para lo que se realizaron ensayos dosis respuesta y curso temporal. Las células se sembraron en cajas de 6 pozos hasta la semiconfluencia se ayunaron durante 24 hrs. En medio cultivo Dulbecco modificado por Eagle adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico. Al término de la reacción se trataron las células a diferentes tiempos (15 min, 30min, 1h, 2h, 4h) y dosis (0.1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml) con el lipopolisacárido (como se señala en el pie de figuras 1,2,3 en resultados) en DMEM al 2% de suero bovino fetal. Al término se resuspendieron las células en buffer de fosfatos salino pH7.4 ortovanadato de sodio 1Mm (, las células se centrifugaron 10 min. a 4°C y se resuspendieron en 80 µl de buffer de lisis (Tris-HCL 20mM, triton x-100 al 1%, NaCl 137mM, EDTA 2mM), posteriormente se cuantificó la proteína por el método de Lowry, se separó la proteína por electroforesis con gel desnaturalizante al 10% y se transfirieron a nitrocelulosa, posteriormente las muestras se revelaron por quimioluminiscencia.

25. REGISTRO Y PROCESAMIENTO DE DATOS

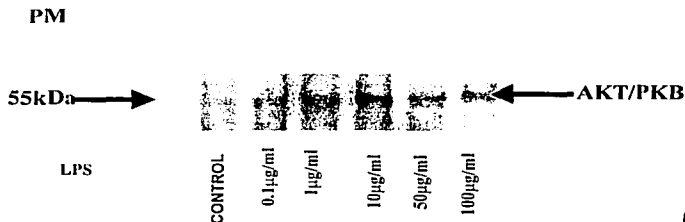
Es importante mencionar, que se realizaron los experimentos en 5 ocasiones colocando 1 como representativo del experimento, con sus respectivos resultados y se analizaron mediante densitometría.

26. RESULTADOS

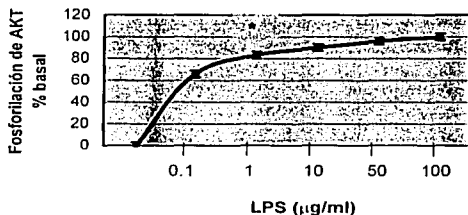
EFFECTO DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE AKT

La serie de experimentos realizados, mediante la incubación de fibroblastos gingivales humanos a diferentes dosis y tiempos con el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, muestra la fosforilación de una proteína de 55 kda. (Fig.1) Akt es esta proteína presente en los fibroblastos gingivales humanos, es una serin-treonin cinasa por que se activa al fosforilarse en el residuo 308 de la treonina y en la serina 473. En nuestros experimentos encontramos que la fosforilación es evidente desde 0.1µg/ml de LPS y es máxima a los 10µg/ml.

A)



B)



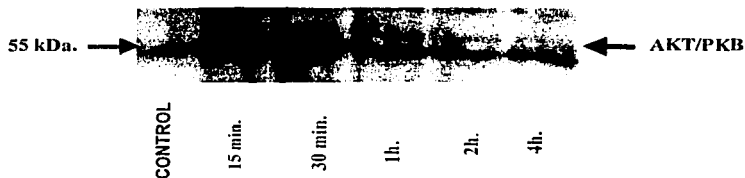
TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN

Fig.1. Dosis respuesta de la infección con LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en cultivos de fibroblastos gingivales humanos.

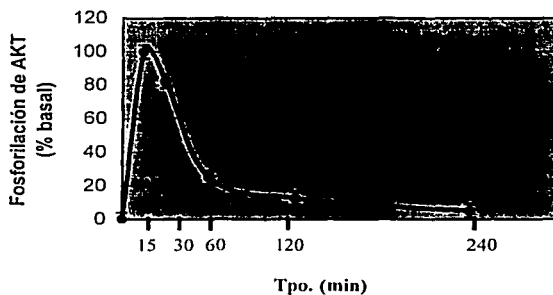
En cajas de 6 pozos se crecieron células de fibroblastos gingivales humanos hasta la semiconfluencia, se infectaron con LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* durante 30 min. A) Carril 1) Control; 2) 0.1µg/ml 3) 1µg/ml 4) 10µg/ml 5) 50µg/ml 6) 100µg/ml. Al término se cuantificó la proteína, se separó en un gel de acrilamida-SDS al 10% y se transfirió en una membrana de nitrocelulosa; posteriormente se reveló dicha membrana por quimioluminiscencia, B) Análisis densitométrico de la fosforilación de AKT, el resultado representa la media de 3 experimentos realizados por separado y el error estándar * mostró una p menos a 0.05.

Posteriormente decidimos realizar ensayo Curso Temporal con el propósito de establecer el tiempo de fosforilación, en donde encontramos que la máxima fosforilación se presenta a los 30 minutos de tratamiento con el LPS (10 μ g/ml) y disminuye a tiempos mayores, posiblemente por la activación de fosfatasa citoplásmicas.

A)



B)



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

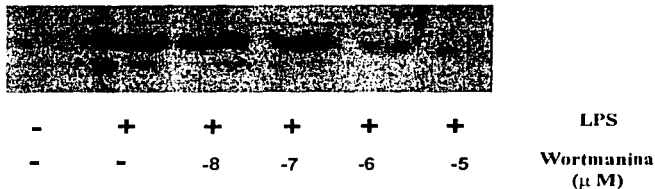
Fig. 2. Curso temporal de la infección con LPS de *Actinobacillus actinomycetem comitans* en cultivos de fibroblastos gingivales humanos.

Se crecieron en cajas de 6 pozos células de fibroblastos gingivales humanos que estuvieran hasta la semiconfluencia, se infectaron con LPS de *A. Actinomycetem comitans* (10 μ g/ml) durante 30 min. A) Carril 1) Control; 2) 15 min. 3) 30 min. 4) 1h. 5) 2h. 6) 4h. Al término se cuantificó la proteína, se separó en un gel de acrilamida-SDS al 10% y se transfirió en una membrana de nitrocelulosa; posteriormente se reveló dicha membrana por quimioluminiscencia. B) El análisis densitométrico de la fosforilación de AKT muestra la representación de la media de 3 experimentos realizados por separado.

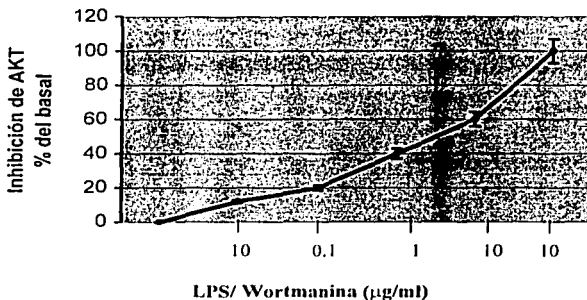
En la tinción con rojo de ponceau no se encontraron diferencias en cuanto al contenido de la proteína.

Posteriormente y con el propósito de demostrar que la proteína fosforilada corresponde a AKT, las células se preincubaron con wortmanina a las dosis indicadas durante 60 min. Y se estimularon con LPS (10 $\mu\text{g/ml}$).

A)



B)



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig.3 Dosis respuesta al inhibidor Wortmanina por la infección con LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en cultivos de fibroblastos gingivales humanos.

Se crecieron en cajas de 6 pozos células de fibroblastos gingivales humanos que estuvieran hasta la semiconfluencia, se infectaron todos los pozos con LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) de *A. actinomycetemcomitans* durante 30 min. Preincubamos con el inhibidor Wortmanina del pozo 3 al 6 durante 60 min. Con la siguientes dosis. **A)** Carril 1) Control, 2) LPS, 3) wor. 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 4) Wor. 1 $\mu\text{g/ml}$, 5) wor.10 $\mu\text{g/ml}$, 6) 100 $\mu\text{g/ml}$. Al término se cuantificó la proteína, se separó en un gel de acrilamida-SDS al 10% y se transfirió en una membrana de nitrocelulosa; posteriormente se reveló la membrana con quimioluminiscencia. **B)** El análisis densitométrico de la inhibición de AKT muestra la representación de la media de 3 experimentos realizados por separado

SEÑALIZACIÓN DE AKT

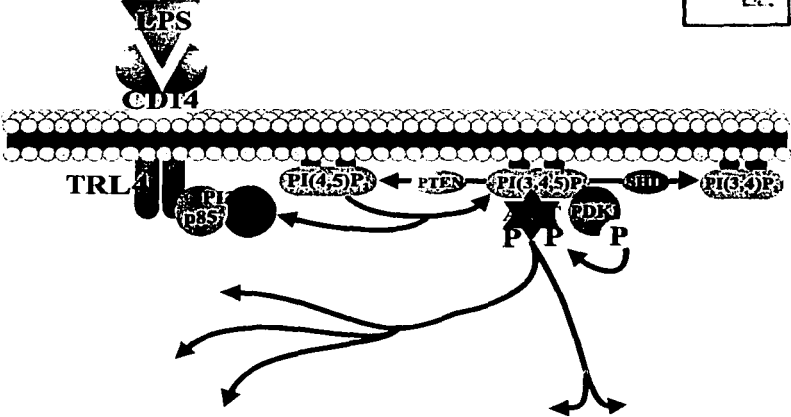


Fig. 4 Modelo experimental, en donde se muestra que es activada Akt/PKB en células de Fibroblastos gingivales humanos.

27. DISCUSIÓN

Los lipopolisacáridos presentan receptores en la superficie de los fibroblastos gingivales es una proteína ligante específica (proteína de fase aguda de síntesis hepática) denominada proteína ligante de lipopolisacáridos (LBP). Este complejo LPS-LBP entra en contacto y se presenta la activación celular.

Esta interacción es mediada por un receptor específico de membrana (CD14) el cual al ser activado transmite la señal intracelular a través de una proteína transmembranal (TLR4 para Gram negativos y TLR2 para Gram positivos) las cuales inducen la activación de mediadores intracelulares (proteína cinasas y NFκ B) en este caso la proteína cinasa B o AKT que inician los procesos de transcripción génica.

En la presente investigación demostramos, que Akt es un componente importante en la señalización de los lipopolisacáridos. Este estudio fue realizado en células cultivadas de Fibroblastos gingivales humanos.

PI3-cinasa y su efector PDK-1, son factores importantes con respecto a la activación y fosforilación de PKB/Akt por lo que utilicé previa investigación (PI3-K, PDK-1) realizada por mi compañero Sergio Orozco (integrante del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Odontología), como punto de partida, para determinar dicha actividad de la antes mencionada Akt.

El LPS induce la activación de PI3-K, y mediante una forma de cascada que realiza la activación de PDK-1, induciendo así a la activación y fosforilación de Akt; por otro lado algunos investigadores consideran que el Factor de crecimiento epidermal (EGF) inducen a la producción de ácido gástrico que es un factor importante para la activación de Akt gástrico,⁴⁶ con esto nosotros podemos analizar que PKB/Akt puede activarse no solo por un tipo de proteína específica.

La muerte celular programada, es un proceso de autodestrucción celular controlada que permite al organismo su correcta morfogénesis, así como su renovación y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia; esta muerte es de vital importancia, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida adulta.

La muerte celular es un proceso regulado a nivel genético, las células expresan los componentes moleculares que les van a permitir "suicidarse" dependiendo de un balance de señales procedentes del medio ambiente celular. La caracterización de este complejo mecanismo ha cambiado profundamente la comprensión de numerosas patologías humanas. Por ejemplo, el cáncer frecuentemente se desarrolla porque disminuye la capacidad de muerte celular, mientras que un exceso de muerte celular desencadena patologías degenerativas.

Recientes investigaciones señalan que la Vía Akt representa un papel primordial con respecto a las señales de supervivencia celular, quien supone la fosforilación directa de Bad que se mantiene unido a la proteína 14-3-3 sin ningún problema, por el contrario, Bad no fosforilado se une a Bcl-2 impidiendo que ejerza su acción de supervivencia.^{35,36,37} Es por este motivo que para nosotros es importante investigar más sobre AKT, ya que a las enfermedades inflamatorias, degenerativas como es el caso de la periodontitis, y los episodios de isquemia aguda, se les podía tratar con fármacos que retarden la apoptosis y por lo tanto induzcan a la supervivencia celular; y/o utilizar un inhibidor específico para controlar la actividad de AKT.

Akt/PKB es una serin-treonin cinasa a la cual le falta mucho por investigar ya que Coffey, Jin y Woodgett, señalan que también está implicada como mediadora en la regulación de glucosa.

Con respecto a los experimentos realizados mediante la incubación de fibroblastos gingivales humanos a diferentes dosis y tiempos con *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se ha demostrado la fosforilación de una proteína con peso molecular de 55 k Da. conocida como Akt/PKB; como se observó en los resultados obtenidos mediante ensayos de Dosis respuesta de la infección con LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en cultivos de fibroblastos gingivales humanos, observamos que la infección de las células a diferentes dosis del LPS bacteriano no altera el patrón de fosforilación de dicha proteína. Por otro lado, otro resultado importante fue el ensayo Curso temporal LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en cultivos de fibroblastos gingivales humanos en donde se demostró la presencia de Akt y que se fosforila desde tiempos cortos de 15 y 30 minutos hasta tiempos largos de 1, 2 horas declinando en las últimas 4 horas por la activación de fosfatasa. El ensayo de Dosis respuesta al inhibidor Wortmanina por la infección con LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en cultivos de fibroblastos gingivales humanos también nos marca que tan importante es este fármaco ya que observamos que conforme se aumenta la dosis de Wortmanina se va inhibiendo la proteína de AKT/PKB.

28. CONCLUSIONES

Como conclusiones tenemos que:

- La fosforilación de Akt está inducida, por la presencia de lipopolisacáridos de *actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- Al infectar cultivos de Fibroblastos gingivales humanos con LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, se observó la presencia de PKB/Akt que se fosforila desde tiempos cortos de 15 y 30 minutos hasta tiempos largos de 1, 2 horas declinando en las últimas 4 horas por la activación de fosfatasa.
- En la fosforilación de la vía Akt, observamos que conforme se aumenta la dosis de Wortmanina se va inhibiendo AKT.

29. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Blanton, K. J., G. D. Biswas, J. Adams, D. W. Dyer, S. M. Davis, G. G. Koch, P. K. Sen, and P. F. Sparling. 1990. Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. *J. Bacteriol.* 172:5225-5235.
- 2) Bramanti, T. E., and S. C. Holt. 1990. Iron-regulated outer membrane proteins in the periodontopathic bacterium, *Bacteroides gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. COMMUN.* 166:1146-1154.
- 3) Harmuth-Hoene, A.-E., M. Vladar, and R. Ohrtmann. 1969. Fe (III)-exchange between transferrin and chelates in vitro. *Chem. Biol. Interactions.* 1:271-283.
- 4) Konopka, K., A. Bindereif, and J.B. Neilands. 1982. Aerobactin- mediated utilization of transferrin iron. *Biochemistry* 21:6503-6508.
- 5) Ma, J., and T. J. Inzana. 1990. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to a 110,000-molecular-weight hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 28 :1356-11361.
- 6) Malek, R. L., AND D. W. Dyer. Growth stimulation of *Pophyromonas gingivalis* by porphyrins and transferrin, abstr. B-299, p.79. Abstr. 93rd Gen. Meet Am. Soc. Microbiol., 1993.
- 7) F. A. Carranza, D. A. Perry Manual de Periodontología Clínica. ed. 1ª, . Editorial. Interamericana.1988.
- 8) Thomas F. Flemming, Compendio de Periodoncia ed. 1ª, Editorial Masson, S.A. Barcelona 1995, pp 2-6.
- 9) Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Tercera edición. Edit. Panamericana. 2000.
- 10) Genco, Goldman, Periodoncia.. Primera edición. Editorial: Interamericana. Mac Graw- Hill. 1993.
- 11) Alejandro Divo. Microbiología Medica ed.3; Editorial ineramericana, 1990; pag. 9-28.
- 12) Robert Fuerst, Microbiología; ed.14 Editorial Interamericana, México, 1981, pag. 43-59
- 13) Dzink J. L. Et al; The predominate cultivable microbiota of active and inactive lesion of destructive periodontal disease. *J. of clin Perio.* 15:316, 1998.
- 14) Slots S.J., Litsgarten M.A.; *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedium* and *Actinobacillus actinomycetencomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Perio.* 13:85, 1988.
- 15) Van Win Kel hoff A. J., Van Steenberge JJ. The role of black pigmented bacteroides in human oral infection *J. of clin. Perio* 15: 145, 1998.
- 16) Jawetz, Melnick y Adelberg. Bacteriología Médica. Edición 15 . Editorial Manual Moderno. 1996.
- 17) Molecular Pathogenesis of Periodontal Disease Edited BY Robert Genco et al. 1994 American Society for Microbiology, Washington. Chapter 7,
- 18) Hashimoto, E., E. Takio et al 1982. Amino acid sequeense at a ATP bding site of Cgmp- dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257: 727-733.

- 19) Mausumee Guha, Nigel Mackman. 2000. Review Article: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* 13 (2001) 85-94.
- 20) Kraig, E., T. Dailey, and D. Kolodrubetz. 1990. Nucleotide sequence of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: homology to the α - hemolysin/leukotoxin gene family. *Infect. Immun.* 58: 920-929.
- 21) Lally, E. T., J. R. Kieba, D. R. Demuth, R. Rosenbloom, et al 1989. Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 256-262.
- 22) Gregory, R.L., D. E. Kim, J. C. Kindle, L. C. Hobbs, and D. R. Lloyd. 1992. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. *J. Periodontal Res.* 27: 176-183.
- 23) Ramadori G, Meyer zum Buschenfelde K. H, Tobias P. S, Mathison J. C. Y Ulevitch R. J. 1990. Biosynthesis of Lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology* 58: 89-94.
- 24) Higashida Guerrero Carolina, Gutiérrez Vegas Gloria, Lipopolisacáridos: extraordinarias moléculas activadoras de señales de transducción celular.
- 25) Pujades Cristina, 2000, ¿Cómo responde la célula a su entorno?, Biomedica Noticias. Rubes Editorial.
- 26) Chan, A.C., Pleiman, C.M. & Clark, M.R., 1994, 'The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T-cell antigen receptor signal transduction', *Annual Review of Immunology*, 12:555.
- 27) Margini A. Ricardo, 1997, Transducción de señales, *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy*, Vol. 6. No. 36.
- 28) Flores Jorge, Antonio Alonso, García colín Leopoldo, Garza Tomás, Halfter Gonzalo, et al., *Receptores: los oídos de las células*, La ciencia desde México, ed 2ª. Editorial Fondo de Cultura Económica, 1996.
- 29) Hanks, S. K., AND Hunter, T. 1995. *faseb j.* 9,576.
- 30) Chan, T. O. Rittenhouse, S.E., and Tschlis, Rev. *Biochem.* 68, 965-1014.
- 31) Okano, J. Gaslightwala, I., Birnbaum, M.J. 2000 *J. Biol. Chem.* 275,30934-30942,
- 32) Kohn. A.D., Summers, S.A., Birnbaum, et all. 1996, *J. Biol. Chem.* 271,31372-31378.
- 33) Alessi, D.R, Andjelkovic, M., Caudwell, B., et all, 1996. *EMBO J.* 15,654-670.
- 34) Monick M. Martha, Carter Brent A., Robeff K. Pamela, Flaherty M. Dawn, Peterson W. Michael, and Gary W. Hunninghake, 2001, Lipopolysaccharide Activates Akt in human Alveolar Macrophages Resulting in Nuclear Accumulation and Transcriptional Activity of β - Catenin. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 4713-4720.
- 35) Hengartner, M.O., Horvitz, H. R. 1994, *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.

- 36) Chao, D.T., Korsmeyer, S.J. 1998. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu. Revv Immunol.* 16, 395-419.
- 37) Olvai, Z.N., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- 38) Green, D.R., Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- 39) Kulik, G., WEBER, M.J. 1998. Akt-dependent and -independent survival signalling pathways utilised by insulin-like growth factor I. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6711-6718.
- 40) Parrizas, M., Saltiel, A.R., Leroith, D. 1997. Insuline-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phophatidylinositol 3- kinase and mitogen-activated protein kinase pathways, *J. Biol. Chem.* 272, 154-161.
- 41) Yao, R., Cooper, G.M. 1995. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003-2006.
- 42) Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. 1997. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- 43) Zha, J., Harada, H., YANG, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. 1996. Serine phosphorylation of death agonista Bad in response to survival factor results in binding to 14-33 not BCL-x_L. *Cell* 87, 619-628.
- 44) Sugiyama A. Arakaki R., Ohnishi T., Arakaki N., Daihuhara 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.
- 45) Morrison DC., Ryan JL. 1992 Eds. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*. Vol. I. Boca Raton CRC Press.
- 46) Andrea Todisco., Nonthalee Pausawaşdi., Saravanan Ramamoorthy, et al, 2000, Functional of Protein Kinase B/AKT in Gastric Acid Secretion. *The Journal of biological Chemistry*, vol 276, No. 49: 46436-43442.

ESTABLISHED NOV 24 1954
DE LA BIBLIOTECA