

01421
259

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGIA



EFFECTO DE LA ADHERENCIA DE *Actinomyces naeslundii* SOBRE LA MORFOLOGIA, ORGANIZACION DEL CITOESQUELETO Y ACTIVACION DE SEÑALES INTRACELULARES EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A :
MIGUEL PEREZ GARZON

DIRECTORA: GLORIA GUTIERREZ VENEGAS

MEXICO, D. F.

FEBRERO 2003

A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

de la Dirección General de Bibliotecas •
 a difundir en formato electrónico e impreso el
 contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miguel Ravel Garzon

TEMA.

PÁG.

1. Resumen.	1
2. Introducción.	2-3
3. Antecedentes.	4
3.1. Periodonto.	5
3.2. Encía.	5-8
3.3. Cemento radicular.	9
3.4. Ligamento periodontal.	9
3.5. Hueso alveolar.	10
3.6. Patogenia de la enfermedad periodontal.	11-13
3.7. Placa dental.	13-14
3.8. Papel de las bacterias en la enfermedad periodontal.	14-18
3.9. Mecanismos de microbiología oral adherencia colonización y agregación.	18-20
3.10. Mecanismos de defensa inicial.	21
3.11. Sistema tipo III de secreción en la patogenicidad bacteriana.	21-22
3.12. Formación de las lesiones A/E.	22
3.13. Integrinas.	23
3.14. Uniones integrinas ligandos.	24
3.15. Funciones de las integrinas.	24
3.16. Receptores PRP.	25
3.17. El citoesqueleto.	25
3.18. Estructura y función de los filamentos de actina.	26
3.19. Ensamblado y desensamblado de los filamentos de actina.	27-29
3.20. Organización de filamentos de actina.	29-30
3.21. Asociación de los filamentos de actina con la membrana.	30
3.22. Protrusiones de la superficie celular.	31
3.23. Gateo celular.	31
3.24. El cortex de actina genera la polaridad celular.	32
3.25. Filamentos intermedios.	32
3.26. Proteínas filamentosas intermedias.	32-33
3.27. Microtúbulos.	33
3.28. Estructura, ensamble, dinámica y función de los microtúbulos.	34-35
3.29. Señales de transducción y el citoesqueleto.	36
3.30. Integrinas y señales de transducción.	37
3.31. Regulación del citoesqueleto de actina.	38
3.32. Vía de Ras, Raf y MAP cinasa.	39-41
3.33. Bacterias que modifican el citoesqueleto.	41
3.34. Características de bacterias gram positivas.	41
3.35. Genero <i>Actinomyces</i> .	42
3.36. <i>Actinomyces naeslundii</i> .	43-45
3.37. Adherencia de <i>Actinomyces naeslundii</i>	46

FECHA: 13/Feb/05
 LUGAR: [Signature]

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

4. Planteamiento del problema.	47
5. Justificación.	48
6. Objetivos.	49
6.1. Objetivo general.	49
6.2. Objetivos específicos.	49
7. Hipótesis.	49
8. Material y métodos.	50-54
9. Resultados.	55-61
10. Discusión.	61-62
11. Conclusión	63
12. Anexos	64
12.1. Microscopía de campo claro	64
12.2. Microscopía electrónica de transmisión.	64
12.3. Microscopía electrónica de barrido.	64
12.4. Microscopía confocal.	64
12.5. Microscopía de fluorescencia.	65
12.6. Técnica de inmunohistoquímica.	66
12.7. Tinción de gram.	66
12.8. Medios de cultivo bacteriano.	67
12.9. Presupuesto.	68
13. Bibliografía.	69-74

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México.**

Por abrirme las puertas y enseñarme los valores de esta máxima casa de estudios.

A la **Dra. Gloria Gutiérrez Venegas**

Por haberse interesado en mi vida, compartir sus conocimientos y ser la principal persona que apoyó este proyecto.

A **MIS COMPANEROS DEL LABORATORIO DE BIOQUIMICA.**

Ana Guadalupe Granados Ontiveros, Santa Rita Arroyo Cruz, Silvia Maldonado Frías, Cesar Esquivel Chirino, Ulises Tafoya, Carlos Vázquez†, Armando Flores Lides, Blanca Delgado Acevedo, Perla Kawasaki Cárdenas, Carla Portillo Garces, Héctor Morales, Mauricio Peña Parraga, María de los Ángeles Cárdenas.

Por haberme brindado su amistad y cariño a esta persona tan enojona.

A **MIS AMIGOS EN EL INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR.**

Jorge Albero Sepúlveda, Javier Gallegos Infante, Raúl Zarate Zarza y Juan Barbosa
Por haberme brindado apoyo en técnicas microscópicas, apoyo bibliográfico y en computación y la enseñanza en cosas que desconocía totalmente.

A **MIS AMIGOS DE LA CARRERA.**

Nallely Lara Lobera, Joaquín Canseco López, Karina Ruiz Vergara, Rogelio González Gonzáles, Tania Baena Monroy, Jareni Sánchez Hernández, Alejandro Ash Sigall, Sandra Sánchez Portillo, Donaji Domínguez Aguilar, Rassany Aline Orozco Barreto, Luis Antonio Vázquez.

Por que a través de ustedes aprendí muchas cosas sobre lo que quiero en mi vida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS.

A MI MAMA:

Con mucho cariño y amor por educarnos a mi hermano y a mi, por ser una mujer que siempre a trabajado y por tener el deseo de superarse constantemente.

A MI ABUELITA.

Por darnos tanto amor y ayudarle a mí mama en nuestra formación.

A MI HERMANO.

Por ser una persona tan inteligente, aunque a veces nos enojamos te agradezco ser mi hermano.

A PAPA. †

Que nos cuida desde donde esta.

A LA DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.

Le agradezco su amistad y su preocupación por mí y por mi familia durante todo este tiempo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. RESUMEN.

La adherencia bacteriana es el primer paso para la colonización y posterior infección de una superficie bucal teniendo un papel crucial en la presencia de salud o enfermedad.^{40,42,45,57} Entre las enfermedades bucales más generalizadas entre la población existe la gingivitis y la periodontitis⁵⁰, la cual tiene una etiología relacionada con el acumulo de microorganismos en un conglomerado llamado placa bacteriana que en su conjunto produce la destrucción de los tejidos de soporte del diente así como el desarrollo de caries dental⁴⁸. La placa dental esta formada por mas de 300 especies de bacterias cada especie juega con un papel importante en la ecología de la boca⁵⁰, entre este gran grupo se ha encontrado a la especie *Actinomyces naeslundii* que se identifica como una bacteria de forma morfología irregular y micelar, gram positiva, anaerobia facultativa, esta bacteria tiene características especiales que la involucran especialmente en las primeras fases de la enfermedad periodontal.

En esta investigación se estudia las alteraciones que existen en el efecto de adhesión de *Actinomyces naeslundii* en los fibroblastos gingivales humanos por medio de la infección de *Actinomyces naeslundii*. Cuando la bacteria se adhiere a la célula lo hace por diferentes medios entre estos se encuentra la asociación a receptores específicos llamados integrinas las cuales tienen conexiones con el citoesqueleto que se encuentra formado por actina y cuya función es proveer forma, estructura, función y movimiento a la célula. Una forma de observar la estructura de los filamentos de actina es mediante la utilización de faloidina acoplada a fluoresceína.

En nuestros ensayos de infección con *Actinomyces naeslundii* en los fibroblastos gingivales humanos se realizaron ensayos de microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, y marcaje específico de fluorescencia para actina y Erk.

Como resultados encontramos que la infección de *Actinomyces naeslundii* en cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos conduce a que las bacterias se adhieran, esta adherencia se produce por medio de una interacción entre la superficie celular y la bacteria que verificamos por medio de la microscopía de transmisión, por otra parte la adherencia ocasiona que las células presenten fibras de stress y abultamientos de actina que se distribuyen a lo largo de la célula. Por medio de ensayos de anticuerpo acoplado a fluorescencia se verifico que la célula reacciona ante la infección activando señales intracelulares por medio de la translocación al núcleo de Erk, esta señal es de suma importancia para la célula ya que indica la fosforilación de muchas proteínas y la modificación de la forma y función del citoesqueleto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. INTRODUCCIÓN.

El estudio de la patogénesis microbiana se ha expandido considerablemente en la última década lo que ha permitido comprender las interacciones parásito-huésped y desarrollar investigaciones que muestren los mecanismos mediante los cuales se desarrolla la enfermedad. La multitud de bacterias que interactúan se pueden dividir en dos grandes grupos gram positivos y gram negativos, cada cual tiene su rol muy específico en el desarrollo de la enfermedad. Las bacterias gram positivas se encuentran en condiciones de salud y en las primeras fases de la enfermedad periodontal, no así los gram negativos que se relacionan con mayor frecuencia al proceso de la enfermedad periodontal.

Durante toda la vida, todas las superficies del cuerpo están expuestas a la colonización por una amplia gama de microorganismos. En general, la flora microbiana establecida vive en armonía con el huésped. La renovación constante de las superficies debida a la descamación previene la acumulación de grandes masas de microorganismos. La acumulación y el metabolismo de las bacterias sobre las superficies bucales están considerados como la causa primaria de caries dental, gingivitis, periodontitis, infecciones periimplantares y estomatitis.⁴⁶

La capacidad de adherirse a las superficies es una propiedad general de casi todas las bacterias depende de una intrincada serie de interacciones, a veces muy exigentes, entre la superficie por colonizar, los microorganismos y el medio líquido.⁴⁸

Las primeras bacterias en colonizar las superficies bucales son cocos grampositivos y anaerobios facultativos, en la segunda fase se establecen los bacilos grampositivos, y en la última etapa predominan los filamentos grampositivos, especialmente los *Actinomyces*.⁴⁷ Sobre la superficie de la membrana citoplásmica de las bacterias grampositivas existen receptores que permiten la posterior adherencia de bacterias que tienen menor capacidad de adherirse directamente como las gramnegativas.⁴⁸

Los *Actinomyces* comprenden el grupo más abundante de especies presentes en la biopelícula dental y se han identificado tanto en placa supragingival como en la subgingival, pero hasta el momento se desconoce su papel en las distintas condiciones clínicas.⁵ Dentro de la clasificación *Actinomyces* se ha estudiado la importancia de *Actinomyces naeslundii* por tener la capacidad de ocasionar una forma de periodontitis muy destructiva en modelos experimentales en ratas lo que sugiere que este microorganismo participa de manera importante en la patogénesis de la enfermedad.²³

Por otra parte *A. naeslundii* coloniza preferentemente la lengua y otras superficies mucosas, inclusive aún antes de la erupción de los dientes.⁽²⁰⁾ En animales este microorganismo induce lesiones periodontales y caries radicular. La adherencia a la superficie de la mucosa la efectúa a través de la lectina tipo 2 específica para β -galactósidos y galactosumina y está asociada a actinomicosis.⁴⁸

Algunos autores han demostrado que *A. naeslundii* se adhiere a proteínas salivales secretadas por las glándulas parótida y submaxilar a través de receptores sensibles a N-acetilgalactosamina β (GalNAc β)⁽³⁹⁾ pero hasta el momento es poco claro el papel de este microorganismo en la ecología de la placa dentobacteriana y su papel en la enfermedad.

La capacidad de las células eucariotas de adoptar una gran variedad de formas y llevar a cabo movimientos direccionales y coordinados depende de una red muy compleja de filamentos proteicos que se extiende a través del citoplasma. Esta red recibe el nombre de citoesqueleto, aunque, a diferencia del esqueleto óseo, es una estructura sumamente dinámica que se reorganiza continuamente mientras la célula cambia de forma se divide y responde a su entorno.

De hecho, el citoesqueleto podría llamarse también cito musculatura ya que es responsable directo de movimientos tales como el deslizamiento de las células sobre un sustrato, la contracción muscular y todos los cambios de forma que ocurren durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, también proporciona la maquinaria para los movimientos intracelulares, tales como el transporte de los organelos y la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Las bacterias carecen, aparentemente de citoesqueleto, por lo que podría haber sido un factor decisivo en la evolución de las eucariontas.

Las diversas actividades del citoesqueleto dependen de tres tipos de filamentos proteicos los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Cada tipo filamentos esta formado por una subunidad proteica distinta: actina para los filamentos de actina, tubulina para los microtúbulos y una familia de proteínas fibrosas relacionadas, tales como vimentina o lamininas para los filamentos intermedios.

La célula eucariótica dispone de miles de millones de proteínas, las cuales constituyen cerca del 60% de su peso en seco En todas las células las proteínas forman complejos funcionales.⁴⁸ El citoesqueleto es el encargado de crear y mantener un nivel de organización muy elevado convierte a la célula en una cosa muy parecida a una ciudad con servicios especializados concentrados en áreas distintas pero totalmente interconectadas mediante vías de comunicación, como las vías de MAP-ERK cinasas.

Cada uno de los tres tipos principales de filamentos proteicos que forman el citoesqueleto es un polímero helicoidal que tiene una disposición diferente en la célula y una función distinta. Sin embargo los tres tipos de filamentos, por si mismos, no pueden ser responsables ni de la forma ni de la longitud de la célula. Las funciones del citoesqueleto dependen de un gran grupo de proteínas accesorias que unen los filamentos a otros filamentos y a otras proteínas y señales intracelulares como lo son las cinasas.

En el interior de la célula existen una infinidad de diferentes moléculas que permiten la vida, entre ellas existe una vía de activación llamada cascada de MAP-ERK cinasa, (MAP cinasa específica de proteína/ ERK significa cinasa de serina treonina), la importancia de la activación de esta vía se basa en que juega un rol importante en el control de la proliferación celular que responde a señales extracelulares y al stress celular, como lo es la infección bacteriana, y además activa GTPases que forman fibras de stress en el citoesqueleto.⁴⁴

3. ANTECEDENTES.

El hombre siempre ha tenido una lucha constante contra las enfermedades infecciosas, grandes investigadores encontraron que los soldados de este ejército invisible eran los microorganismos, estos diminutos seres se encuentran en todas partes, algunos son benéficos para el hombre pero otros son su desgracia y hasta su muerte. La boca es un medio ambiente ideal para las bacterias, se han identificado cerca de 300 especies de las cuales 150 se encuentran en la ecología normal de la flora bucal.⁴⁸

Actinomyces naeslundii se ha identificado como una bacteria de gran importancia al actuar como un eslabón que permite la colonización de bacterias gramnegativas, además esta bacteria se ha señalado con la capacidad de producir por sí misma enfermedad periodontal y caries.

La causa principal de la pérdida dental es ocasionada por la enfermedad periodontal cuyo origen principal es la infección bacteriana. Esta infección tiene varias etapas cada una de estas se caracteriza por una composición definida de bacterianas y una relación específica con el huésped que va de la salud a la enfermedad.

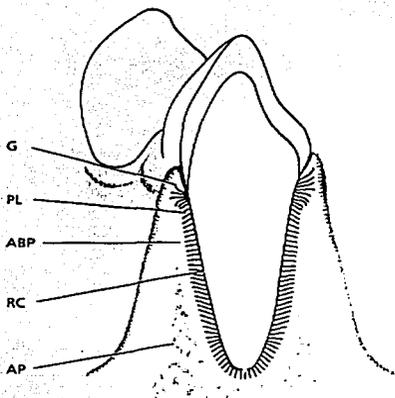
El primer paso para que una bacteria pueda colonizar una superficie es la adhesión. En la enfermedad periodontal la célula que actúa como superficie de adhesión es el fibroblasto gingival humano, el cual en su interior existe el citoesqueleto que se modifica por señales del medio, además las alteraciones en la célula llegan a ser a nivel de biología molecular al activar señales intracelulares y la fosforilación de proteínas.

La importancia del estudio de las modificaciones que causa la adherencia de *Actinomyces naeslundii* sobre el fibroblasto es de suma importancia ya que dependiendo del grado de las alteraciones en la función y estructura de la célula se observaran cambios en la encía y al comprender que proteínas actúan en estos cambios se pueden encontrar fármacos para revertir el proceso de enfermedad.

3.1. PERIODONTO.

Se denomina periodonto al conjunto de tejidos que rodean y soportan al diente. La función principal del periodonto es unir al diente óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal, la estructura periodontal esta conformada por varios tejidos que comprenden: ⁴⁸

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

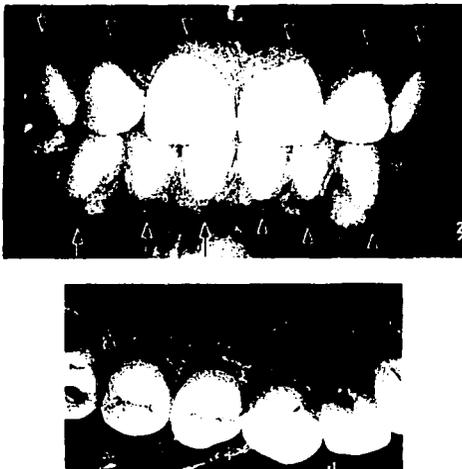


*Fig 1. Esquema de las estructuras del parodonto: la encía(G), ligamento parodontal,(PL), el cemento radicular (CR), y el hueso alveolar propio (ABP) y la apófisis alveolar (AP.)
Periodontología Clínica e implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring.*

3.2. ENCÍA.

La encía es esa parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. La encía normal se caracteriza clínicamente por su color rosado y consistencia firme; el margen gingival tiene un contorno festoneado. Las papilas dentarias están firmes no sangra por un sondeo suave y llenan el espacio por debajo de las áreas de contacto. Las encías tienen a menudo un aspecto puntiagudo y el margen es fino como el borde de un cuchillo entre el diente y el tejido blando. ⁵⁰

Al hablar de la encía no solo se refiere a una porción de tejido definido, es en realidad un "complejo" con muchas regiones y funciones especializadas a continuación se explicara brevemente cada una de estas.



*Fig. 2. Imagen de la encía con un aspecto sano.
Periodontología Clínica e implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring.*

Encía marginal:

Es la parte de la encía situada alrededor del cuello dentario. Tiene normalmente alrededor de 1mm y forma la pared externa del surco gingival. Está dividida por la cresta del margen gingival en dos vertientes: una interna, que da contra el diente, y otra externa que se encuentra cubierta por un epitelio escamoso estratificado y en la mayoría de los casos alcanza paraqueratinización.⁴⁹

Surco gingival:

Está situado entre el diente y la encía marginal. Tiene una profundidad de 1 a 3 mm. El surco está cubierto por un epitelio no queratinizado, que se extiende desde la cresta del reborde gingival hasta la zona más coronaria del epitelio de unión.⁴⁹

Encía insertada:

Se extiende entre la encía marginal y la mucosa oral de revestimiento de la que la separa la línea mucogingival. Está unida firmemente al diente y al hueso alveolar subyacente. Esta mucosa se caracteriza por su superficie lisa y de color más rojizo y por la falta de queratinización, no suele ser tan resistente a la fricción. La encía insertada tiene una superficie punteada de color rosado y un ancho variable; es más ancha en el sector incisivo (3.5 a 4.5 mm) y disminuye hacia los sectores posteriores.⁴⁹

Papila gingival:

Es la parte de la encía que se sitúa en el espacio interproximal creado por los dientes adyacentes en contacto. Puede ser deprimida en la zona central, debajo del punto de contacto, con dos papilas más elevadas en vestibular y lingual / palatino. La papila gingival esta integrada por encía marginal e insertada en cantidades variables, de acuerdo con el tipo de contacto de los dientes contiguos. La encía esta constituida por un sector central de tejido conectivo fibroso cubierto por un epitelio escamoso estratificado.⁴⁹

Unión dentogingival:

La encía se une al diente por medio de sus dos tejidos: epitelial y conectivo. El epitelio de unión se localiza apical al epitelio del surco y mide aproximadamente 1-2 mm de longitud. Este epitelio indica el nivel de la inserción de la encía y está formado por la reunión del epitelio bucal con el epitelio reducido del esmalte durante la erupción dental.⁵⁰

Histológicamente se observa que las células del epitelio escamoso estratificado se unen entre sí por medio de estructuras microscópicas llamadas desmosomas, que proveen una unión firme, al tiempo que permite a las células un movimiento independiente para desplazarse a la superficie.⁴⁷

Las células epiteliales basales se unen al tejido conectivo subyacente por medio de hemidesmosomas y una lámina basal. La adherencia del epitelio al esmalte o al cemento se hace por un medio similar que permite el desplazamiento de las células del epitelio de unión, que sufren un continuo recambio, hacia su descamación en el surco gingival, y el pasaje del fluido gingival.⁴⁹

Fluido gingival:

El surco gingival y la unión epitelio-diente son bañados por un fluido gingival o crevicular, proveniente del tejido conectivo y que tiene una doble función: a) el arrastre mecánico de partículas tisulares o externas introducidas y b) la defensa inmunitaria, por la presencia de anticuerpos. Por otra parte, contiene también proteínas plasmáticas que aumentan la adherencia del epitelio al diente.⁴⁸

Tejido conectivo gingival: El tejido conectivo está constituido por:

- *Fibras de colágeno.*

Que soportan el reborde gingival y lo mantienen unido al diente y al hueso alveolar subyacente. Las fibras de colágeno forman fuertes cordeles que unen y sostienen los tejidos, dando origen a unidades funcionales. Su estructura consta de tres cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí, formando la molécula básica de colágeno. Las moléculas se agregan por los lados, dando lugar a filamentos de colágeno que se acumula, a su vez, para formar la fibrilla de colágeno. Las fibras de colágeno de la encía están compuestas por numerosas fibrillas, unidas entre sí por los proteoglicanos.⁴⁸



- **Sustancia fundamental intercelular.**

Esta entidad esta formada principalmente por mucopolisacáridos y glucoprotefnas. Estas sustancias contribuyen a la regulación de la distribución del agua, electrolitos y metabolitos en los tejidos.⁴⁸

- **Células.**

Las células plasmáticas, los fibroblastos, las células cebadas y los linfocitos son las células más importantes del tejido conectivo gingival.⁵⁰

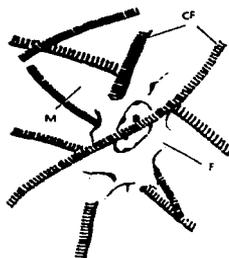


Fig. 3. El fibroblastos se encuentra embebido en una matriz extracelular (M) rica en fibras de colágeno.(CF.)

Periodontología Clínica e implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring.

- **Vasos sanguíneos.**

La vascularización del tejido periodontal proviene de las ramas de las arterias alveolares superior e inferior.⁵⁰

- **Nervios.**

La inervación de la encfa procede de las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino.⁴⁸

3.3. CEMENTO RADICULAR.

Es el tejido mesenquimático calcificado bastante similar al hueso en sus características fisicoquímicas y estructurales, cubre la raíz anatómica del diente y permite que las fibras del ligamento periodontal se inserte a éste. Hay dos tipos de cementos: el cemento acelular o primario y el cemento celular o secundario. El cemento acelular cubre los dos tercios coronarios de la raíz y no contiene células, mientras que el cemento secundario, es más irregular y contiene células llamadas cementocitos. Ambos tipos de cemento están constituidos por una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas colágenas. La inserción de las fibras principales del ligamento periodontal en el cemento, se hace por medio de la incorporación en el cemento de los extremos de fibras principales a esta porción de la fibra se llama *fibra de Sharpey*.⁴⁷

3.4. LIGAMENTO PERIODONTAL.

Es el tejido fibroso que une al diente y hueso. Sus funciones más importantes son: a) mecánica, dan soporte al diente, permiten movimientos de éste dentro de los alvéolos y amortiguan la presión ejercida al hueso durante la masticación, b) genética, formadora de hueso y cemento y c) nutritiva y sensorial, al proveer nutrición e inervación al cemento y hueso.⁴⁸

Este tejido está formado en su mayor parte por fibras colágenas llamadas fibras periodontales, que se disponen en los siguientes grupos:

-Fibras crestodentales:

Se extienden desde la cresta ósea, en dirección oblicua hacia la corona. Su función principal es impedir la extrusión del diente.⁴⁸

-Fibras oblicuas:

Ocupan la mayor parte del ligamento periodontal y siguen una dirección oblicua hacia apical de hueso a cemento. Sirven para detener la intrusión del diente.⁴⁸

-Fibras apicales:

Ocupan las zonas apicales en forma radial. No existen en raíces incompletamente formadas.⁴⁸

-Fibras de transición:

Son pequeños grupos horizontales entre los haces anteriores.⁴⁸

La célula más común en el ligamento periodontal es el fibroblasto, encargado de sintetizar colágeno. Además, contiene células encargadas de formar y reabsorber cemento (cementoblastos y cementoclastos respectivamente) y de formar y destruir hueso (osteoblastos y osteoclastos, respectivamente).^{48,49,50} El espesor del ligamento periodontal varía con la función del diente. Tiene valores mínimos en el diente fuera de oclusión, llega a duplicarse en el diente en función intensa ya que las fuerzas que se ejercen sobre la corona del diente son transmitidas por el ligamento periodontal al hueso en forma de tensiones. Bajo la presión de las fuerzas oclusales el espacio periodontal es comprimido, lo que provoca el desplazamiento del fluido tisular existente en el

ligamento periodontal, a través de las lamininas de la cortical alveolar, hacia los espacios medulares vecinos.⁴⁸

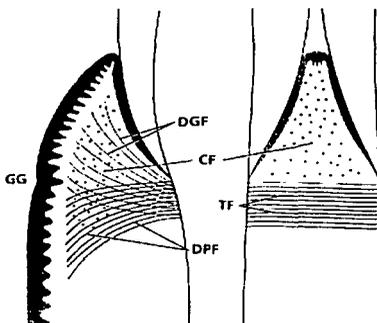


Fig.4. Fibras de colágeno y del ligamento periodontal. Fibras dento gingivales (DGF), fibras transeptales (TF), fibras circulares (CF)
Periodontología Clínica e implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring.

3.5. HUESO ALVEOLAR

Es la parte de los huesos maxilares superior e inferior que forma los alvéolos dentarios y que se continúa con el resto de la estructura ósea.⁴⁸

El hueso alveolar está constituido por una matriz colágena calcificada, con osteocitos encerrados en espacios denominados lagunas. Los osteocitos tienen prolongaciones que se anastomosan, y traen oxígeno y sustancias nutritivas a las células. Las dos terceras partes de la estructura ósea están formadas por minerales (calcio, fosfato, carbonatos, entre otros) en forma de cristales ultramicroscópicos de hidroxipatita.⁴⁸

La matriz ósea, llamada osteoide, es depositada por osteoblastos, que gradualmente quedan encerrados en la matriz que se va calcificando y pasan a ser osteocitos. La reabsorción del hueso está a cargo de las células llamadas osteoclastos las cuales son grandes, multinucleadas y aparecen en erosiones de la superficie ósea llamadas *lagunas de Howship*.^{48,49}

El hueso en general es un tejido en permanente remodelación, siempre con áreas de formación y de destrucción. El equilibrio entre formación y reabsorción mantiene la forma y estructura del tejido óseo.

La forma del tabique óseo interdental depende de la distancia entre los dos dientes adyacentes, de la convexidad de sus caras proximales y de la altura relativa de sus límites amelocementarios

3.6. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Las reacciones inflamatorias e inmunitaria frente a la placa microbiana son características de la gingivitis y la periodontitis. Los procesos inflamatorios e inmunes actúan contra el ataque microbiano y evitan que los microorganismos se extiendan o invadan. Pero a veces esta reacción puede ser perjudicial, cuando las reacciones inflamatorias e inmunitarias que se extienden más allá del fondo de la bolsa pueden afectar al hueso alveolar al destruirlo.⁴⁸

La interacción huésped-microorganismo puede producir gingivitis y periodontitis, en la gingivitis se produce una respuesta inflamatoria ante la acumulación de placa, estas lesiones van acompañadas por una pérdida de colágeno, esta inflamación puede persistir por años sin pérdida apreciable de inserción periodontal.

Dentro de los 10-20 días de acumulación de placa se establecen signos de gingivitis en la mayoría de las personas, que se presenta con un enrojecimiento de las encías, tumefacción y tendencia incrementada del tejido blando a sangrar ante un ligero sondeo, en esta etapa los signos clínicos son reversibles después de la eliminación de la placa.

Las alteraciones clínicas pueden parecer sutiles en las primeras etapas de la gingivitis, pero existen grandes alteraciones a nivel histológico, se producen cambios en la red vascular, los lechos capilares son invadidos por líquido exudado y proteínas y se produce una penetración de células inflamatorias. Al aumentar la infiltración celular, se modifica la composición estructural y celular de los tejidos.

Lesión gingival inicial.

Se produce rápidamente inflamación en cuanto se deposita placa en el diente. En 24 horas son evidentes los cambios acentuados en el plexo microvascular por debajo del epitelio de unión en cuanto llega más sangre al área. Histopatológicamente, es evidente la dilatación de las arteriolas, capilares y vénulas. La presión hidrostática dentro de la micro circulación crece y se forman brechas intercelulares entre células endoteliales capilares adyacentes. El resultado es un incremento de la permeabilidad del lecho microvascular, de modo que se exudan líquidos y proteínas hacia los tejidos.^{11,48}

Lesión gingival temprana.

La lesión gingival temprana, o precoz, se produce aproximadamente siete días después de acumulación de placa, los linfocitos y neutrófilos constituyen la infiltración leucocitaria predominante en esta etapa y se observan muy pocos plasmocitos. Dentro de la lesión los fibroblastos degeneran; probablemente se produce esto por apoptosis y sirve para eliminar a los fibroblastos del área lo cual permite una mayor infiltración leucocitaria.^{48,49}

Lesión gingival establecida.

Hay un incremento del exudado líquido y migración de leucocitos hacia los tejidos y la hendidura gingival. Clínicamente se presenta una tumefacción edematosa mayor que la gingivitis temprana. Durante este periodo, el epitelio dentogingival continúa proliferando y el retículo epitelial se extiende más profundamente en el tejido conectivo en un intento por mantener la integridad epitelial y una barrera a la penetración microbiana. La pérdida de colágeno continúa en ambas direcciones, lateral y apical, al expandirse el infiltrado celular inflamatorio. El epitelio de la bolsa no

está adherido a la superficie dentaria y tiene una fuerte infiltración leucocitaria, con predominio de neutrófilos que eventualmente migran a través del epitelio hacia la hendidura gingival o bolsa.^(48, 49.)

Si la gingivitis rebasa estos límites se produce la periodontitis que se caracteriza por la presencia de una bolsa periodontal y la consecuente pérdida de la unión que provoca movilidad de los dientes y como consecuencia la pérdida dental.^{48, 49}

Al persistir la irritación bacteriana de la gingivitis, el proceso inflamatorio se va propagando y afecta las estructuras más profundas. Entonces se observa la desintegración de las fibras transeptales, y la inserción epitelial proliferativa en sentido apical, se desprende al mismo tiempo del diente a su nivel coronal y así se forma la bolsa periodontal. El desarrollo de la bolsa es un signo patognomónico de la periodontitis. En esta etapa el infiltrado inflamatorio se halla concentrado en el tejido conectivo perivascular que envuelve a los vasos y tabiques interdentarios. La evolución progresiva de la periodontitis acaba en la resorción generalizada del hueso alveolar de soporte y destrucción progresiva de la conexión o inserción del ligamento periodontal.¹¹

El mecanismo exacto de la formación de la bolsa no se conoce por completo, pero Page y Schroeder han clasificado las distintas fases patogénicas de la siguiente manera.

Lesión periodontal inicial.

Las características de la lesión inicial son la vasculitis de los vasos sanguíneos situados en la profundidad del epitelio de unión, el aumento del flujo de líquido gingival, el movimiento de leucocitos hacia el epitelio de unión y el surco gingival, las proteíneas séricas extracelulares, las alteraciones de la cara coronaria del epitelio de unión y la pérdida de fibras colágeno alrededor del vaso sanguíneo gingival.^{48, 49.}

Lesión periodontal precoz.

La lesión precoz se caracteriza por una exageración de las características de la lesión inicial, la presencia de células linfáticas por debajo del epitelio de unión, a cuyo nivel se concentra la inflamación aguda, las alteraciones fibroblásticas, una mayor destrucción de las fibras de colágeno gingival y la proliferación precoz de las células basales del epitelio de unión.^{48, 49}

Lesión periodontal establecida.

En este tipo de lesión las manifestaciones inflamatorias agudas persisten, con un predominio de las células plasmáticas; las inmunoglobulinas se acumulan en el espacio extravascular; se observa una destrucción de las fibras de colágeno, una proliferación con migración apical y extensión lateral del epitelio de unión, así como una formación precoz de bolsas periodontales; sin embargo, no se observa una pérdida apreciable de hueso.^{48, 49}

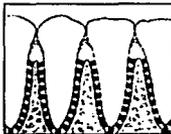


Fig. 5. Durante la lesión establecida aún no se observa pérdida ósea.
Internet: [www.http://odponto.buca.pato.su.com](http://odponto.buca.pato.su.com)

Lesión periodontal avanzada.

La lesión avanzada es típica de la periodontitis y se caracteriza por la progresión de la lesión establecida, su extensión al hueso alveolar y al ligamento periodontal, con la consiguiente destrucción ósea, pérdida de las fibras de colágeno adyacentes al epitelio de la bolsa, fibrosis de las áreas más periféricas, presencia de células plasmáticas alteradas, formación de bolsas periodontales y signos generalizados de respuesta inflamatoria e inmunopatológico. Desde el punto de vista clínico se considera que la periodontitis avanzada es una profundización de la bolsa periodontal asociada con presencia de exudado y aumento paulatino de la movilidad de los dientes.^{48,49}



Fig. 6. En la lesión avanzada puede existir diferentes niveles de destrucción ósea.
Internet: [www.http://odponto.buca.pato.su.com](http://odponto.buca.pato.su.com)

3.7. PLACA DENTAL.

La superficie dental esta cubierta por capas de material orgánico, la primer capa es la película adherida la siguiente es la placa dental la cual es más densa, la capa más externa es la materia alba¹¹

Inmediatamente después de la inmersión de un sustrato sólido en el medio líquido de la cavidad bucal o después de la limpieza de una superficie sólida en la boca, macromoléculas hidrofóbicas comienzan a adsorberse a la superficie para formar una película adecuada, denominada película adquirida (*fase 1.*) Esta película está compuesta de una variedad de glucoproteínas (mucinas) salivales y anticuerpos. La película altera la carga y la energía libre de la superficie, que a su vez aumenta la eficacia de la adhesión bacteriana. Las bacterias se adhieren de manera variable a estas superficies recubiertas. Algunas poseen estructuras para la adhesión específicas, tales como sustancias poliméricas extracelulares y fimbrias, que les permiten adherirse rápidamente al contacto (*fase 2.*) En este momento se inicia la multiplicación de las bacterias (*fase 3.*) La masa bacteriana se incrementa debido al desarrollo continuo de los microorganismos adheridos, a la adhesión de nuevas bacterias (*fase 4*) y a la síntesis de polímeros extracelulares. Con el espesor incrementado, la difusión hacia adentro y hacia fuera de la biopelícula se hace cada vez más difícil. Se genera un gradiente de oxígeno como resultado de la rápida utilización por las capas de bacterias superficiales y a la escasa difusión del oxígeno a través de la matriz de la biopelícula. El oxígeno es un factor ecológico determinante importante, pues las bacterias varían su capacidad de crecimiento y multiplicación con los diferentes niveles de oxígeno.

Composición química de la placa.

En un análisis químico de la placa demuestra que el 20% es material sólido y el resto es agua. El material sólido esta compuesto por proteínas, carbohidratos y lípidos. Las proteínas son el mayor componente sólido de la placa dental estos provienen de las bacterias, proteínas salivales, amilasa, lisozima, lactoferrina, peroxidasa, inmunoglobulinas salivales y varias enzimas bacterianas como la hialuronidasa, colágeno y glucosiltransferasa pueden ser parte de la placa.^{11,25,54}

Los carbohidratos en forma de polisacáridos son constituyentes de la placa. Estos polisacáridos son heteropolisacáridos y homo polisacáridos. La mayoría de los heteropolisacáridos se encuentran en la placa y son componentes de la pared celular. Ciertas especies como *Actinomyces* y *Lactobacillus* sintetizan capsular y extracapsularmente polímeros que contienen hexomidasas y hexosas. Los fructanos y glucanos son sintetizados por la placa bacteriana primeramente como polímeros extracelulares y marca una larga porción de la matriz de la placa.^{11,5,20}

3.8. PAPEL DE LAS BACTERIAS EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Investigaciones tanto clínicas como experimentales sobre la enfermedad periodontal inflamatoria en el hombre sugiere que las bacterias son el factor etiológico principal, aunque la reacción del huésped a otros factores como hormonas y fármacos son de relevancia en algunos casos.^{11,18,20}

La información más útil proviene de los estudios epidemiológicos que señalan una relación lineal entre la ausencia de higiene bucal adecuada y la ocurrencia de gingivitis o periodontitis.^{52,58}

Numerosas investigaciones han documentado el hecho de que la placa bacteriana es el agente etiológico en la mayoría de las formas de enfermedad periodontal. Sin embargo, la naturaleza exacta de la microbiota asociada con la salud y enfermedad periodontal no ha sido todavía determinada.

Las clásicas teorías que trataban del papel de la placa dental sugerían que la placa consistía en una masa bacteriana compleja y homogénea, que conduciría a la enfermedad al permitirse su crecimiento. Posteriormente se descubrió que la composición bacteriana de la placa asociada con lugares sanos es diferente de la placa asociada con lugares enfermos. Más importante fue el hecho de que podía asociarse una flora microbiana característica con enfermedades periodontales clínicamente diferentes. Las respuestas clínicas frente a las bacterias de la placa son variadas, con diferencias en el grado y naturaleza de la inflamación, la forma de la lesión, su localización en la cavidad oral y la formación de pus, cálculo etc. Se están realizando intentos para relacionar la sintomatología clínica con el tipo de microorganismos presentes, aunque los progresos realizados son todavía limitados. El concepto de especificidad bacteriana, formalmente descrito por Loesche en 1976, sugiere que formas específicas de la enfermedad periodontal tienen etiologías bacterianas específicas.^{47, 48, 50}

Se cree que el desarrollo inicial de la gingivitis es consecuencia de las bacterias relacionadas con la infección en la formación de la placa supragingival. Estudios de gingivitis experimental demostraron que la acumulación de placa en el margen gingival producía siempre inflamación gingival y al eliminarla se resolvía esa inflamación.^{47, 48, 50}

Estudios microscópicos mostraron que el desarrollo de gingivitis experimental se vinculaba con cambios en la flora de cocos gram-positivos a una flora más compleja de bacilos gram-positivos que incluía especies gram-negativas y formas espirales. Estudios de cultivos subsecuentes mostraron que durante tres semanas de acumulación de placa en el modelo de gingivitis experimental, los

bacilos grampositivos, en especial los *Actinomyces* aumentaban de manera proporcional a expensas de los cocos gram-positivos estudios indican que la gingivitis no es únicamente una consecuencia de la acumulación de placa por sí sola, pues requiere una secuencia de procesos de colonización de especies adicionales; por lo tanto se necesita la sucesión bacteriana para producir enfermedad. ^{11, 25,45}

La lesión inicial a los tejidos gingivales en la gingivitis es posible vincularla con los elementos nocivos de un aumento en la masa de las bacterias grampositivas de la placa supragingival. En estas primeras etapas de la gingivitis suceden cambios edematosos en la enca marginal que contribuye a la adquisición sucesiva de especies subgingivales patógenas con la continua tendencia hacia microflora gram-negativa.

Muchos investigadores sugieren que episodios repetidos de gingivitis conducen a pérdida de la adherencia periodontal a la cual se llama periodontitis. ^{47,48,50}

La relación de la placa supragingival con la etiología de la enfermedad periodontal, todavía esta lejos de ser comprendida, pero está bastante claro que la placa supragingival y la subgingival son directamente responsables de la iniciación y progresión de la enfermedad periodontal. La construcción de la placa puede ocurrir como resultado de la agregación de bacterias, o de una unión interbacterial con un apareamiento específico de diferentes especies bacterianas que así forman una interacción ecológica.

La ecología subgingival es diferente en la superficie dental, en donde predominan bacilos y cocos gram positivos; en el exudado de la bolsa; y en el epitelio interno de la bolsa en donde predominan espiroquetas, bacilos y filamentosos gram-variables. La interacción célula-célula en la coagregación bacteriana de *Actinomyces* y organismos gram-negativos así como bacteroides han sugerido a varios investigadores la posibilidad que *Actinomyces* puede ser un marcador para la transición de la microflora marcadamente gram-positivo de la placa, a una microflora gram-negativo. Las proporciones relativas de las zonas de la placa subgingival parecen estar relacionadas con la naturaleza y actividad de la enfermedad, presentes en una bolsa en particular.

Es determinante la unión de la bacteria a los tejidos del huésped que representa el primer paso de colonización. Aunque poco se sabe sobre el mecanismo de unión se presume que ésta se caracteriza por un marcado grado de especificidad a través de un sistema complejo de reconocimiento, quizás análogo a los mecanismos de reconocimiento antígeno-anticuerpo. La adherencia de la bacteria tiene una interacción específica en el cual las macromoléculas (adhesinas) en la superficie de la bacteria se une a estructuras complementarias (ligandos) ^{15,21,39} en la superficie de los tejidos del huésped. Los mecanismos de adhesión que frecuentemente están presentes en los filamentos de la superficie bacteriana tal como pili, fimbria, lectinas y/o ligandos hidrofóbicos. La bacteria en su superficie provee un enlace carbohidrato-proteína que sirve de unión a las proteínas correspondientes de glucógenos conjugados en la superficie de los tejidos del huésped. ^{44,45}

Entre los productos de las bacterias existen las enzimas líticas que son capaces de producir la degradación del colágeno que es componente del huésped y por lo tanto las bacterias alteran y destruyen los componentes tisulares.

Además de las enzimas líticas, existe una amplia variedad de otros productos tóxicos, elaborados por las bacterias gingivales. Estos factores pueden dividirse en tres clases fundamentales: 1) factores que afectan la matriz intercelular, 2) factores de toxicidad celular directa y 3) estimulantes inflamatorios. ^{47, 48}

Un ejemplo de estimulantes inflamatorios son las endotoxinas que se encuentra habitualmente en bacterias gram-negativas. Son sustancias complejas formadas por lípidos, polisacáridos y una sustancia proteiniforme. Estudios han demostrado que la porción lipídica provoca la resorción ósea. El aumento en la cantidad de endotoxinas en el exudado subgingival ha

sido relacionado con el aumento en la intensidad de la inflamación tanto clínica como histológicamente. Un hecho también significativo es que el cemento de dientes humanos con periodontitis contiene cierta cantidad de endotoxinas con actividad biológica.

Existen productos tóxicos bacterianos que producen la despolimerización del ácido hialurónico de la sustancia intercelular de cemento, como son las hialuronidasas, que podrían favorecer a la separación de las células epiteliales y esto ayudar a la penetración de las bacterias o de sus productos en los tejidos causando alteraciones en el equilibrio líquido del tejido conectivo.

En cuanto a las proteasas, el efecto de la collagenasa bacteriana puede ser muy importante, puesto que la proteína fibrosa principal del sistema fibroso periodontal, del hueso y de los tejidos conectivos es la colágena. La collagenasa del huésped, liberada de los granulocitos y de las células mononucleares como resultado de una respuesta inflamatoria que se piensa es liberada por irritantes bacterianos, es una fuente principal de actividad collagenolítica en el tejido periodontal de los seres humanos.^{45,18}

Como respuesta del huésped al ataque bacteriano ocurre una migración de leucocitos a la bolsa periodontal, los leucocitos polimorfonucleares son los que predominan en el exudado celular. Los leucocitos se encargan de formar una barrera entre los tejidos gingivales y la superficie del diente que está en relación con la placa dental, protegiendo así al huésped de una mayor invasión bacteriana. Esto ocurre en la porción apical del epitelio del surco. El resto del epitelio asociado al diente puede ser transformado como epitelio del surco que se caracteriza por la proliferación de la formación de prostaglandinas y por un incremento en la permeabilidad para células y fluido. En algunas áreas el tejido conectivo es desprovisto de epitelio y puede existir un contacto directo entre la bolsa periodontal en crecimiento y el tejido conectivo. Lateralmente al epitelio del surco, en el tejido conectivo existe una densa acumulación de células inmunes de varios tipos. En el plasma celular predomina los infiltrados inmunes. La colágena en el tejido conectivo unido al epitelio del surco se disuelve y existe menor cantidad de fibroblastos comparados con un periodonto sano. Los mecanismos detrás del daño tisular aparecen asociados con el incremento de metaloproteínas de la acumulación de leucocitos y sustancias del proceso inmune local de la encía.^{45,58}

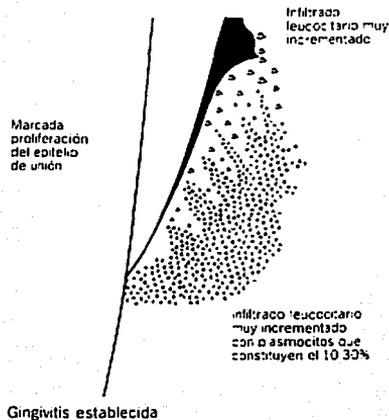


Fig. 7. Durante el establecimiento de la placa dental los macrófagos y leucocitos entran en acción para proteger al organismo.

Periodontología Clínica e implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring.

Debido a que las bacterias bucales son capaces de actuar como antígenos poderosos, se puede suponer que una interacción antígeno-anticuerpo contribuye a la etiología de la enfermedad periodontal. Se han encontrado niveles bajos de anticuerpos séricos circulantes contra la mayor parte de los microorganismos bucales. También se ha observado actividad bactericida en el suero humano contra microorganismos bucales humanos gram-negativos.

Se sabe que la respuesta anticuerpo a las endotoxinas de estos microorganismos son las inmunoglobulinas IgM. El mecanismo de la acción bacteriana podría iniciar la reacción inflamatoria por medio de las reacciones antígeno-anticuerpo.¹¹

Las bacterias que se identifican en la flora normal de la boca son:^{18, 25, 56}

Bacterias gram-positivas.

- Actinomyces*
- Arachnia*
- Bacterionema*
- Bifidobacterium*
- Eubacterium*
- Lactobacillus*
- Micrococcus*
- Neisseria*
- Propionibacterium*

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Rothia
Streptococcus

Gram bacterias gram-negativas.

Actinobacillus
Bacteroides
Branhamella
Capnocytophaga
Eikenella
Fusobacterium
Peptostreptococcus
Haemophilus
Leptotrichia
Selenomonas
Simonsiella
Treponema
Veillonella
Wolinella.

3.9. MECANISMOS DE MICROBIOLOGÍA ORAL ADHERENCIA, COLONIZACIÓN Y AGREGACIÓN.

La adhesión bacteriana al epitelio es un factor importante. Las interacciones específicas entre las adhesiones de la bacteria y los receptores celulares determinan la localización específica de cada patógeno para poder iniciar la enfermedad.

Siempre la adhesión es el primer paso para la interacción con el huésped, los patógenos están involucrados con una gran variedad de estrategias según las necesidades de la adherencia inicial.
1,23,32

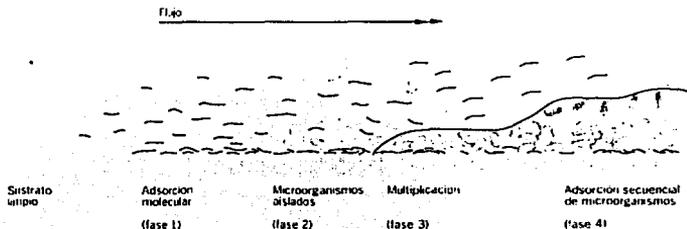


Fig. 8. Esquema que muestra la formación de la placa bacteriana en sus diferentes fases. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring.

Para que una bacteria se pueda adherir al tejido oral primero debe adherirse al tejido con cierta frecuencia, experimentalmente se ha demostrado que se necesitan 10^4 células por mililitro de saliva para que una sola célula de *S. sanguis* se adhiera a la superficie dental. Para *S. mutans* la concentración es cerca de 100 veces mas, las razones de la cantidad específica de bacterias no se conoce.^{63,67,71}

Las propiedades de adhesión se asocian a glucotransferasas y glucanos como *S. mutans*, esto debido a que las enzimas se unen a las fimbrias en el exterior de la célula.

Se ha relacionado otros compuestos en la adherencia como los ácidos lipoteicoicos de superficie y fimbrias que se unen a todas las células eucarióticas y una glicoproteína llamada fibronectina, estos compuestos son localizados en películas y en aglutinaciones bacterianas. Existen proteínas llamadas adhesinas que se han encontrado en porciones fibrilares de microorganismos, la presencia o ausencia de estas porciones pueden ser factores en la adherencia y en la subsecuente enfermedad. Las interacciones electrostáticas pueden estar involucradas en las primeras interacciones entre células y bacterias, esta interacción causa el acercamiento inicial sobre los iones de Ca produciendo puentes de hidrógeno o uniones hidrofóbicas las cuales sirven como puente entre las cargas negativas y ácido lipoteicoico en la superficie de la bacteria.^{18,24,44}

Cuadro 1. Moléculas de adhesión de las células.

FAMILIA.	RECONOCIMIENTO DE LIGANDOS.	UNIONES ENTRE CÉLULAS.
Selectinas.	Carbohidratos.	No.
Integrinas.	Matriz extracelular.	Adhesiones focales y hemidesmosomas.
	Miembros de la familia Ig.	No.
Familia Ig.	Integrinas.	No.
	Interacciones homofílicas.	No.
Caderinas.	Interacciones homofílicas.	Desmosomas.

B.W. Hawkins Interaction of Actinomyces naeslundii strains T14V and 1204 with saliva collagen and fibrinogen. Archs. Oral Biol; 1993, Vol. 38, No. 6, p.p. 533-535.

Proteínas específicas de la saliva han sido reportadas como contribuyentes en la adhesión de ciertas líneas de *Streptococcus mutans* a la hidroxiapatita. Una sustancia secretada por la glándula salival submandibular y sublingual conocida como proteína rica en prolina (PRP) la cual se relaciona con las acciones de adhesión bacteriana.^{18,15,70}

La película se forma después de 2 horas de haber limpiado la superficie dental teniendo cerca de 10 micras de grosor, la primera bacteria que va a adherirse es un coco como *Neisseria* y

Streptococos, predominantemente *S. sanguis*. El crecimiento individual de las colonias eventualmente resulta en la confluencia de una película de organismos. Pocas bacterias gram positivas en barra se encuentran en este estado. ¹¹

Por cada miligramo de placa hay cerca de 1×10^8 bacterias. Teniendo en cuenta que en la boca normal contiene aproximadamente 100 mg de placa hay cerca de 1×10^{10} bacterias o 10 billones en un individuo normal. La distribución de los organismos en la boca tiene una característica especial la cual se observa como una gran dificultad para identificar y aislar las bacterias y más aun entender las relaciones existentes entre estas. ^{11,25}

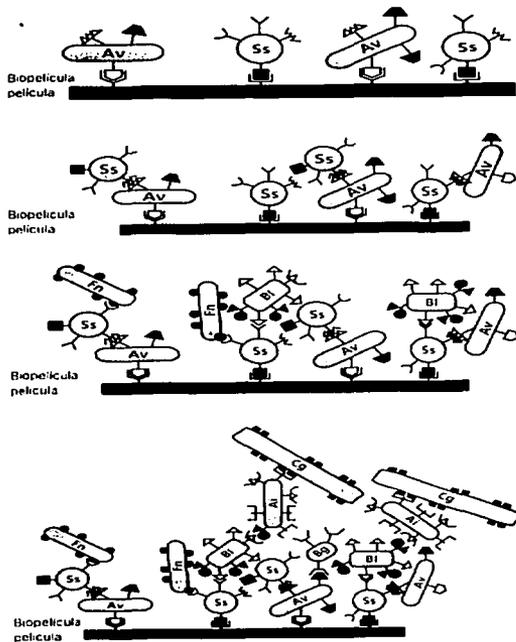


Fig.9. Esquema que muestra el orden de adhesión de las bacterias la cual es la base para la formación de la placa bacteriana.

Periodontología Clínica e implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring.

3.10. MECANISMOS DE DEFENSA INICIAL.

Los mecanismos de defensa del organismo en contra de las infecciones son diversas, depende en gran medida de las características del factor agresor, pero a grandes rasgos el patógeno debe ser capaz de evadir el sistema inmune del cuerpo constituido por los anticuerpos y macrófagos. Los problemas que puede encontrar la bacteria también se localizan localmente como la acción de los fluidos bucales y el movimiento de los tejidos.^{28,47,57.}

Además toda bacteria recién llegada compete con la presencia de otras por los nutrientes y sitios de adhesión.

El pH y la fuerza iónica del medio donde se encuentran las células tienen dramáticos cambios en las capacidades de adhesión. La adhesión no se altera en rangos de pH. de 5 a 9 pero baja dramáticamente en un 40% cuando el pH. es menor a 4 y mayor a 10. La osmolaridad afecta la adhesión se ha observado que las concentraciones de cloruro sodio (NaCl) reducen la adhesión en 40% con 200 mM de NaCl.^{18,28,47,57.}

La presencia de fluidos bucales que modifican los niveles de pH. y la fuerza iónica en la cavidad oral sugiere que pueden modular el proceso de adhesión.

Las bacterias necesitan requerimientos especiales como la síntesis de proteínas, energía metabólica, mecanismos de endocitosis, acidificación endosomal, formación de microtubulos para ser capaces de realizar la adhesión.^{44,46,54}

3.11. SISTEMA TIPO III DE SECRECIÓN EN LA PATOGENICIDAD BACTERIANA.

La bacteria EPEC (*Ecobacter Coli* Hb101.) es la bacteria mejor estudiada por sus características especiales para ser manejada en el laboratorio, los estudios de infección que se han hecho se ha encontrado que las adhesiones sobre su sustrato natural (superficie intestinal) causa una lesión llamada "lesión a consecuencia de la adhesión" (A/E) que se observan como la pérdida de micro vellosidades y formación de lugares ricos en actina, estas lesiones están relacionadas con la diarrea típica de la infección de EPEC.⁵⁶

Una importante característica de muchas bacterias gram negativas que define el grado de patogenocidad es su habilidad directa para manipular señales intracelulares de las células hospederos. Un mecanismo común para manipular las señales intracelulares es a través de la acción del sistema de secreción III, este sistema es una estructura que permite a la membrana de la bacteria entrar directamente dentro de en la célula hospedera, las proteínas de la bacteria se presentan como efectores que interactúan con las señales intracelulares en diferentes formas (como en la translocación.) Se ha estudiado otro tipo de secreción, el tipo II, este se activa por medio de proteínas presentadas en el exterior de la célula hospedera.⁵⁶

Muchas funciones han sido atribuidas a las acciones del tipo III de secreción como es el grado de patogenocidad y virulencia. En el caso de EPEC la íntima adherencia con la superficie epitelial esta acompañada por la presencia de un grupo de adhesinas que se encuentran en la membrana de la célula, otro ejemplo de la importancia del sistema tipo III de secreción son los efectos de la infección de *S. flexeri* y *Salmonella* sobre las celulas epiteliales al manipular el citoesqueleto y causar alteraciones en la superficie celular y la formación de vacuolas.

Cada bacteria provoca diferentes señales dentro de la célula por ejemplo la invasión de *Y. Enterocolitica* bloquea la acción de las tirosin kinasas la cual indica al macrófago la fagocitosis del

invasor. Algunas bacterias inducen la muerte celular programada de los macrófagos por medio de una forma dependiente del sistema de secreción tipo III.¹⁸

El sistema tipo III de secreción es de gran importancia para los efectos que causa una infección bacteriana sobre las células, como lo es la activación de señales intracelulares, la modificación del citoesqueleto, muerte celular y apoptosis.

3.12. FORMACIÓN DE LAS LESIONES A/E.

En el estudio de la formación de la "lesión de la adhesión" A/E por EPEC se ha identificado como primer paso la unión inicial del patógeno en la superficie del epitelio por medio de la formación de abultamientos (BFP)⁵⁶. La unión inicial que usa EPEC es por medio del tipo III de secreción que promueve dentro la célula hospedera una familia de proteínas llamadas Esp. El proceso de formación de las lesiones A/E es poco entendido pero la evidencia sugiere que una proteína Esp ayuda a la formación de la estructura de los filamentos de actina. La proteína más relacionada con este hecho Esp. A que provoca la translocación de otro Esp. y posiblemente actúa como una adhesina. Otro miembro de esta familia, la proteína Esp. B puede intervenir en la translocación de señales intracelulares. La formación de lugares ricos en actina produce la translocación de las proteínas Esp. La activación de señales involucradas por EPEC es muy grande, esto incluye la activación de fosfolipasa C. Se ha demostrado que EPEC también activa las proteínas quinasas como la proteína quinasa C, la cadena ligera de miosina quinasa y otras quinasas desconocidas. La relación exacta entre la activación de señales y la formación de lesiones A/E aun no se conoce.^{56,30}

Sorpresivamente el sistema de secreción tipo III activada por EPEC también media el aumento de proteínas dentro de la bicapa de las células hospedera, esta proteína se transloca en un receptor llamado Tir. el cual sirve como receptor de membrana en la membrana externa.³⁰

Muchas regulaciones de actina se involucran con la formación de lesiones A/E por EPEC, como la producción de nuevos componentes de actina (alfa actina, serina, talina, villina y la cadena ligera de miosina). Es interesante que el Tir. de EPEC requiere la fosforilación de una quinasa de tirosina desconocida para causar la formación de lugares ricos de actina esto sugiere que cada patógeno produce lesiones A/E y utiliza su propia molécula Tir. Se ha encontrado que algunos tipos de EPEC. inhiben la fagocitosis por medio de la defosforilación de las proteínas de residuos de Tirocina.^{12,56,30}

La regulación del citoesqueleto es un proceso muy complicado donde intervienen gran número de factores que actúan a diferentes niveles del metabolismo celular entre estas moléculas se encuentra Cdc 42, rac, Rho, GTPasas, ATP, quinasas, ATP entre muchas otras.^{56,22,24}

3.13. INTEGRINAS.

Se describen como una variedad de moléculas localizadas sobre la superficie celular que se creía que eran una conexión de la matriz extracelular con el citoesqueleto, hoy se reconocen como un grupo de glucoproteínas heterodiméricas relacionadas compuestas por subunidades no unidas (llamadas alfa y beta) en las membranas de células mamíferas. A la fecha se han identificado ocho cadenas beta y 16 alfa, las cadenas beta 1 están involucradas con proteínas de superficie celular como la colágena, laminina y fibronectina. Las integrinas que contienen cadenas beta 2 están involucradas en las interacciones inflamatorias con la matriz de otras células como las integrinas de leucocitos. Las integrinas que contienen cadena beta 3 están involucradas en interacciones del sistema vascular como la trombosis.^{7,12,18}

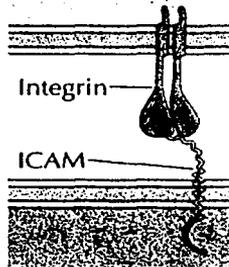


Fig. 10. Estructura de las integrinas y su relación con la membrana y las proteínas ICAM. Geoffrey M. Cooper. The cell a molecular approach. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

Las subunidades de las integrinas están compuestas por 3 dominios, cada cual incluye un dominio extracelular largo, un dominio que atraviesa la membrana y un dominio citoplásmico corto.¹¹

Las subunidades varían en tamaño de 1200 a 1800 aminoácidos. Las terminaciones N de las subunidades alfa contienen siete dominios repetidos que tienen homología con la unión catiónica EF-hand. En orden de eficacia la unión al ligando es mayor si ocurre en las cadenas alfa y beta cuando están asociadas con interacciones no y solo esta mediada por cationes divalentes y dominios extracelulares.^{11,56}

3.14. UNIONES INTEGRINAS-LIGANDOS.

La unión integrina-ligando parece ser dependiente de la presencia de uniones cationicas como calcio o magnesio. La relación entre el ligando y la integrina es no específico debido a que una integrina puede unirse a diferentes moléculas.

La adhesión mediada por integrinas puede ocurrir por medio de tres medios de interacciones, directas con componentes de la matriz extracelular mediada por interacciones de la matriz celular de otra bacteria, la segunda, uniones a componentes de las proteínas de la membrana para un efecto célula-célula y proteínas de adhesión solubles como las requeridas para la agregación plaquetaria. El uso de estos mecanismos por parte de la célula refleja las necesidades y funciones de especiación, por ejemplo los fibroblastos al ser células adherentes expresan gran cantidad de integrinas activadas en la superficie que permiten sus funciones.

3.15. FUNCIONES DE LAS INTEGRINAS.

Están involucradas en la diapédesis de células blancas y migración de leucocitos, interacciones de células T-macrófagos, formación de coágulos, migración epitelial, migración de fibroblastos y adhesión de fibroblastos. Muchos de estas integrinas son expresadas en altas proporciones durante la sanación de heridas y la tumorigenesis, el rol de las integrinas en la maduración es crucial en la reparación de la matriz. El paso inicial en la reparación de la matriz es la unión de los fibroblastos por fibronectina a través de la integrina. Las integrinas proveen una unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, este es un mecanismo de mensaje complejo entre el interior de la célula y el medio externo, así las integrinas están involucradas en la señal de transducción como lo es la fosforilación de proteínas intracelulares, otros mecanismos de transducción de señales a través de integrinas son los ligeros cambios de pH. intracelular. Las integrinas proveen un importante eslabón entre la matriz y el citoesqueleto y los sistemas de mensajero intracelular, la expresión de genes y las intrincadas reacciones de la matriz.^{11,15,28}

Las principales proteínas de unión transmembrana de los contactos focales pertenecen a la familia de las integrinas cuyo dominio externo se une a un componente de la matriz extracelular mientras que el dominio citoplásmico se une a los filamentos de actina de las fibras de stress. La unión es indirecta y esta mediada por múltiples proteínas de anclaje. El dominio citoplásmico de la integrina se une a una proteína llamada talina, que a su vez se une a la vinculina, proteína que se encuentra también en otras uniones que contienen filamentos de actina.^{32,36,42}

Además de su papel como anclas para la célula, los componentes focales pueden también transmitir señales desde la matriz hasta el citoesqueleto. Algunas proteínas quinasas, incluyendo la Tirocina quinasa codificada por el gen src, se localizan en los contactos focales, y existen indicios de que su actividad cambia con el tipo de sustrato sobre el cual la célula descansa. Estas quinasas pueden fosforilar diversas proteínas diana, incluyendo algunos componentes del citoesqueleto y así regular la supervivencia, el crecimiento, la morfología, el movimiento, y la diferenciación de las células como respuestas a la matriz extracelular de su entorno.^{44,47,58}

3.16. RECEPTORES PRP.

Es una proteína transmembranal de mas o menos 55 kd que contienen cinco dominios transmembranales parecidos a las inmunoglobulinas, fue descrita como marcador de activación linfocítica que se une a un leucocito por medio de integrinas.^{11,23.}

En estudios recientes se ha demostrado que las bacterias indígenas se pegan a las superficies de la boca en una forma altamente selectiva, la unión frecuentemente se ha observado correlacionada con la colonización estos estudios demuestran que el reconocimiento de la unión de la bacteria es esencial. En la superficie de membrana se encuentran expuestas al fluido bucal proteínas llamadas adhesinas las cuales se unen estereo-méricamente. Las adhesinas son frecuentemente lectinas que se unen al receptor del sacárido, pero algunas adhesinas son capaces de unirse a los receptores protefnaceos.

En los estudios adhesión bucal se ha estudiado la interacción entre la hidroxapatita y diferentes componentes de la saliva humana encontrándose que las proteínas ricas en prolina (PRP) promueven la unión de muchas bacterias importantes, estas incluyen líneas como *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides gingivalis*, algunas líneas de *Streptococcus mutans* y otras. Algunos segmentos de la PRP están estructuralmente relacionadas con el colágeno lo que permite la unión entre estas dos proteínas. *Actinomyces viscosus* y otras bacterias se unen rápidamente al PRP. absorbidas en la superficie de apatita, una situación de relevancia es el hecho que las bacterias no interactúan con PRP en solución.^{12,15,18}

En el fibroblasto existen receptores para las adhesiones bacterianas a las que se han llamado receptores escondidos mejor conocidos como criptitopes (del latín *cryptic* que significa escondido y *topo* lugar) a generación de crititopes provoca cambios conformacionales que están involucradas en la colonización de muchas bacterias sobre la superficie de la mucosa.^{12,18,21,68}

Hay evidencia la cual sugiere que elevados niveles de neuraminidasa y proteasas (asociadas con pobre higiene oral y gingivitis) generan criptitopes la cual promueve la colonización de ciertas bacterias gram negativas asociadas con la destrucción de la enfermedad periodontal.⁷

La adhesión selectiva a las superficies de la boca es muy importante en el rol de la colonización. Los estudios indican que las bacterias poseen una alta especialización en el sistema de identificación, el cual es capaz de reconocer y interactuar con macromoléculas específicas sobre las superficies de los tejidos.

3.17. EL CITOESQUELETO.

A un nivel con mayor grado evolutivo existe una función mas especializada y por ende una estructura más compleja, entre células la presencia del citoesqueleto señala un cambio evolutivo que al ser un órgano en constante cambio provee, movimiento, forma y función celular, transporte internos de los órganos y cromosomas.

El citoesqueleto es conformado por tres principales tipos de proteínas filamentosas: filamentos de actina, filamentos intermedios, y microtúbulos los cuales en conjunto se vinculan con organelos subcelulares y con la membrana por medio de una variedad de proteínas accesorias.^{44,41.}

3.18. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA.

La actina es una proteína del citoesqueleto altamente conservada que se encuentra a concentraciones elevadas en casi todas las células eucariotas. La actina purificada se encuentra en forma de monómero en solución de baja fuerza iónica y al añadir ATP se ensambla espontáneamente formando filamentos de actina. La polimerización de la actina es un proceso dinámico que se encuentra regulado por la hidrólisis de un nucleótido al que cada molécula está estrechamente unida al ATP. En las células aproximadamente la mitad de la actina se encuentra en forma monomérica, las moléculas de actina se polimerizan y despolimerizan continuamente generando proyecciones en la superficie celular. La polimerización puede ser regulada por señales extracelulares que se unen a receptores de la superficie celular y que actúan a través de proteínas G heterodiméricas y de pequeñas GTPasa como Rac y Rho.^{32,35,37}

La proteína más usual en el citoesqueleto de la mayoría de las células es la actina, la cual se polimeriza hacia formas de filamentos para formar fibras flexibles de aproximadamente 7nm de diámetro y de varios micrómetros de largo. Dentro de la célula, los filamentos de actina (también llamados microfilamentos) son organizados en grandes estructuras, formando de redes tridimensionales de actina llamados "blebs" (que presentan propiedades de geles semisólidos.) El ensamble y desensamble de los filamentos de actina en abultamientos y redes, y su asociación con otras estructuras celulares (como la membrana plasmática) son regulados por una variedad de proteínas de unión a la actina. Los filamentos de actina son particularmente abundantes debajo de la membrana, donde se forma una red que provee soporte mecánico, determina la forma celular, y permite el movimiento de la superficie de la célula para poder migrar, ingerir partículas y dividirse.^{39,42,44,45.}

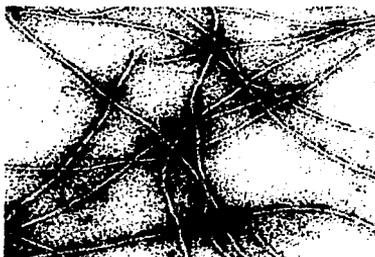


Fig. 11 Formación de filamentos de actina, obsérvese el entrelazado de los filamentos. Geoffrey M. Cooper. The cell a molecular approach. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

3.19. ENSAMBLADO Y DESENSAMBLE DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA.

La actina fue por primera vez aislada de las células musculares en 1942, en las cuales constituye aproximadamente el 20% de la proteína celular, sin embargo la actina solo se relacionaba con la función de contracción, actualmente se sabe que es muy abundante en todas las células eucariotas (5 al 10%). Las células eucarióticas contienen normalmente varios tipos de actina, por ejemplo en los mamíferos existe por lo menos seis genes responsables de la expresión de actina, cuatro son expresados en diferentes tipos de músculo y dos son expresados en células no musculares. Todas estas actinas, son muy similares en la secuencia amina y tienen regiones muy conservadas a través de la evolución de los eucariotes, por ejemplo la actina de la levadura es 90% idéntico en su secuencia amina al de los mamíferos. ^{42,32,39}

La estructura tridimensional de la actina fue determinada en 1990 por Kenneth Holmes y sus colegas los cuales determinaron que las moléculas individuales de actina son proteínas globulares de 375 amino ácidos. Cada monómero de actina (actina globular G) se une fuertemente a los sitios de unión por medio interacciones cabeza-cola con otros dos monómeros de actina, así la polimerización de monómeros de actina forma filamentos (filamentos de actina F) cada monómero es rotado 166 grados en los filamentos, la cual posteriormente tiene una apariencia de una doble hélice. A causa de que todas los monómeros de actina son orientados en la misma dirección, los filamentos de actina tienen diferente polaridad en sus extremos finales uno de ellos se llama "extremo positivo" (plus end) y el otro "extremo negativo" (menor end) estos son distintos de uno del otro. Esta polaridad de los filamentos de actina es importante para el ensamble y funciones de contracción. El ensamble de los filamentos de actina pueden ser estudiados *in vitro* por medio de la regulación de la fuerza iónica, en soluciones de baja fuerza iónica los filamentos de actina se despolimerizan para formar monómeros. La actina se polimeriza espontáneamente si se aumenta la fuerza iónica. El primer paso en la polimerización se llama nucleación que es la formación de pequeños agregados consistentes en tres pequeños monómeros de actina. Los filamentos de actina son capaces de crecer por medio de adición reversible de los dos extremos de los monómeros, pero un extremo (positivo) se elonga cinco a diez veces mas rápido que el negativo. El monómero de actina también se une al ATP, el cual se hidroliza a ADP seguido del ensamble de los monómeros de actina. Sin embargo el ATP no es requerido para la polimerización, monómeros de actina se unen más fácilmente al ATP que en la unión de ADP. La unión de ATP y su hidrólisis juega un papel importante en la regulación del ensamblado y en el comportamiento dinámico de los filamentos de actina. ^{42,32,39}

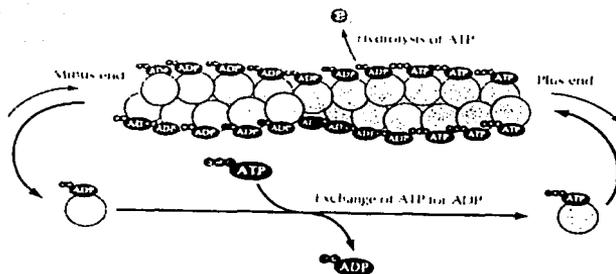


Fig. 12. En ensamble y desensamble de los filamentos de actina necesita ATP, observe la relación de ATP en la porción del extremo positivo y la presencia de ADP en el extremo negativo. Geoffrey M. Cooper. *The cell a molecular approach*. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

Debido a que la polimerización es reversible, los filamentos pueden despolimerizarse por la disociación de las subunidades de actina, seguido por la ruptura de los filamentos de actina cuando esto es necesario. Así un aparente equilibrio existe entre los monómeros de actina y los filamentos, la cual es dependiente en las concentraciones de monómeros libres. La tasa a la que los monómeros de actina se incorporan en los filamentos es proporcional a su concentración, así hay una concentración crítica de monómeros de actina a la tasa de la polimerización dentro de los filamentos a igual grado de disociación. En esta concentración crítica, los monómeros y filamentos están en aparente equilibrio.^{42,32,39}

Se ha notado que tempranamente los dos extremos de un filamento de actina crece a diferentes grados con monómeros que son agregados tan rápido como el crecimiento lo indica (extremo positivo) cinco a diez veces más rápido que el crecimiento lento (extremo negativo.) Debido a que el ATP-actina se disocia con más dificultad que ADP-actina, esto resulta en la diferenciación de la concentración de los monómeros que necesitan para la polimerización en los dos extremos. Esta diferencia puede resultar en el fenómeno conocido como paso de molino (treadmilling) la cual ilustra el dinámico comportamiento de los filamentos de actina.^{42,32,43,63}

Para mantener un estado regular de la formación de actina la concentración de los monómeros libres de actina deben ser intermedios entre las concentraciones críticas requeridas para la polimerización en extremo positivo y negativo de los filamentos de actina. El paso de molino requiere ATP, con ATP-actina polimerizada en extremo positivo y en los filamentos donde ADP-actina disocia desde minus end. Sin embargo el rol del paso del molino en la célula está incierto, refleja el ensamble dinámico y desensamble de los filamentos de actina que requiere la célula para moverse y cambiar de forma.^{43,63}

Es de hacer notar que muchas drogas usadas en biología celular actúan uniéndose hacia la actina y afectando su polimerización. Por ejemplo, la citocalesina se une al plus ends de los filamentos de actina e impide la elongación. Esto resulta en cambios de la forma celular así como en la inhibición de algunos tipos de movimientos (división celular) indicando que la polimerización de actina es requerida para este proceso. Otra droga, phalloidina, se une fuertemente a los filamentos de

actina e impide su disociación en moléculas individuales. Phalloidina señala como un tinte fluorescente a la actina, su uso es muy frecuente para visualizar los filamentos por medio de microscopia fluorescente.

El ensamble y desensamble de los filamentos de actina están regulados por proteínas de unión. El movimiento de los filamentos de actina es cerca de cien veces más rápido dentro de la célula que en Vitro esto es de gran importancia en los movimientos que existen en la célula. La proteína responsable del desensamble de los filamentos de actina es cofilina el cual une los filamentos de actina y aumenta la tasa de disociación de los monómeros de los filamentos de actina. Además, cofilin puede servir a los filamentos de actina generando mas extremos y posteriormente aumentar el desensamble de los filamentos.

Cofilina se une preferentemente a uniones de Adp-actin esta unión impide que los monómeros de actina se reincorporen a la estructura de los filamentos.^{42,32,39}

Sin embargo otra proteína de unión llamada profilina puede revertir la acción de cofilina y estimular la incorporación de los monómeros de actina en los filamentos. Profilina actúa estimulando el cambio de unión entre ADP a ATP resultando en la formación de monómeros de ATP-actina el cual se disocia de cofilina y son capaces de ensamblar en filamentos. Otras proteínas (Arp2/3) pueden servir como sitios de nucleación para iniciar el ensamble de nuevos filamentos, así cofilina, profilina y las proteínas Arp/3 y otras proteínas de unión pueden actuar para promover el rápido aumento de los filamentos de actina y remodelar el citoesqueleto de actina el cual requiere una variedad de movimientos y cambios en la forma celular. Como es de esperarse las actividades de cofilin, profilin, y de las proteínas Arp2/3 son controladas por una variedad de señales intracelulares para permitir la polimerización de actina para que sea regulado apropiadamente en respuesta del estímulo del medio.^{38,42,32,39.}

3.20. ORGANIZACIÓN DE FILAMENTOS DE ACTINA.

Los filamentos de actina son ensamblados en dos formas estructurales: abultamientos (buds) y redes de actina (actin networks), el cual tiene diferentes roles en la célula. En los abultamientos, los filamentos de actina se cruzan en un pequeño conjunto paralelo. En las redes los filamentos de actina están libremente entrecruzados en arreglos ortogonales que forman mallas tridimensionales con propiedades de geles semisólidos. La formación de estas estructuras es gobernada por una variedad de proteínas unidas a la actina que entrecruzan los filamentos de actina en diferentes patrones.^{42,32,39}

La naturaleza de la asociación entre los filamentos de actina es determinada por el tamaño y forma de las proteínas de cruce. Las proteínas que cruzan los filamentos de actina dentro abultamientos se llaman proteínas de enrizado de actina (actin-bundling) usualmente son proteínas pequeñas y rígidas que forjan una alineación cerrada entre los filamentos. En contraste, las proteínas que organizan los filamentos de actina dentro de las redes tienden a ser largas y flexibles con lo cual pueden hacer cruces perpendiculares de los filamentos. Los puntos de cruce se encuentran separados por secuencias espaciadas que varían en longitud y flexibilidad, estas diferencias en las distancias de cruce son responsables de las diferentes propiedades de las estructuras de actina.^{42,32,39}

Los filamentos de actina en las redes permanecen en esta posición gracias a largas proteínas como la filamina (también llamada proteína de unión a actina ó ABP 280.) Los dominios de unión de la filamina a son dominios dimerizables que son opuestos a los extremos de cada subunidad, así cada dímero de filamina es flexible, en forma de V con dominios de actina al final de cada brazo.

Como resultado la forma de la filamina hace cruces que originan formas ortogonales de actina, creando una malla tridimensional la cual soporta la superficie de la célula.^{42,32,39}

3.21. ASOCIACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA CON LA MEMBRANA.

Los filamentos de actina están altamente concentrados en la periferia de la célula donde forman una red tridimensional por debajo de la membrana. Esta red de filamentos de actina están asociados a la membrana por medio de proteínas de unión a actina que determina la forma celular y involucra una variedad de actividades en la superficie de la célula, incluyendo el movimiento. La asociación del citoesqueleto de actina con la membrana es central en la estructura y función de la célula.^{2,12,39.}

Todas las células tienen proteínas específicas en la superficie interna de la membrana que permiten la unión del citoesqueleto a la membrana como la ankirina, espectrina y la filamina.^(16,18,20) La mayoría de las células tienen regiones especializadas de la membrana que forman contactos con otras células adyacentes, componentes de tejidos ó otros sustratos (como la superficie de la caja petri.) Estos sitios también sirven como lugares de unión para los abultamientos de actina y permiten anclar el citoesqueleto a áreas de contacto celular. Estas uniones de los filamentos de actina son particularmente evidentes en fibroblastos. Los fibroblastos se unen al recipiente de cultivo por medio de uniones de proteínas transmembranales (llamadas integrinas) hacia la matriz extracelular. Estos sitios de unión son discretas regiones (llamadas adhesiones focales) que también sirven como sitios de unión para largos abultamientos de los filamentos de actina llamados fibras de stress.^{42,32,39}

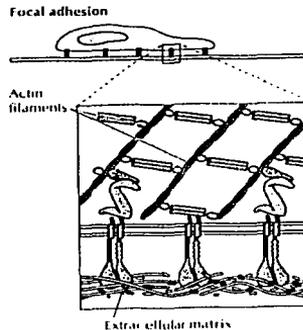


Fig. 13. La formación de adhesiones focales tiene relación con las integrinas y éstas con el citoesqueleto.

Geoffrey M. Cooper. *The cell a molecular approach*. Mosby. Second edition, 2000.p.p.

Las fibras de stress son abultamientos contráctiles de filamentos de actina debido al cruce de alfa actina que ancla a la célula ejerciendo tensión contra el substrato. Estas asociaciones son complejas y no muy bien entendidas se pueden dar por medio de varias proteínas, incluyendo la talin y vinculin. Otras proteínas se encuentran adhesiones focales que pueden participar en la unión de los filamentos de actina y pueden ser responsables la unión de los filamentos de actina hacia la membrana. (37,68,70) Otro tipo de proteínas de unión transmembranales entre células son las cadherinas que se muestran como un complejo que se une a una proteína del citoplasma llamada catenina la cual se asocia a filamentos de actina. ^{11,68.}

3.22. PROTRUSIONES DE LA SUPERFICIE CELULAR.

La superficie de la mayoría de las células tienen una variedad de protrusiones o extensiones que involucran el movimiento celular, fagocitosis ó funciones especializadas como la absorción de nutrientes. La mayoría de estas extensiones de la superficie celular están basadas en filamentos de actina la cual están organizadas dentro de arreglos de abultamientos ó redes relativamente permanentes ó de rápida modificación. ^{39,42,44}

La mayoría de las características de este tipo de protrusiones celulares basadas en actina son microvellosidades, parecidas a extensiones de dedo de la membrana que son particularmente abundantes sobre la superficie de las células involucradas en la absorción como las células bipolares del intestino. ^{24,42,32}

Una de las mas importantes funciones del citoesqueleto es la contracción de actina-miosina durante la división celular, hacia el final de la mitosis la célula animal presenta un anillo contráctil conformado por filamentos de actina y miosina II que se ensambla por debajo de la membrana. Esta contracción tira de la membrana progresivamente construyendo el centro de la célula y provocando dos células. El anillo entonces desaparece completamente después de la división celular. ^{42,32,39}

3.23. GATEO CELULAR.

El gateo celular son movimientos celulares a través de la superficie representa que representan una forma básica de locomoción celular, empleada por una gran variedad de diferentes clases de células. Ejemplo de ello incluye a los movimientos de las amebas la migración de células embriológicas durante el desarrollo, la invasión de las células blancas ante una infección, el movimiento adecuado demuestra salud en las células. Todos estos movimientos están basados en las propiedades dinámicas del citoesqueleto de actina, aunque todos estos procesos aun no están bien comprendidos. ^{42,32,35,39}

El gateo celular involucra un ciclo coordinado de movimientos los cuales pueden ser visualizados en tres pasos. Primero protrusión de la célula, debe extender una parte de la estructura, segundo estas extensiones se unen hacia el substrato mientras la célula migra, finalmente la parte trasera de la célula se disocia de la unión y se contrae hacia la dirección del movimiento de la célula. ^{42,32,39} Una variedad de experimentos indican que la extensión de la cabeza de la célula involucra la polimerización y cruce de los filamentos de actina. ^{42,35}

3.24. EL CORTEX DE ACTINA GENERA LA POLARIDAD CELULAR.

En general, los microtúbulos funcionan como entidades individuales, mientras que los filamentos de actina, actúan formando redes o haces. Existen filamentos de actina de bajo de la membrana los cuales forman una red de proteínas de actina llamados cortex celular. Esta red es altamente dinámica y funciona como las miosinas controlando los movimientos de la superficie celular. La localización y orientación de los filamentos de actina están controlados por lugares de enucleación de la membrana plasmática.^{42,32,39}

Determinadas señales extracelulares afectan una parte de la superficie celular provocando reestructuraciones locales del cortex de actina. De manera inversa la organización del cortex tiene influencia sobre el comportamiento de la membrana plasmática. Los movimientos de actina provocan la morfología y la polaridad de la célula, estos mecanismos aún no están totalmente esclarecidos.^{42,32,39}

El estudio del citoesqueleto es muy difícil debido a que el ensamble depende de un complejo conjunto de proteínas que se unen en grupos cooperativos a los filamentos del citoesqueleto. Es muy difícil estudiar el efecto simultáneo de este conjunto de proteínas. En segundo lugar, los cambios que provén el citoesqueleto en la célula son muy difíciles de medir debido a que son mínimos.^{42,32.}

3.25. FILAMENTOS INTERMEDIOS.

Los filamentos intermedios son fuertes polipéptidos fibrosos a modo de cuerda, que resisten tensiones, su función es estructural y mecánico para la función de la célula. Se conocen distintas formas específicas de filamentos intermedios que difieren en el tipo de polipéptido que los forma: entre las que se encuentran los filamentos de queratina de las células epiteliales, los neurofilamentos de las células nerviosas de los filamentos gliales de los astrocitos y las células de Shwann, los filamentos de vimentina de los fibroblastos y otros muchos tipos celulares.³⁵

Cada filamento de actina esta compuesto por monómeros compuestos por secuencias distintas de aminoácidos, cada una de estas unidades presenta un dominio central homólogo que cuando se dimeriza forma una estructura de enrollado rígido. Los dominios son el eje estructural de los filamentos intermedios, existen cierta cantidad de dominós variables que tienen la capacidad de unirse con otros componentes específicos de la célula.³⁵

3.26. PROTEÍNAS FILAMENTOSAS INTERMEDIAS.

Mientras los filamentos de actina y microtúbulos son polimerizados por simples tipos de proteínas (actina, tubulina) los filamentos intermedios son compuestos por una variedad de proteínas que se expresan en diferentes tipos de células, mas de 50 diferentes proteínas de filamentos intermedios han sido identificadas siendo clasificadas en seis grupos. Los tipos I y II consisten en dos grupos de keratinas cada cual consiste en cerca de 15 diferentes proteínas las cuales se expresan en células epiteliales. Cada tipo de célula epitelial sintetiza por lo menos un tipo I (ácido)

y un tipo II (neutral o básico) keratina la cual se polimeriza para formar filamentos.^(11,42) El tipo III de proteínas intermedias filamentosas incluye a la vimentina la cual se encuentra en una variedad de diferentes clases de células como los fibroblastos, células musculares lisas y células rojas, el tipo VI se expresa en neuronas, el tipo V en proteínas filamentosas intermedias como laminas nucleares. Difieren de otras proteínas filamentosas intermedias en la que se ensambla en forma de mallas ortogonales debajo de la membrana nuclear.^(11,42) a pesar de una considerable diversidad en tamaño y de secuencia amina la variedad de las proteínas filamentosas intermedias muestran una estructura organizacional común.

Los filamentos intermedios son generalmente más estables que los filamentos de actina o los microtúbulos y no demuestran el dinamismo dentro del citoesqueleto. Sin embargo las proteínas filamentosas intermedias son frecuentemente modificadas por la fosforilación la cual regula su ensamble y desensamble dentro de la célula. Plectina por ejemplo se une a los filamentos de actina y los microtúbulos uniendo filamentos intermedios lo cual provee puentes entre los componentes del citoesqueleto. Estos puentes estabilizan los filamentos de actina y microtúbulos lo que incrementa la estabilidad de la célula.^{11,42}

3.27. MICROTÚBULOS.

Microtúbulos: Es el tercer principal componente del citoesqueleto. Es rígido con forma de ruedas con hoyos, son estructuras dinámicas que sufren continuo ensamble y desensamble, funciona estrechamente con las estructuras de actina para determinar la forma celular y una variedad de movimientos celulares, algunas formas de locomoción, el transporte intracelular de organelos y la separación de cromosomas durante la mitosis.^{11,42}

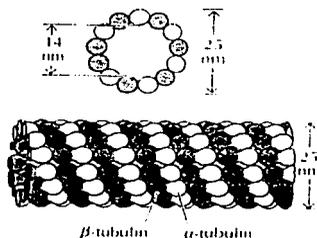


Fig 14. Estructura de los microtúbulos.

Geoffrey M. Cooper. *The cell a molecular approach*. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.28. ESTRUCTURA, ENSAMBLE DINÁMICA Y FUNCION DE LOS MICROTÚBULOS.

En contraste de los filamentos intermedios los cuales componen una variedad de diferentes proteínas fibrosas los microtúbulos están hechos por proteínas globulares simples llamadas tubulina. La tubulina es un dímero que consiste de dos polipéptidos muy parecidos de 55kd, alfa tubulina y beta tubulina. Además un tercer tipo de tubulina (γ tubulina) es específicamente localizada en el centrómero mientras que juega un papel importante en la iniciación del ensamble de los microtúbulos.^{32, 35, 39}

Los dímeros de tubulina se polimerizan desde los microtúbulos lo cual generalmente consiste en trece protofilamentos lineales ensamblados alrededor de un una rueda con un hoyo. Los microtúbulos (como los filamentos de actina) son estructuras polares con dos diferentes extremos: uno de rápido crecimiento llamado extremo positivo y el otro extremo negativo de lento crecimiento. Esta polaridad es importante para determinar la dirección del movimiento a lo largo del microtúbulo, sólo la polaridad de los filamentos de actina define la dirección del movimiento de la miosina.^(32, 35, 39.) El ensamble de los microtubulos necesita GTP que se convierte a GDP. Si la unión GDP-tubulina se disocia dará como resultado una rápida despolimerización y reducción de los microtúbulos.^{42,44,45}

La inestabilidad dinámica resulta en el continuo y rápido movimiento de la mayoría de los microtúbulos los cuales tienen una vida media de solo unos minutos dentro de la célula, esto es crítico para permitir la mitosis de la célula. Los fármacos que inhiben la polimerización de los microtúbulos con la colchicina, colcemida y taxol que son ejemplos de cómo ciertas drogas inhiben la polimerización de los microtúbulos al unirse a la tubulina lo cual bloquea la mitosis.^{42,44,45}

En las células animales el mayor centro organizado de microtúbulos es el centrómero el cual es localizado junto al núcleo cerca de centro de interfase de la célula. Durante la mitosis microtúbulos se extienden por afuera de los centrómeros para formar el huso mitótico el cual es responsable de la separación y distribución de los cromosomas hijas. El centrómero juega un papel importante en cuanto a determinar la organización intracelular de los microtúbulos aunque muchos de los detalles de su función son un misterio.^{42,44}

Los centrómeros sirven como el sitio de iniciación para el ensamble de los microtúbulos los cuales crecen por afuera del centrómero hacia periferia de la célula.^{42,44,45}

Durante la mitosis los microtúbulos se reorganizan completamente lo que demuestra la importancia de la inestabilidad dinámica. El arreglo de los microtúbulos presenta en la interfase celular desensamblados y unidades libres de tubulina son ensambladas para formar el huso mitótico el cual es responsable de la separación de los cromosomas hijas. Esta estructura del citoesqueleto de los microtúbulos es solo para la duplicación del centrómero para formar dos centros separados de organización de microtúbulos opuestos en los polos de uso mitótico.^{41,42}



Fig. 15. Durante la mitosis la reorganización de los microtúbulos es de suma importancia para separar las porciones de DNA.

Geoffrey M. Cooper. The cell a molecular approach. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

El comportamiento dinámico e inestable de los microtubulos puede ser modificado por medio de interacciones con otras proteínas. Algunas proteínas celulares actúan para desensamblar los microtúbulos, o para aumentar la tasa de polimerización de tubulina en los extremos de los microtúbulos. Otras proteínas (llamadas proteínas asociadas de microtúbulos o MAPS) se unen a los microtúbulos y aumentan su estabilidad. Estas interacciones son importantes para determinar la forma y movimiento de la célula.

Los microtúbulos son responsables de una gran variedad de movimientos celulares, incluyendo el transporte intracelular y la posición de las vesículas de membrana y organelos, la separación de los cromosomas en la mitosis. Miembros de dos grandes familias de proteínas de movimiento - las cinasas y las dineínas - son responsables de la capacidad y la variedad de movimientos en cada microtúbulo.^{11,42}

Quinesina y dineína, las proteínas prototipo de motor de los microtúbulos, se mueven a lo largo de los microtúbulos en direcciones opuestas - kinesina desde el extremo positivo y dineína el extremo negativo.⁽⁴²⁾ Diferentes miembros de la familia kinesina varían en su secuencia amina en el extremo carboxilo terminal siendo responsables de diferentes tipos de movimiento, incluyendo movimiento de organelos y cromosomas a lo largo de microtúbulos³²

Además de las importantes tareas que supone el transporte y el movimiento los microtúbulos se asocian con la posición de los organelos (como el retículo endoplasmico, aparato de Golgi, lisosomas y mitocondria.)^{32,42}

Si los microtúbulos se desbaratan ya sea por una droga o cuando la célula entra en mitosis, el aparato de Golgi se rompe en pequeñas vesículas que se dispersan a través del citoplasma. Cuando los microtúbulos se rehacen el aparato también se reensambla, de esta forma el movimiento de los microtúbulos es responsable de la estabilidad de las posiciones y estructura de los organelos respecto a la membrana.^{32,42}

3.29. SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN Y EL CITOESQUELETO.

Las funciones de la mayoría de las células están directamente afectadas por la adhesión y la organización del citoesqueleto. Los receptores responsables de la adhesión celular actúan sobre las vías de señales intracelulares las cuales regulan otros aspectos de la vida de la célula y afectan la organización del citoesqueleto. Los factores de crecimiento frecuentemente actúan para inducir las alteraciones del citoesqueleto provocando movimientos ó cambios en la forma celular. Los componentes del citoesqueleto actúan tanto en los receptores y en las vías de señales intracelulares y con este proceso se integra la forma celular, el movimiento y otras respuestas celulares.^{42,9,14}

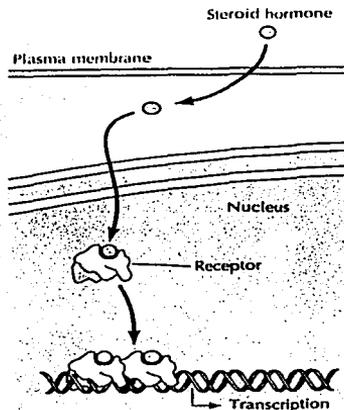


Fig. 16. Cuando una señal del exterior de la célula (en este caso el una hormona asteroidea) contacta la superficie causa una reacción en cadena que observa como la transtlocación al núcleo para promover la transcripción de otras proteínas. Este suceso se observa en la activación de Erk. Geoffrey M. Cooper. The cell a molecular approach. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

3.30. INTEGRINAS Y SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN.

Las integrinas son los receptores con mayor responsabilidad para la unión de las células en la matriz extracelular. Las integrinas interactúan con componentes del citoesqueleto para proveer estabilidad entre la matriz extracelular y las células adherentes. Las integrinas sirven como receptores que activan señales intracelulares además controlan la expresión de genes y otros aspectos de la vida celular en respuesta a interacciones de adhesión.^{11,12,20,28}

Como miembros de una súper familia de receptores, la estructura de las integrinas tiene colas cortas citoplásmicas que se unen intrínsecamente a la actividad enzimática, ejemplo de esto es la fosforilación de proteínas de tirosina como una respuesta temprana a la interacción de integrinas con los componentes de la matriz extracelular, esto hace pensar que las integrinas son parecidas a los noreceptores de kinasas de la proteína tirosina. En particular un noreceptor de proteína kinasa llamada Fak (focal adhesion kinase) juega un papel importante en el rol de las señales de integrinas. Como su nombre lo indica Fak es localizada en adhesinas focales y rápidamente se convierte en tirosina fosforilada seguida de la unión a la integrina de los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina.^{42,33}

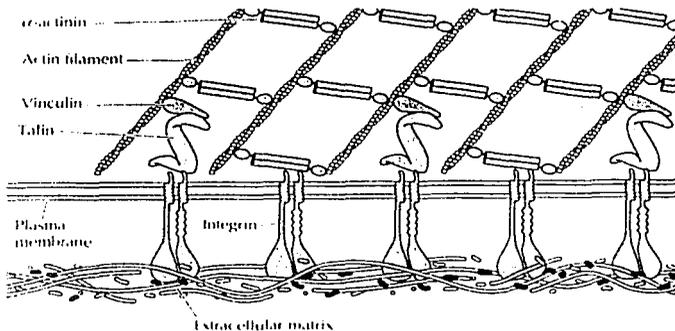


Fig. 17. Las integrinas en su parte externa se unen con algún efector activando ciertas señales celulares y por el interior celular alteran la formación del citoesqueleto de actina. Geoffrey M. Cooper. The cell a molecular approach. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

3.31. REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA.

La respuesta celular a señales extracelulares incluyen factores de crecimiento, frecuentemente incluye cambios en el movimiento y forma celular, por ejemplo, los factores de crecimiento inducen alteraciones en la movilidad celular (como en la proliferación) juega un papel muy importante en los procesos de salud en los tejidos y durante el desarrollo embriológico estos aspectos son gobernados especialmente por el citoesqueleto de actina. En particular, muchos tipos de movimiento celular están basados en un ensamble dinámico y desensamble de los filamentos de actina. La remodelación del citoesqueleto de actina representa un elemento principal de la respuesta de muchas células ante los factores de crecimiento y señales intracelulares.^{35,36}

Entre el enorme grupo de proteínas que intervienen en el ensamble y desensamble del citoesqueleto se encuentra la subfamilia de Rho que son pequeñas proteínas de unión a GTP (como Rho, Rac y Cdc42) que tienen un papel central en la regulación y organización de las citoesqueleto y en las funciones de movilidad celular, adhesión celular y citoquinesis. El papel los miembros de la familia de Rho es regular los diferentes aspectos del remodelado de actina. Fue reconocido por vez primera en estudios de fibroblastos expuestos a un factor de crecimiento. Las alteraciones resultantes del factor de crecimiento incluye la producción de protrusiones en la superficie celular (filopodia, lamellipodia y arrugas de membrana) así como la formación de adhesiones focales y fibras de stress. La microinyección a células con mutantes específicos con los diferentes miembros de la familia Rho ha demostrado que Cdc42 induce la formación de microspikes (micropuntas) o filopodia. Rac media la formación de lamellipodia y de membrana y Rho es responsable de la formación de la adhesión focal y fibras de stress. Se ha visto que la importancia de Rho en la modificación del citoesqueleto no solo en los fibroblastos, por ejemplo en las células epiteliales la familia Rho regula la formación de uniones de adhesión, la cual se involucra en la formación de uniones, las cuales se relacionan uniones a cadherina al citoesqueleto de actina. Los miembros de la familia Rho sirven como reguladores universales del citoesqueleto de actina al provocar señales extracelulares para cambiar la forma y movimiento. Además los miembros de Rho pueden activar las señales de MAP kinasas, así estas pequeñas proteínas de unión a GTP funcionan como un regulador dual del remodelando del citoesqueleto y la expresión de genes.^{42,44}

Recientes experimentos han demostrado que algunas vías como la familia de Rho regulan las alteraciones del citoesqueleto. Una proteína importante de la aparición de Rho es la quinasa de proteína serina/treonina llamada Rho quinasa. La activación de la quinasa Rho aumenta la fosforilación de cadenas ligeras de miosina. El aumento resultante en la cadena ligera de miosina activa la miosina y dirige el ensamble de filamentos de miosina-actina resultando en las alteraciones del citoesqueleto como la formación de fibras de stress y adhesiones focales. Además el efecto de la fosforilación de la cadena ligera de miosina afecta la fosforilación de otras proteínas kinasas (LIM-kinasas) la cual fosforila la unión de actina con la proteína cofilina. Cofilina es un agente que regula el desensamble así como su fosforilación por LIM quinasa directamente se une a Rho para regular los dímeros de los filamentos de actina.^{32,42}

Una llave principal de Rac y cdc42 es la quinasa de proteína serina threonina llamada PAK. Como una quinasa Rho, Pak también afecta la fosforilación de la cadena ligera de miosina, pero en dirección opuesta. PAK fosforila e inhibe la quinasa ligera de miosina, dirigiendo el decremento en la cadena ligera de miosina, esto resulta en la inactivación de miosina II y descenso en la interacción de actina miosina, consistente con las habilidades de Rac y Cdc42 para estimular la formación de superficies celulares provoca fibras de stress y adhesiones focales. Activación de Rac también libera

la estimulación de LIM kinasa y la fosforilación de cofilina, se une Rac para remodelar el citoesqueleto de actina.^{22,42,44}

3.32. VÍA DE RAS, RAF Y MAP KINASA.

La vía de MAP kinasa se refiere a la cascada de proteínas quinasas que está altamente conservada en la evolución y juega un papel muy importante en la transducción de señales en todas las células eucarióticas desde hongos hasta humanos. Los elementos centrales en la vía es una familia de proteínas quinasas serinas / threonina llamadas las MAP kinasa (de mitogen-activated protein kinases "proteína quinasa de mitógeno activado") que son activadas en respuesta a una variedad de factores de crecimiento y otras señales moleculares.

En los hongos, las vías de MAP kinasa controlan una variedad de respuestas celulares incluyendo apareamiento, forma celular y esporulación. En eucariotes de gran evolución las quinasas MAP son reguladores del crecimiento y diferenciación celular.

La proteína kinasa más caracterizada en las células mamíferas en la familia de ERK (extracelular signal-regulated kinase, "quinasa extracelular de señal regulada".) La activación de ERK juega un papel muy importante en la señal de proliferación celular inducida por factores de crecimiento que actúan a través de proteínas de Tirosina / kinasa o proteínas G receptores acopladas. Otro tipo de proteínas pueden ser activadas por ERK como proteína kinasa C que parece ser responsable de la estimulación de la proliferación celular inducida por esteroides de forbol que son promotores de tumores. Además las vías del calcio y AMPc se cruzan con las señales de ERK ya sea estimulando o inhibiendo la vía de ERK en diferentes tipos de células.^{42,30,31}

La activación de ERK es mediada por dos proteínas quinasas las cuales están acopladas al receptor de crecimiento por las uniones de proteína GTP llamadas Ras. La activación de Ras es a través de la activación de Raf una proteína kinasa, la cual fosforila y activa la proteína kinasa llamada MEK (para MAP kinasa/ERK kinasa). MEK es una proteína específica dual que activa los miembros de la familia de ERK por medio de la fosforilación de ambos residuos de threonina y tirosina separados por un aminoácido. Una vez activado la fosforilación de ERK se activan otras señales como ya sea otra proteína kinasa y factores de transcripción.^{42,30,31}

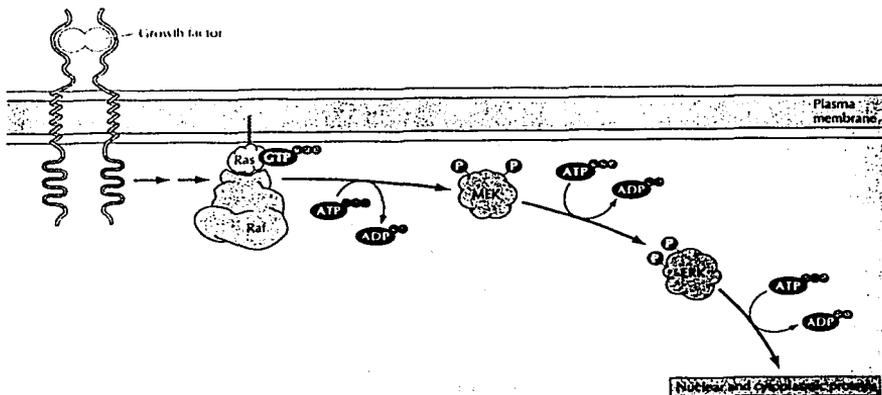


Fig. 18. La activación de Erk contiene una cadena de pasos a seguir desde un receptor de membrana como una integrina o un factor de crecimiento el cual activa señales como Raf y MEK. Geoffrey M. Cooper. The cell a molecular approach. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

El rol principal de la vía ERK en las células mamíferas se basa en el estudio de las proteínas Ras (rat sarcoma virus) las cuales son las primeras identificadas como promotores oncogénicos de tumores con origen viral que causan sarcomas en ratas. El interés en Ras ha aumentado desde el estudio del cáncer humano. La importancia de Ras en las señales intracelulares se ha demostrado con ensayos donde se inyecta proteína activa de Ras que induce la proliferación de células mamíferas normales. ^{42,30,31}

Debido a que Ras no solo es capaz de inducir el crecimiento anormal de las células cancerosas, parece ser también importante para la respuesta normal de las células en la estimulación de factores de crecimiento. ^{42,30,31}

Es de hacer notar que la activación inicial de Raf inicia la cascada de la proteína quinasa para finalizar con la activación de ERK. Entonces ERK activada fosforila una gran variedad de proteínas que incluyen otras kinasas. Es de importancia hacer notar que una fracción de ERK activada se transloca al núcleo cuando regula los factores de transcripción por medio de la fosforilación. Es importante y notable que la primera respuesta de la estimulación de los factores de crecimiento es la rápida inducción transcripcional de una familia de aproximadamente 100 genes llamados genes de tempranos-inmediatos. La inducción de un número de genes tempranos es mediada por la secuencia de regulación llamada elemento de respuesta al suero SER la cual es reconocida por un complejo de factores de transcripción incluyendo respuesta del factor de suero SRF y Elk-1. Erk fosforilada activa ELK-1 promoviendo una unión directa entre la familia de ERK de las cinasas de MAP y induce tempranamente la inducción de genes. Muchos genes de temprana expresión codifican

factores de estimulación de factores de crecimiento con lo cual se establecen nuevos programas de codificación y expresión genética.^{42,30,31}

Tanto hongos como células mamíferas tienen múltiples vías de MAP cinasas que controlan distintas respuestas celulares. Cada cascada consiste en tres proteínicas kinasas: una MAP cinasa terminal y dos cinasas reguladas (análogas para Raf y MEK) que regulan su actividad. Además los miembros de la familia ERK, estos incluyen a JNK y p38 MAP cinasas, es preferentemente activada por la respuesta inflamatoria de las citoquinas y stress celular. Mientras que la señal de ERK principalmente lleva hacia la proliferación celular, la sobrevivencia y la diferenciación, la vía MAP cinasa se puede translocar al núcleo y fosforilar factores de transcripción que regulan la expresión genética. Múltiples vías de MAP cinasas están presentes en todos los tipos de células eucarióticas para controlar la respuesta de diversos señales del medio.^{42,30,31}

3.33. BACTERIAS QUE MODIFICAN EL CITOESQUELETO.

La mayoría de las bacterias causan alteraciones en el citoesqueleto de las células, una de las más estudiadas es *Listeria monocytogenes* este microorganismo provoca una forma aguda de envenenamiento alimentario, su estudio ha proporcionado datos inesperados acerca del mecanismo mediante el cual la célula controla la polimerización local de la actina. Esta bacteria patógena penetra por fagocitosis en la célula, entonces secreta enzimas que rompen la membrana del fagosoma y se liberan en el citosol de la célula huésped. Mediante la nucleación de los filamentos de actina una bacteria individual se desplaza por el citosol a una velocidad de 10micras por minuto dejando tras ella una cola de filamentos de actina con esto la bacteria altera al citoesqueleto que actúa como los sistemas de transducción de señales intracelulares.^{66,69,70}

3.34. CARACTERÍSTICAS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS.

Muchas clases de especies bacterias gram-positivas habitan la cavidad oral específicamente en la placa dental que se encuentra alrededor del diente y sobre las mucosas. Las especies gram-positivas tienen gran variedad en la morfología desde coco hasta bacilos irregulares. Las bacterias normalmente son curvadas o torcidas y muchas especies forman filamentos en ramas. El mayor genero de este grupo celular es la familia de los *Actinomyces* que en la boca se encuentra en grandes proporciones.^{66,63,85}

La aero-tolerancia (la sensibilidad) de bacterias gram positivas se encuentra en rangos desde aerobios como el *Micrococcus* y los facultativos como *Actinomyces* y anaerobios aerotolerantes como *Lactobacillus*. Metabólicamente la mayoría de estas especies son fermentativas que producen un rango de ácidos y productos a partir de los carbohidratos (azúcares) y aminoácidos.^{47,85}

La característica principal de las bacterias gram positivas es la estructura de la membrana citoplasmática: en la cual se encuentra un polímero llamado peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática previendo rigidez, forma y estructura además el peptidoglicano al unirse firmemente al cristal violeta es el responsable del color característico de las bacterias gram positivas ante tinción de gram.

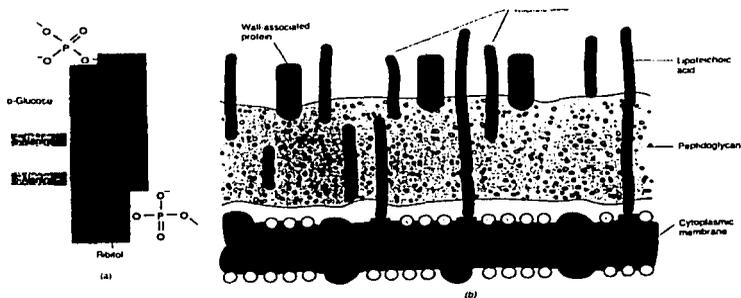


Fig. 19. La estructura la membrana celular de las bacterias gram positivos contiene petidoglucano, componente que lo hace reaccionar al cristal violeta en la tinción de gram.
Geoffrey M. Cooper. *The cell a molecular approach*. Mosby. Second edition. 2000.p.p.

3.35. GÉNERO *Actinomyces*.

Las células de *Actinomyces* son especies irregulares de bacilos muy variables en diámetro, de 0,5 a 1 micra. Suelen ser muy cortos (1.5 a 5 micras) de largo incluye filamentos de 5 a 50 micras frecuentemente muestran ramas arborescentes. Las células se arreglan en simples o en pares en cadenas cortas o en grupos. En la tinción de gram las bacterias comúnmente se muestran con apariencia granular. Algunas especies poseen fimbrias las cuales juegan un papel importante en la adherencia.^{47,57,85}

Las especies de *Actinomyces* son generalmente anaerobios facultativos y requieren dióxido de carbono para crecer, algunas líneas son preferentemente anaerobios. Estas especies tienen un metabolismo de fermentación de azúcares, la mayoría de los *Actinomyces* descomponen el peróxido de hidrógeno con excepción de *A. viscosus*, *A. Naeslundii* y *A. actinomyces*.^{47,57,85}

Todas las especies crecen bien en agar sangre, infusión cerebro corazón y en un medio de thioglycolatos. Un medio específico para este tipo de bacterias es la infusión cerebro corazón que contienen fluoruro de sodio y sulfato de colisteina como agente selectivo. Otro medio usado es el agar enriquecido con gelatina con sulfato de cobre y metronidazol para seleccionar a *A. viscosus* y *A. naeslundii*. La reactividad serologica de los serotipos dificulta que las especies puedan ser separadas por diferentes medios químicos.^{39,47,85}

El sitio de mayor colonización de *Actinomyces* es la cavidad oral en humanos y otros animales (son el mayor componente de toda la placa dental) se encuentran también en las tonsilas y en el tracto genital femenino. Hay especies individuales que causan pérdida de hueso alveolar y caries en los experimentos con ratas. Las especies de *Actinomyces* han sido asociadas con la enfermedad periodontal y juega un papel muy importante al facilitar la colonización de microorganismos más patógenos. Muy esporádicamente *Actinomyces* causa actinomycosis en el cerebro y abscesos cervicofaciales, conjuntivitis y otras infecciones como cervicitis y endometritis en la mujer que usan DIU. La infección de *Actinomyces* puede ser el resultado de la un trauma o mordidas humanas.^{29,33}

3.36. *Actinomyces naeslundii*.

Esta bacteria nombrada en honor a su descubridor Carl Naeslund es aislada de la placa bacteriana se le ha relacionado con la periodontitis activa, gingivitis y la formación de caries a nivel de los cuellos de los dientes crece en agar sangre e infusión cerebro corazón. En experimentos en el laboratorio es capaz de producir periodontitis y gingivitis con alto grado de pérdida de hueso alveolar. Se identifica como una bacteria gram positiva con forma coco-bacilar que puede llegar a formar ramificaciones.^{47,57,85.}

Actinomyces naeslundii se ha implicado en la caries dental a nivel de raíz y en la gingivitis, se sugiere que los receptores específicos de la superficie de la membrana son adhesinas que determinan la habilidad para colonizar diferentes sitios orales.

A simple vista las colonias tienen un diámetro de 1 a 5mm de diámetro con baja convexidad, de aspecto umbilical y con una elevación en su centro, usualmente presenta un color crema.^{47,57,85.}

Cuadro 2. Ficha de identificación de los laboratorios ATCC de *Actinomyces naeslundii*

Nombre de la bacteria:	<i>Actinomyces naeslundii</i> .
Numero de catalogo:	ATCC 12104
Responsable del aislamiento:	Thompson y Lovstedt.
Lugar de aislamiento:	Seno maxilar humano y boca humana.
Responsable de almacenamiento	A. Howell.
Nivel de bio-seguridad	2
Tipo de almacenamiento:	Congelado en seco.
Condiciones de crecimiento:	Medio ATCC: Caldo Actinomyces, Temperatura: 37.0C Condiciones de crecimiento: Anaeróbica.

Referencias: 5720 Georg LK et al. Identification of species *Actinomyces J.*
Bacteriol. 88: 477-490, 1964.
6471: Thompson L and Lovettedt SA An actinomyces-like organism
obtained from the human mouth Proc. Staff Meet Mayo Clin. 26: 169-
175, 1951.
9283: Cloeman Rm et al. *Actinomyces naeslundii* as an agent of
human actinomycosis Appl. Microbiol. 18: 420-426, 1969 PubMed:
70132200

ATCC 12104.

Internet: [www.http://: ATCC. com.](http://www.atcc.com)

Cuadro 3: Pruebas bioquímicas para la identificación de *Actinomyces naeslundii*.

Identificación de *Actinomyces naeslundii*.

Motilidad	No
Crecimiento anaerobio	Si
Catalasa	No
Peptidasa amino valina.	Si
Tripsina	No
Quicio tripsina.	No
Phospha midasa	Si
Alfa galactosidasa	Si
Beta Glucoronidasa	No
Alfa glucosidasa	Si
Xylosa	No
Reducción de nitratos	Si
Esculina	Si/No
Producción de indol	No
Glucosa	Si
Formación endosporas	No
Ac. Propinico	No
Ac. Acético	Si
Ac. Láctico	Si
Ac. Succinico	Si
Ureasa	Si
Reducción de nitratos	Si
Arabinosa	No
Glucosa	Si
m-manitol	Si
Rafinosa	Si
Ramnosa	No
Ribosa	Si/No
Oxidasa.	Si.

Rosan B. Mechanisms of oral colonization. Contemporary Oral Microbiology and Immunology; 1991, Editor Slots.J, USA.

3.37. ADHERENCIA DE *Actinomyces naeslundii*.

Uno de los primeros pasos en la patogénesis de la enfermedad periodontal y de la caries es la adherencia a la superficie. *Actinomyces naeslundii* son bacterias facultativas gram positivas de forma filamentosas, la adhesión de estos organismos a las superficies se debe a las proteínas específicas en las fimbrias galactosa tipo 2 y proteínas ricas en prolina, estas estructuras pueden promover la adherencia de *Actinomyces naeslundii* a otras bacterias, superficies bucales, leucocitos y células epiteliales. El tipo 1 de fimbria promueve la adhesión de *Actinomyces naeslundii* a la hidroxipatita embebida en saliva. ^{47,57,85}

En la especie *Actinomyces naeslundii* se han encontrado diferentes serotipos de bacterianos que difieren en sus características de adhesión y especificidad de sustrato en la siguiente tabla se especifica las características de cada serotipo.

Cuadro 4. Afinidad de los serotipos de *Actinomyces naeslundii*.

SEROTIPO.	APRPs*	STATERINA.	PROTEÍNAS FIMBRIAS	ORIGEN.
-----------	--------	------------	-----------------------	---------

<i>A. naeslundii</i> T14V	3	1	Si.	Bolsas periodontales.
<i>A. naeslundii</i> LY7	2	1	Si.	Placa dental humana.
<i>A. naeslundii</i> P-1-K	2	1	Si.	Placa dental humana.

Unión fuerte.	3
Unión moderada.	2
Unión débil.	1

La afinidad específica de los diferentes serotipos de *Actinomyces naeslundii* cambia para cada sustrato.

B.W. Hawkins Interaction of *Actinomyces naeslundii* strains T14V and 1204 with saliva collagen and fibrinogen. *Archs. Oral Biol*; 1993, Vol. 38, No. 6, p.p. 533-535.

***Proteínas ricas en prolina.**

La adherencia de los *Actinomyces* se ha relacionado con la unión a glucanos pero cuando se encuentra fibrinógeno o colágeno libre en el medio las bacterias se unen a este y no a al sustrato natural que son las células debido a que las adhesinas responsables de la adhesión reconocen al colágeno y fibrinógeno con mayor afinidad. ^{47,57,85}

La habilidad de *Actinomyces* para adherirse al fibrinógeno y promover su colonización a superficies cubiertas por saliva libre es muy importante para el establecimiento de microorganismos. ^{47,57,85}

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad periodontal es el segundo factor etiológico de la pérdida dental en personas adultas entre los 30 y 60 años de edad, numerosas investigaciones han sido realizadas con el propósito de establecer la etiología de esta enfermedad. Una de las consideraciones más importantes es el papel de la placa dental y de los microorganismos asociados, pero la naturaleza exacta de la microbiota no ha sido todavía determinada.

En el presente proyecto se abordó el estudio de un microorganismo gram-positivo *Actinomyces naeslundii* y su papel sobre la adherencia en fibroblastos gingivales humanos. Este estudio surge de la necesidad de conocer el comportamiento que tiene *A. naeslundii*, una bacteria asociada con enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis), sobre fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos son las células predominantes en el tejido conectivo, son las responsables de la formación de las fibras colágenas y el material extracelular amorfo. En el tejido conectivo gingival, los fibroblastos, se encargan de la firmeza y elasticidad para resistir las fuerzas funcionales y de la adherencia del epitelio al diente. Ahora bien, el daño que se produzca en estas células afecta directamente al periodonto.

5. JUSTIFICACIÓN

Un capítulo de gran importancia en el desarrollo de la investigación biológica es conocer los mecanismos de reconocimiento entre el parásito y el huésped, así mismo es de gran importancia identificar cuales son los mecanismos moleculares que conducen a la pérdida de la homeostasis en el huésped y consecutivamente al desarrollo de la enfermedad.

La investigación en el campo que nos ocupa es en particular la odontológica, la cual no está exenta de este desarrollo en la investigación de las interacciones parásito huésped, ya que hasta la fecha se han identificado al menos 300 diferentes especies de microorganismos que conviven con el organismo formando la placa dentobacteriana.

Esta convivencia bajo algunas condiciones entre las que se incluyen una deficiente higiene oral, cambios hormonales, enfermedades congénitas entre otras ocasionan que la homeostasis se rompa y la placa dentobacteriana comience a invadir la porción subgingival, y que por las condiciones microambientales favorables propicia la colonización de microorganismos anaerobios o facultativos entre los que se incluyen bacterias de tipo Gram positivo y Gram negativo. Esta colonización provoca el desarrollo de procesos inflamatorios conocidos como enfermedad periodontal, periodontitis y gingivitis que conduce en última instancia a la pérdida del órgano dentario.

La periodontitis afecta a 8 de cada 10 adultos en el mundo entre las alternativas de tratamiento se encuentran técnicas de control de placa y quirúrgicas.

En el ámbito de la investigación se han realizado un gran número de investigaciones tendientes a identificar y caracterizar los microorganismos asociados a la enfermedad periodontal y otros estudios se han realizado para esclarecer los mecanismos de adhesión entre los microorganismos con los diferentes tejidos del parodonto y su posterior colonización de los tejidos hasta el desarrollo de la enfermedad.

Esta investigación señala que *Actinomyces naestlundii* interactúa con los fibroblastos gingivales humanos al alterar el citoesqueleto con formación de fibras de stress y abultamientos de actina, además se estudiaron las estructuras de adhesión a la célula y su relación con las señales de transducción que desencadenan: el daño al citoesqueleto celular y la activación de Erk.

Lo que se pretende en este estudio es dar un paso en el conocimiento de los mecanismos de interacción de *Actinomyces naestlundii* y los componentes del huésped en específico con los fibroblastos gingivales humanos. Y ayudar así, al esclarecimiento de la etiología y el papel de la microbiota en la enfermedad periodontal.

6. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar como actúa *Actinomyces naeslundii* en los fibroblastos gingivales humanos en la morfología del citoesqueleto y activación de señales intracelulares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Caracterizar la adherencia de *A. naeslundii* en fibroblastos gingivales humanos.
- Determinar la adherencia por microscopía electrónica de barrido y transmisión.
- Observar si la adherencia ocasiona modificaciones en la organización del citoesqueleto.
- Determinar si la adherencia promueve la activación de vías de transducción de señales intracelulares.

7. HIPÓTESIS.

H. A. Si *A. naeslundii* se considera una bacteria periodontopatógena entonces se observará la adherencia de forma curso temporal en fibroblastos gingivales humanos..

H. O. H. A. Si *A. naeslundii* no se considera una bacteria periodontopatógena entonces no se observará la adherencia de forma curso temporal en fibroblastos gingivales humanos..

H. A. Si *A. naeslundii* adhiere a los fibroblastos gingivales, entonces se observará la reorganización del citoesqueleto.

H. O. Si *A. naeslundii* no se adhiere a los fibroblastos gingivales, entonces no se observará la reorganización del citoesqueleto.

H. A. Si *A. naeslundii* se adhiere a los fibroblastos gingivales humanos entonces se activarán las vías de transducción de señales intracelulares.

H. O. Si *A. naeslundii* no se adhiere a los fibroblastos gingivales humanos entonces no se activarán las vías de transducción de señales intracelulares.

8. MATERIAL Y MÉTODOS:

Equipo.

Microscopio Polivar con unidad de fluorescencia.
Microscopio confocal Nikon.
Computadora Pentium III.
Jarra de anaerobiosis.
Agitador magnético.
Incubadora para cultivo bacteriano.
Incubadora de cámara húmeda de CO₂
Campana de flujo laminar.

Reactivos.

Agar Sangre (DIFCO)
Antibiótico-antimicótico (INVITROGEN)
Cloruro de Potasio (JT BAKER)
Cloruro de Sodio (JT BAKER)
Faloidina acoplada a fluoresceína (SIGMA).
Fosfato Dibásico de Potasio (JT BAKER)
Fosfato Monobásico de Sodio (JT BAKER)
Infusión Cerebro Corazón (MERCK)
Medio Eagle modificado por Dulbecco (INVITROGEN).
Suero Bovino Fetal (INVITROGEN)
Goat anti-mouse IgG. Rhodamine conjugated. (Santa Cruz Biotechnology)
Goat anti-rabbit IgG-FITC. (Santa Cruz Biotechnology).
Mouse monoclonal IgG. Phospho ERK-p (Santa Cruz Biotechnology)
Rabbit Polyclonal IgG. Phospho PKC (Santa Cruz Biotechnology)

Material Biológico.

Actinomyces naeshlundii ATCC-12104.
Fibroblastos gingivales humanos.

Cultivo Celular:

Los fibroblastos gingivales humanos se obtendrán de pacientes que al realizar la historia clínica no reporten tener o haber padecido enfermedades crónicas, víricas, infecciosas y además el estado de los tejidos bucales no presentar algún tipo de enfermedad. La obtención del tejido gingival se realizó durante la extracción de terceros molares. Se realizaron explantes del tejido y las células se aislaron y crecieron en un medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (INVITROGEN) suplementado con 10 % suero bovino fetal (INVITROGEN), 1 % antibiótico-antimicótico (INVITROGEN) en atmósfera húmeda y en presencia de una mezcla de 95 % aire y 5 % CO₂ a 37° C. Se obtendrá una clona de los fibroblastos de acuerdo a su morfología mediante la

técnica de dilución. Los ensayos se realizarán entre los pasajes 3 a 10. Para los ensayos se utilizará DMEM libre de antibióticos – antimicóticos ⁽⁸⁶⁾

Bacteria:

Actinomyces naeslundii (ATCC 12104) se adquirió de la compañía American Type Culture Collection se colocó para su crecimiento durante toda la noche a 37°C en 5 % de CO₂ en agar soya tripticaseína (DIFCO) suplementado con hemina (10 µg/ ml) (SIGMA); extracto de levadura 0.1% (DIFCO.) Una colonia bacteriana se inocula en infusión cerebro corazón durante toda la noche a 37°C para la preservación de la bacteria se coloca en alcuotas y se mantendrá a – 85% en 0.5 % albúmina sérica de bovino. 0.14 M NaCl (TSBA) y 10 % glicerol. ⁽⁸⁰⁾

Ensayo de Adherencia:

Se usan dos tipos de cajas: en los ensayos de fluorescencia y microscopia de barrido se utilizan cajas de 24 pozos, cada pozo con capacidad de 500 µml, y para los ensayos de microscopia de transmisión cajas de 6 pozos, cada pozo con capacidad de 1 ml, se hace crecer fibroblastos gingivales humanos hasta la semiconfluencia con DMEN con antibiótico-antimicótico y 10% de suero bovino fetal.

Con la finalidad de poder manipular mejor las muestras para la observación de microscopia de fluorescencia las cajas de 24 pozos se coloca un cubreobjetos de 1 cm de diámetro.

En tubos de ensayo con 5ml de infusión cerebro corazón se hace crecer *Actinomyces naeslundii* a 37 °C en jarras de anaerobiosis por 72 hrs. Para retirar el sobrenadante se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos y se resuspende con 1 ml de DMEN sin antibiótico-antimicótico y sin suero bovino fetal.

Para hacer estos ensayos tres horas antes de la infección el medio de los cultivos se cambia por DMEN sin antibiótico-antimicótico libre de suero bovino fetal con el fin de permitir la libre interacción de la bacteria con la célula.

La relación de infección entre la cantidad de células y bacterias es de 1:50, aproximadamente la cantidad de células en cada pozo de 500 µml es de 25 000 y en los pozos de 1 ml 50 000, por lo tanto se necesitan 1 250 000 y 2 500 000 de bacterias para cada tipo de pozo respectivamente. Para medir la cantidad de bacterias que se tienen en el cultivo se mide la absorbancia a 660 nm, sabiendo que 0.1 unidades de absorbancia equivalen a 250 000 se hacen los cálculos de concentración y volumen con la formula: $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$. En la siguiente tabla se hace un resumen de las condiciones de infección:

CUADRO 5. CONDICIONES DE INFECCIÓN.

Condiciones.	FLUORESCENCIA Y BARRIDO.	TRANSMISIÓN.
	Cajas de 24 pozos (500 µml)	Cajas de 6 pozos (1ml)
Clase de medio.	DMEN sin antibiótico-antimicótico y suero bovino fetal.	DMEN sin antibiótico-antimicótico y suero bovino fetal.
Volumen de medio.	500 µml.	1 ml
Crecimiento del cultivo.	Semiconfluencia.	Semiconfluencia.
Relación de bacterias- células.	1a 50	1a 50
Cantidad de células.	25 000.	50 000
Cantidad de bacterias.	1 250 000.	2 500 000
Tiempo de infección.	60 min.	60 min.
Numero de ensayos.	Por triplicado.	Por triplicado.

Tinción de actina.

Al término de la infección las células se lavarán en tres ocasiones con buffer de fosfatos salino y se permeabilizarán en buffer de fosfatos salino adicionado con 0.1% de triton X-100 durante cinco minutos, las células se teñirán con 5 µg/ml de faloidina acoplada a fluoresceína durante 30 minutos a 4 °C . Los cubreobjetos se lavarán durante tres ocasiones con buffer de fosfatos salino y se montarán para ser observados por fluorescencia en microscopio Reichert-Polyvar. Los ensayos se realizarán por triplicado.^(78,81)

Análisis de la adherencia por microscopia electrónica de barrido.

Después de la infección se realizan tres lavados con buffer de fosfatos salino estéril para eliminar las bacterias en exceso, se fija con glutaraldehído en buffer salino de fosfato por 30 minutos 4°C. La muestra se procesará para la observación de microscopia electrónica de barrido marca Jeol No. 5410 low vaccum. Los ensayos se realizarán por triplicado y se colocará un campo representativo de la observación.⁽⁵⁹⁾

Análisis de la adherencia por microscopia electrónica de transmisión.

En este ensayo las células se crecieron en cajas de cultivo al término de la infección se lavaron durante 3 ocasiones con PBS con el propósito de eliminar el exceso de bacterias y se procesaron para su observación en microscopio electrónico de transmisión marca Jeol 12EX2. Los ensayos se realizarán por triplicado.⁽⁴⁴⁾

Ensayos de inmunohistoquímica para la detección de componentes de transducción de señales.

En el ensayo las células se crecerán en cajas de cultivo de 24 pozos con cubreobjetos hasta la confluencia. Se realizarán los ensayos de curso temporal con una proporción de infección 1:100 de *Actinomyces naestlundii*, por cada célula a continuación las muestras serán fijadas con paraformaldehído por 30 minutos. Las células se permeabilizar con Tritón X100 al 0.1% por 5 minutos se retirará con varios lavados de PBS y se agrega el primer anticuerpo por una hora (anti-ERK), al terminar este tiempo se vuelve a lavar y se agrega el segundo anticuerpo en la oscuridad por una hora. Para poder observar esta muestra se deben montar los cubreobjetos con resina y ser observados en microscopio de fluorescencia.⁽⁷⁸⁾ La observación de las muestras tratadas para fluorescencia serán observadas en el microscopio confocal con el fin de mejorar la calidad del registro y su mejor almacenamiento.

Tipo de ensayo.

Experimental, prospectivo, comparativo.

Cuadro 6. Variables de ensayos.

Caja de 24 pozos.

ENSAYOS DE FLUORESCENCIA.*

Pozo.	Descripción.	Anticuerpo.	Fluororoturo.	Tiempo.	# Células.	# Bacterias.	Relación Cel/Bac.
1	Control.	Actina.	Fluoresceína.	60 min.	25 000		
2	Infección An.	Actina.	Fluoresceína.	60 min.	25 000	1 250 000	1a 50.
3	Control.	Actina.	Fluoresceína.	120 min.	25 000		
4	Infección An.	Actina.	Fluoresceína.	120 min.	25 000	1 250 000	1a 50.
5	Control.	Erk.	Rodamina.	60 min.	25 000		
6	Infección An.	Erk.	Rodamina.	60 min.	25 000	1 250 000	1a 50.
7	Control.	Erk.	Rodamina.	120 min.	25 000		
8	Infección An.	Erk.	Rodamina.	120 min.	25 000	1 250 000	1a 50.

ENSAYOS DE MICROSCOPIA DE BARRIDO.*

Pozo.	Descripción.	Tiempo.	# Células.	# Bacterias.	Relación Cel/Bact.
9	Control.	120min	25 000		
10	infección An.	120 min.	25 000	1 250 000	1 a 50.

ENSAYOS DE MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN.*

Pozo.	Descripción.	Tiempo.	# Células.	# Bacterias.	Relación Cel/Bact.
1	Control.	60 min.	50 000		
2	Infección An.	60 min.	50 000	2 500 000	1 a 50.
3	Control.	120 min.	50 000		
4	Infección An.	120 min.	50 000	2 500 000	1 a 50.

Cada ensayo se realizo por triplicado.

Método de recolección de datos.

Con la obtención de imágenes se realizaron en dos formas por medio de microfotografías convencionales con microscopio Polivar con unidad de fluorescencia con película Fuji color asa 1800 y por la obtención de imágenes digitales en el microscopio confocal NIKON. Todos las fotografías fueron procesadas digitalmente como archivos tipo JPG, PIC y TIFF que resuelve muchos de los problemas de calidad de imagen digital. Al observar imágenes control y de ensayo se encuentran las diferencias rápidamente ya sea por la localización (translocación al núcleo) y aumento de señal.

9. RESULTADOS.

Uno de los más importantes pasos para la infección bacteriana sobre un organismo es la adhesión ya que este es el primer paso para colonizar una superficie. La principal enfermedad responsable de la pérdida dental es la periodontitis cuyo agente causal principal es el acúmulo de bacterias. Entre este gran conjunto de bacterias llamada placa bacteriana se ha identificado a *Actinomyces naeslundii* el cual tiene gran importancia en la transición de una microflora amigable a una destructiva, su papel de eslabón entre las especies endémicas y las virulentas no se conoce del todo.

En la figura 20 se muestra una tinción de gram de *Actinomyces naeslundii* que corresponde a una bacteria gram-positiva. En los ensayos de resiembra se prosiguió realizando la tinción de gram y de igual forma se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Catalasa (-) fermentación de xilosa (-), glucosa (+), manitol (+), raffinosa (+) y arabinosa (-) y oxidasa (+) con el propósito de corroborar la pureza de los cultivos.

Identificación de *Actinomyces naeslundii* por medio de tinción de Gram.



Fig. 20. Tinción de Gram de *Actinomyces naeslundii*.

La figura muestra la tinción de las bacterias correspondiente a gram positivo. Las bacterias muestran una morfología irregular y micelar. La barra representa un aumento 100x.

Ensayos de Adherencia de *A. naeslundii* en fibroblastos gingivales humanos:

Con la finalidad de identificar la adhesión de *A. naeslundii* se hicieron tres tipos de ensayo de adherencia: microscopia de fluorescencia para actina, microscopia electrónica de barrido y microscopia electrónica de transmisión, todos estos experimentos se realizaron con en una relación 1:50 células por bacteria con tiempos de infección de 60 min. y 120 min.

En la *figura 21* se muestra la microscopía electrónica de barrido de los fibroblastos gingivales humanos infectados con *A.naeshlundii*, como se observa en el control (A) en la superficie de las células se distingue la liberación de fibras de colágena y en la *figura 22* al infectar estas células con el mencionado microorganismo observamos que las bacterias se asocian a la superficie la célula una que se produjo este contacto inicial las bacterias forman agrupaciones entre sí sobre la superficie de las células.

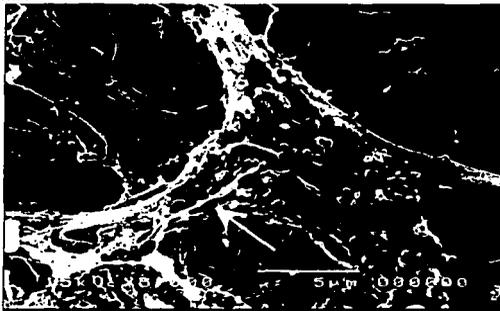
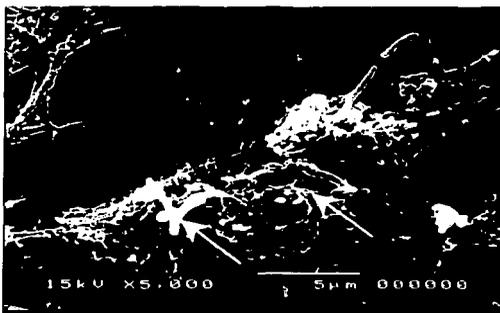


Fig. 21. Se muestra imagen por microscopía electrónica de barrido en un aumento de 5000x la superficie de los fibroblastos gingivales humanos en condiciones control. La flecha indica producción de colágeno propia de estas células



*Fig. 22. Se muestra imagen por microscopía electrónica de barrido la infección de *A. naeshlundii* sobre los fibroblastos gingivales humanos en un aumento de 5000x. Las flechas indican la interacción de *Actinomyces naeshlundii* sobre la superficie de la célula*



Fig.23. En esta imagen de microscopia electrónica de barrido se observa la adherencia que existe entre las mismas bacterias.

Microscopia electrónica de transmisión.

En la micsocpia electrónica de transmisión se muestra el contacto que se produce entre la bacteria y la célula en donde se muestra que en la adherencia están involucrados los filamentos celulares (*Fig. 24.*)



*Fig. 24. Microscopia electrónica de transmisión de fibroblastos gingivales humanos infectados con *A.naeslundii*.*

Se muestra imagen por microscopia electrónica de transmisión la adhesión que existe entre la superficie bacteriana y la del fibroblasto gingival humano. La fecha indica el sitio de interacción entre las dos células.

Microscopia de campo claro y fluorescencia.

Al observar que existe adherencia entre la bacteria y la célula es de suponer que están involucradas las fibras del citoesqueleto por lo que proseguimos a caracterizar si las fibras de actina están involucradas en la adhesión. En los ensayos de fluorescencia para actina se observaron la formación de fibras de stress y abultamientos de actina, situación que es de mucha importancia para la forma y función de la célula (Fig. 25). Con la modificación del citoesqueleto se modifica la forma y función celular y se infiere que sucede un hecho de importancia en el fibroblasto por medio de anticuerpos Anti-Erk y rodamina acoplada se observa la inminente translocación de Erk al núcleo, la activación de esta vía involucra la fosforilación de una gran cantidad de proteínas y la transcripción de genes relacionadas con la división celular.

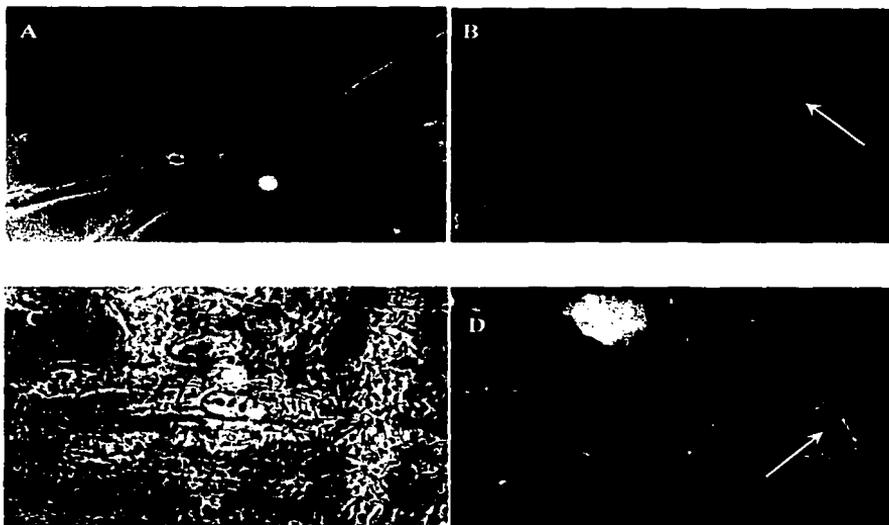


Fig. 24. En la imagen A y B se muestra un fibroblasto gingival humano en microscopia de campo claro y con tinción para actina en condiciones control. Las flechas indican el trazado liso y homogéneo de las fibras de actina.

La imagen C y D se refieren a un ensayo de infección por Actinomyces naestlundii en C en campo claro y en D con microscopia fluorescencia para actina. Las flechas indican como los lugares donde existe mayor adherencia de la bacteria y donde existe la formación de fibras de stress y abultamientos de actina.

Microscopia confocal en ensayos para Erk-p.

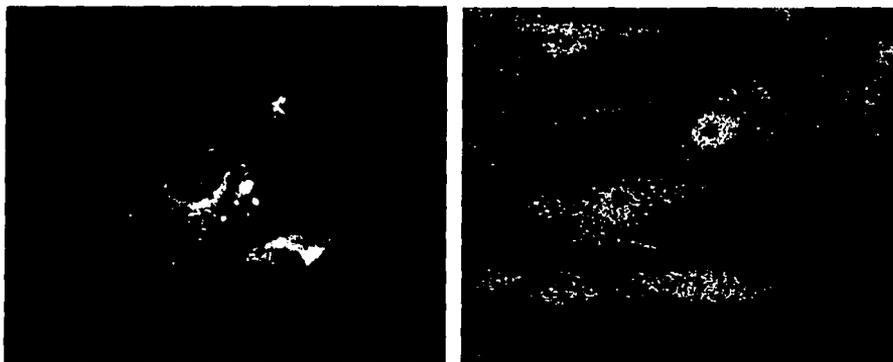


Fig. 25. Imágenes de fibroblastos tratados con anti-Erk-p., A) en condiciones control y B) con infección por 60 min, el cambio de señal en el núcleo demuestra que la adhesión de Actinomyces naeslundii causa la translocación de Erk-p hacia el núcleo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microscopia confocal para Erk-p y actina en ensayos control.

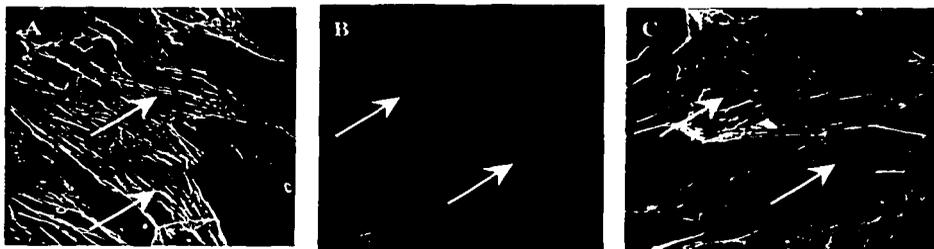


Fig.26.. Las imagenes A y B muestran la relación de los marcajes para actina y la expresión de Erk-p en condiciones controli. En la imagen A las flechas muestran la estructura de actina marcada con faloidina, observe la regularidad de las fibras de actina. En la imagen B las flechas muestran la presencia de Erk-p en el citoplasma, la imagen C es la union de la imagen A y B donde se aprecia con mas facilidad la relacion entre el macaje para actina y Erk-p.

Microscopia confocal para Erk-p y actina en ensayos de infección.

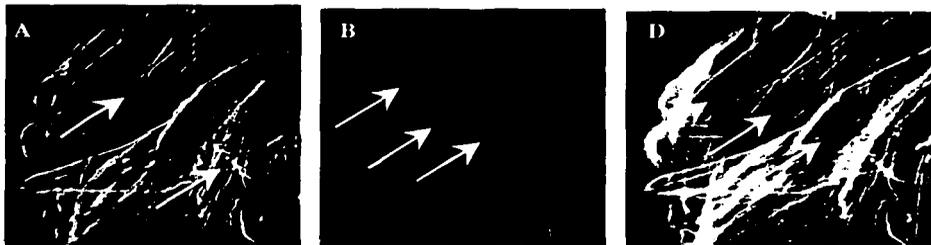


Fig. 27. Las imagenes A y B muestran la relación de los marcajes para actina y la expresión de Erk-p ante la infección de Actinomyces naeslundii. En la imagen A las flechas muestran la estructura de actina marcada con faloidina, observe las fibras de stress y abultamientos de actina. En la imagen B las flechas indican la translocacion al núcleo de Erk-p, en la imagen C es la union de la imagen A y B donde se aprecia con mas facilidad la relacion entre el macaje para actina y Erk-p.

En la *figura 26* se muestra imágenes de los marcajes para actina y Erk-p en condiciones control, la expresión de Erk-p en el citoplasma y en el núcleo la atribuimos a una situación constitutiva necesaria para la sobrevivencia de la célula, en cambio en la *figura 27* la expresión de Erk-p en condiciones de infección se concentra en el núcleo con lo que cumple con su papel de factor de transcripción.

10. DISCUSIÓN.

Los resultados del presente estudio han confirmado la importancia de la adhesión como un factor que altera a la célula en forma y función. La actividad del citoesqueleto revelada ante la fluorescencia señala que la adhesión va mas allá de la interacción de las membranas celulares lo que provoca cambios moleculares.

Muchos autores como Keith ¹⁴, Samaranyake ¹⁶, Hutchins ³³ han comprobado que la adhesión bacteriana causa modificaciones en la célula, estas alteraciones aún no se comprenden totalmente, pero se entiende la importancia de la presencia de receptores específicos como integrinas, adhesinas, lectinas y muchas otras moléculas que se necesitan en el reconocimiento de proteínas específicas de la membrana y de la bacteria. Los estudios de Gibbons ^{12, 15, 20}, reportan que la adherencia en las superficies bucales no es un hecho simple, es en realidad un conjunto de pasos donde se necesitan proteínas especiales llamadas PRP (proteínas ricas en prolina) y receptores llamados criptotopes, estas moléculas permiten una unión con mayor afinidad entre la bacteria y la célula.

Desde 1997 se ha comenzado a entender la importancia que tiene el citoesqueleto en la célula, hecho demostrado en estudios de plaquetas, macrófagos, eritrocitos y fibroblastos, ^{22, 30, 32, 36} donde se muestra que las alteraciones en el citoesqueleto modifica de la forma y la activación de cinasas.

Existen muchos conceptos nuevos y otros que se ignoran acerca de la estructura y comportamiento del citoesqueleto, el cambio de temperatura, fuerza iónica y la presencia de factores de crecimiento intervienen en la forma y función de este órgano. El citoesqueleto es una estructura en continua modificación que organiza a los orgánitos, modifica la forma y es responsable de movimientos celulares, todos estos papeles le confieren gran importancia al citoesqueleto. La adhesión de *Actinomyces naeshundii* es responsable de la formación de fibras de stress y abultamientos de actina que se relacionan con la actividad de proteínas, estas alteraciones deben modificar la capacidad de división y función celular y muy posiblemente activar apoptosis y muerte celular, situación que convergerá hacia la presencia de enfermedad en el tejido.

Investigadores como Hutchins ^{13, 33}, White ²², Roberts D. ⁴¹, que estudian el desensamblado y estabilización del citoesqueleto entienden que la forma y función de las células esta soportada por este órgano. Agentes químicos como colchicina, vincristina y otros alcaloides modifican el citoesqueleto de tal forma que células discoides se presentan como esferas. Como resultado de este experimento se encontró que la modificación del citoesqueleto por medio de la adherencia de *Actinomyces naeshundii* se representa como la formación de adhesiones focales, fibras de stress y abultamientos de actina, esta actividad debe modificar la forma, movimiento y función celular como fue observado en los estudios de Keith ⁽¹⁴⁾ sobre la adhesión de *Actinobacillus actinomycescomitans*.

La translocación de factores como Erk se han relacionado con la actividad de la división celular y con la presencia de mayores actividades de fosforilación, en nuestro experimento la translocación al núcleo es evidente y además con datos anteriores se comprende que existe aumento de la fosforilación ante la infección de *Actinomyces naeslundii* este hecho nos hace deducir que existe la necesidad de la célula para sobrevivir y dividirse. La actividad celular ante la infección seguramente no solo se reduce a la activación de una sola proteína, la transcripción de genes involucrados con otras vías debe suceder como en los resultados de Steven L. (26), Xingming Deng (32) Pao-Li (30) ellos reportan con otro modelo de infección que la actividad celular se modifica en su totalidad. La actividad del citoesqueleto y la translocación de Erk indica que esta bacteria no es tan inocua como se cree actualmente. Aunque la mayoría de las infecciones agudas se encuentran bacterias gramnegativas las grampositivas deben ser estudiadas con más cuidado tanto por clínicos e investigadores.

Aunque la importancia del estudio de *Actinomyces naeslundii* no se relaciona específicamente con las etapas más avanzadas de la enfermedad periodontal⁴⁸, tiene un rol importante en las fases tempranas, es la bacteria que se une a las superficies bucales y posteriormente a través de ella otros organismos con mayor patogenicidad se adhieren, colonizan y son capaces de destruir tejidos. Posiblemente la actividad de *A. naeslundii* sobre los fibroblastos gingivales humanos causa en el área de infección la presencia de células de defensa que anticipan la presencia de bacterias más peligrosas.

En la mayoría de la literatura se hace mayor importancia a la adhesión de *Actinomyces naeslundii* sobre las superficies dentales y se ha restado relevancia a la adhesión con las superficies de tejidos blandos donde la célula más abundante es el fibroblasto el cual produce colágeno y fibrina, estas proteínas dan forma al tejido y son el sustrato de adhesión para muchas bacterias que necesitan reconocer receptores específicos para iniciar la colonización. El medio de adherencia para *Actinomyces naeslundii* son sus fimbrias galactosa tipo 2 y del lado celular el receptor más posible es uno que tenga relación con el citoesqueleto, el más indicado son las integrinas las cuales son proteínas dimericas transmembranales que en su porción interna se encuentran unidas a los filamentos de actina, los sitios de unión entre la bacteria y la célula se reconocen también como adhesiones focales las cuales están involucradas con la transmisión de señales desde la matriz al citoesqueleto.^{44,46}

La evolución ha permitido la diversificación de diferentes formas de adhesión para los organismos con la finalidad de disminuir la competencia por un solo receptor y/o sustrato, por el otro lado la célula se ha modificado creando estructuras complejas (como el citoesqueleto) que permiten una rápida reacción ante el agresor, como lo es la fosforilación de Erk y otras proteínas.

El proceso de la adhesión es un conjunto de pasos que aun no se comprenden en su totalidad pero se acepta que es el primer suceso para el establecimiento de la infección, con la continua investigación se podrá desarrollar fármacos o procesos por los cuales se controle la adherencia. El estudio microbiológico y bioquímico de la relación de bacterias y el cuerpo humano es un intrincado camino donde se debe comprender que una bacteria en circunstancias normales no se encuentra aislada pero si en un ecosistema muy complejo y difícil de estudiar, además las bacterias más que un enemigo pueden ser la solución a muchos problemas de salud.

11. CONCLUSIÓN.

El resultado de esta investigación sustenta las siguientes conclusiones:

- 1. La adhesión bacteriana de Actinomyces naeslundii sucede sobre los fibroblastos gingivales humanos.*
- 2. La adhesión de Actinomyces naeslundii causa alteraciones importantes en el comportamiento del citoesqueleto como la formación de fibras de stress y abultamientos de actina en los lugares de adhesión bacteriana.*
- 3. La expresión de Erk-p se modifica al translocarse al núcleo ante la infección de Actinomyces naeslundii.*

3. ANEXOS.

12.1.MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO.

La microscopia a campo clara es por mucha la más usada en todo el mundo con una gran diversidad de aplicaciones. En términos generales la microscopia de campo claro se basa en la capacidad de la luz (fotones) de traspasar cuerpos opacos que han sido cortados en delgadísimas capas, al ser observadas al microscopio los lentes aumentan el tamaño de la imagen permitiendo observar las estructuras que componen la muestra.^{44,45} Para mejorar la observación de la muestra se usan tinciones las cuales se unen a cierto tipo de tejidos permitiendo otorgando un contraste entre tejidos.

12.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Se usa con el fin de estudiar las estructuras internas celulares pero el lugar de usar fotones y lentes como en la microscopia tradicional se usan electrones y electro magnetos. La resolución de este microscopio es mucho mayor que el del microscopio de luz, puede llegar a ver estructuras de tamaño molecular como protefnas y ácidos nucleicos. Sin embargo el haz de electrones no penetran la superficie de la muestra y por lo que se debe hacer cortes más profundos. En la microscopia convencional la ayuda de las tinciones es muy importante, en la microscopia electrónica de transmisión se usa ácido osmico, permanganato, uranio, lantano o plomo.^{44,45}

12.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

Es una alternativa a la técnica anterior pero en esta se tiene la característica que solo se permite observar la superficie de la muestra, la muestra se cubre con una delgada capa fina de oro u otro metal muy pesado. Es haz de electrones es dirigido a la muestra la cual barre la superficie y es reflejada devuelta a una pantalla, se obtiene un gran rango de aumentos desde 15 hasta 100 000x pero solo en la superficie del objeto.^{44,45}

12.4. MICROSCOPIA CONFOCAL.

La microscopia fluorescente puede ser combinada con el análisis de imagen que obtiene imágenes en tres dimensiones. Un pequeño punto de luz, emitida por un láser, es ajustada sobre el espécimen la fluorescencia emitida es recolectada usando un detector parecido al usado en las cámaras digitales o de video. Antes que la luz sea emitida el detector debe llegar a través de un hoyo (llamado apertura confocal) colocada precisamente en el punto donde la luz es emitida con la abertura de diafragma seleccionada finalmente la luz alcanza la muestra en un plano enfocado para comenzar el escaneo del espécimen, generando dos imágenes dimensionales que se unen en una sola para dar la perspectiva de profundidad. Aún mas se puede obtener una serie de imágenes tomadas desde diferentes puntos para reconstruir una imagen tridimensional de la muestra.^{44,45}

12.5. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

La microscopia por medio de fluorescencia se establece en bases fundamentales de la física y de la química, para entenderla se deben explicar primero los siguientes conceptos.

- Fluorescencia.-** Propiedad de los cuerpos que al ser expuestos a los rayos Uv. o a luz visible emiten luz de longitud de mayor que los rayos incidentes.
- Fluoroforo.-** Compuesto químico que emite una longitud de onda diferente a la que recibe.
- Epifluorescencia.-** Procedimiento de iluminación en la observación de muestras en microscopio en donde la luz proviene por el objetivo.

Las pruebas de fluorescencia permiten detectar una partícula o componente de un complejo de moléculas en células fijadas e incluso en células vivas.

El proceso de emisión de fluorescencia resulta de 3 pasos que ocurren en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterocíclicos) llamados fluoroforos o tintes fluorescentes. Una prueba de fluorescencia está diseñada para localizar una región específica de un espécimen biológico a respuesta de un estímulo específico. El proceso de fluorescencia comprende tres pasos:

Paso 1. Activación.

Un fotón de energía X es emanado desde una fuente externa que puede ser una lámpara incandescente o un láser que es absorbido por el fluoroforo creando un estado electrónico de excitación. Este proceso distingue la fluorescencia de la quimioluminiscencia en la cual el estado de excitación es creado por una reacción química.⁸¹

Paso 2. Estado de excitación, tiempo de vida

El estado de excitación existe por un tiempo finito durante este tiempo el fluoroforo tiene cambios conformacionales y puede tener infinidad de posibles interacciones con medios moleculares. Este proceso tiene dos consecuencias importantes. Primero la energía emanada es parcialmente perdida llegando a un estado más relajado de energía.⁸¹

Paso 3. Emisión de fluorescencia

Un fotón de energía es emitido provocando que el estado de energía regrese a un estado más bajo de energía.

La disipación de energía durante el estado de excitación, la energía de este fotón es más baja y con una longitud de onda más larga que la excitación del fotón.⁸¹

12.7. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

Al terminar el tiempo del ensayo de adherencia se elimina el medio de cultivo y se aplica solución fijadora PFA* por 30 minutos, se lava con PBS por 5 ocasiones y se permeabilizan las células con 20 µml de Triton x-100 al 0.1% por 5 minutos, se lavan las muestras con PBS. pH 8 por 5 ocasiones. En el caso de las tinciones para actina, las muestras se tiñeron con phalloidina acoplada a fluoresceína por 30 minutos a 4 °C. Para los ensayos de Erk se aplico 2µml de anticuerpo disueltos en 3µml de PBS pH 8 por 60 min. a 4°C.

Se lava con PBS pH 8 por 3 ocasiones y se coloca en la oscuridad una solución de 3 µml rodamina anti-mause y 3 µml de PBS pH 8 por 40 minutos.

Para montar las lentesjas, se aplica una gota de resina Epoxi sobre un cubreobjetos. Se lleva la muestra sobre el cubreobjetos de tal forma que la cara donde crecieron las células este en contacto con el portaobjetos. Se espera 2 horas para poder observar al microscopio. Para el almacenamiento se debe guardar en la oscuridad a 5° C.

*Solución paraformaldehido. (PFA.)

Con agitación se calienta 25 ml de agua a 60 °C se adiciona 2 gr de paraformaldehido, se agrega 3 gotas de NaOH 1N, dejar enfriar y adicionar 15 ml de agua y 10 ml de PBS.

12.8. TINCIÓN DE GRAM.

Procedimiento.

- 1- Se enciende el mechero Bunsen.
- 2- Se calienta el asa bacteriológica al rojo vivo.
- 3- Se abre la caja petri con el cultivo.
- 4- Para enfriar el asa se toca con el gel.
- 5- Se toma una colonia bacteriana que se lleva al portaobjetos.
- 6- Se coloco 5 µml de agua sobre la colonia en el portaobjetos.
- 7- Con el asa se dispersa homogéneamente sobre el portaobjetos.
- 8- Para fijar la muestra con el mechero se aplica calor.

A partir de este punto el procedimiento se hace en la tarja.

- 9- Se aplica tres gotas de solución cristal violeta* sobre la muestra por 5 minutos.
- 10- Se aplica solución de yodo* por 20 seg.
- 11- Se coloca solución decolorante* hasta que deje de emitir cristal violeta.
- 12- Se lava con agua.
- 13- Se aplica tres gotas de solución de safranina* por 5 min.
- 14- Se lava con agua.
- 15- Se seca con ayuda del calor del mechero se seca la muestra.
- 16- Se observa al microscopio.

**En este procedimiento se utiliza tres soluciones que son: cristal violeta, yodo, decolorante y safranina; la forma de prepararlos es como sigue.*

Solución cristal violeta.

Para hacer la solución de cristal violeta se disuelve 2 gr de cristal violeta en 20 ml de alcohol etílico o metílico al 95 %, y en otro recipiente con 80ml de agua se disuelve 0.8 gr de oxalato de amonio para finalizar se mezclan las dos soluciones. ⁽⁶⁵⁾

Solución de yodo.

Para hacer la solución de yodo se utiliza 300 ml en donde se disuelve 1 gr de cristal de yodo y 2gr de yoduro de potasio.

Solución de decolorante.

Se mezcla partes iguales de acetona y alcohol al 96%.

Solución de safranina.

Esta solución se hace 0.5 % de safranina en agua bidestilada.

12.6. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO.

En este experimento se usaron dos medios de cultivos bacteriano: infusión cerebro corazón y infusión cerebro corazón y agar base sangre.

INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN.

El agar infusión cerebro corazón es un medio completo usado para el cultivo de una gran variedad de microorganismos difíciles de crecer, Roseburg Epps y Clark anunciaron que este medio se debe usar con 2% de agar siendo mas satisfactorio que otros medios para el aislamiento de *Actinomyces israeli*. La incubación en atmósfera al 5% de dióxido carbono es necesaria para mejores resultados.

Composición:

Ingredientes por litro.

Infusión de caldo de cerebro 200 gr.

Infusión de corazón de buey 250 gr.

Peptona proteasa 10 gr.

Dextrosa 2 gr.

Cloruro de sodio 5 gr.

Fosfato di sódico 2.5 gr.

Acto agar 15 gr.

pH final 7.4 a 25° C.

Una libra rinde 8.7 litros de medio final. ^{87.}

Método de preparación.

Suspender 52 gr en un litro de agua destilada o desionizada y calentar hasta disolver completamente. Esterilizar en el autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión. Dispensar y enfriar.

El polvo deshidratado es homogéneo y de fácil volatilidad.⁸⁷

BASE AGAR SANGRE.

La base de agar sangre es un medio en infusión el cual puede agregarse sangre para aislar y cultivar microorganismos difíciles de crecer. Además las reacciones hemolíticas debido al cambio de pH se muestran como zonas translúcidas a verdes.⁸⁷

Composición.

Infusión de corazón de buey 500 gr.

Triptosa 10 gr.

Cloruro de sodio 5 gr.

Agar 15 gr.

pH final 6.8.

Una libra rinde 11.35 litros de medio simple.

Método de preparación.

Suspender 40 gr en un litro de agua destilada o desionizada calentar para asegurar que se disuelva completamente.⁸⁷

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 lbs enfriar a 45-50 °C.

Agregar 5% de sangre esterilizada y desfrinilada a temperatura ambiente mezclar bien.

Distribuir en cajas petri o tubos y dejar gelificar.⁸⁷

12.9. PRESUPUESTO.

El presente proyecto de investigación fue financiado por la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, jefa del laboratorio de Bioquímica de la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología y recursos del proyecto PAPIME.

13. BIBLIOGRAFÍA.

1. Prem K. Sreenivasan. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infection and Immunity; Apr. 1993. p.p. 1239-1245.
2. Michael J. Brennan. Lectin-dependent attachment of *Actinomyces naeslundii* to receptors on epithelial cells. Infection and immunity; 1984. p.p. 459-464.
3. Jonndae Lee, Tak 1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. Journal of Leukocyte Biology; December 2000. Vol. 68. p.p. 982-987.
4. P.N. Ramachandran Nair. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host responses; Periodontology 2000; 1997, Vol. 13. p.p. 121-148.
5. Tinoco. A. *Actinomycescomitans* virulence factors and periodontal status. Periodontology, 1997; Vol. 23. p.p. 1254-1262.
6. Yoshimitsu Abiko. A human monoclonal antibody which inhibit the coaggregation activity of *Porphyromonas gingivalis*. Infection and immunity; Sept. 1997. p.p. 3966-3969.
7. R.J. Gibbons. Human salivary acidic proline rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* L7 to apatic surfaces. Infection and immunity; Feb. 1988. p.p. 439-445.
8. Duane C. Hassane. Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in yeast model. Infection and immunity; Sept. 2001, p.p. 5752-5759.
9. Evangelia Morou-Bermudez. Analysis of urease expression in *Actinomyces naeslundii* WVU45. Infection and immunity; Vol. 68. p.p. 6670-6675.
10. Tomg Li. Strains of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* exhibit Structurally variant fimbrial subunit proteins and bind to different peptide motif in salivary proteins. Infection and immunity; May 1999, p.p. 2053-2059.
11. Norman Willied, Essential Dental microbiology. Academia Press 1998. New York.
12. R.J. Gibbons. Role of cryptic receptors (Criptitopes) in bacterial adhesion to oral surface. Archs oral; 1990, Vol. 35 Suppl. p.p. 107s-114s.
13. Diane Hutchins Meyer. Microtubules are associated with intracellular movement and spread of the periodopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infection and immunity; Dec 1999, vol. 67 no. 12. p.p. 6518-6525.
14. KeithP. Mintz. Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to human oral cell line. Infection and immunity; Sept. 1994, Vol. 62. No. 9 p.p. 3672-3678.

15. R.J. Gibbons. Adsorbes salivary acidic proline rich proteins contributes to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBS to Apatitic Surfaces. J. Dent. Res; September 1989, p.p. 1303-1307.
16. Samaranayake L.P. The effect of indigenous bacterial populations on bucal epithelial cells on subsequent microbial adhesion in vitro. Oral microbiol. Immunol; 1994. Vol. 9 p.p. 236-240.
17. K. Hallberg *Actinomyces naestlundii* displays variant film P and film A fimbrial subunit genes corresponding to different types of acidic proline-rich protein and beta-linked galactosamine binding specify. Infection and immunity; Sept. 1998. Vol. 9, Num. 66. p.p. 4403-4410.
18. R.J. Gibbons. Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infections diseases. J. Dent. Res. Vol. 68, No. 5. p.p. 750-751.
19. B.W. Hawkins Interaction of *Actinomyces naestlundii* strains T14V and 1204 with saliva collagen and fibrinogen. Archs. Oral Biol; 1993, Vol. 38, No. 6, p.p. 533-535.
20. R.J. Gibbons Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: A host tissues: a contribution of oral microbiology. J. Dent Res; 1996, Vol. 75, Num. 3. p.p. 866-870.
21. R.J. Gibbons Adsorbed salivary proline rich protein I and Statherin: receptors for a type fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-Ji on apatitic surfaces. Infection and immunity; Nov. 1988. p.p. 2990-2993.
22. James G. White. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. American Journal of pathology; February 1998, Vol. 152. No. 2. p.p. 689-998.
23. Camargo PM. Host modulation of adherence of oral bacterial: the effect of humanneutrofil myeloperoxiase on the attachment of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naestlundii* to saliva coated hydrocyapatite. J. Periodontal Res; 1988, Vol. 23, p.p. 334-339.
24. H.A. Manjarrez-Hernandez. Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhea. The lancet; Feb. 1992, Vol. 339. p.p.522-529.
25. Slots Taubman. Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby 1998. US. p.p. 25-58.
26. Steven L. Weistein Lipopolysaccharide induce protein tyrosin phosphorilation in human macrofagesis mediated by CD 14. Infection and Immunity; 1993, Vol. 5, No. October.
27. Martha M. Monick. Lipopolysaccharide activated Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. Journal of immunology; 2001, Vol. 166. p.p.713-4720.
28. Kozlovky A. Cell surface hydrophobicity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y. J. Clinical Periodontal; p.p. 370-372.

29. Ching Chow Chen. Protein kinase C mediates lipopolysaccharide-induced nitric-oxide synthase expression in primary astrocytes. *The journal of biology chemistry*; No. July, p.p. 19424-19430.
30. Pao-Li Wang. Toll-like receptor-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide in human gingival fibroblast. *Biochemical and Biophysical research communication*; Num. p.p.60- 67.
31. N. Stromberg. *Actinomyces* tissue specificity dependent on differences in receptor specificity for GalNacbeta - containing glycoconjugates. *Infection and immunity*; Aug.1998. p.p. 3268-3277.
32. Steven L. Weinstein. Lipopolysaccharide-Induced protein tyrosin phosphorylation in human macrophages is mediated CD 14. October 1, 1993, Vol. 151, No. 7, 3829- 3838.
32. Xingming Deng. Survival function of ERK1/2 as I13 activated staurosporine resistant Bcl2 kinases. *PNAs*; February 15, 2000, Vol. 97, No. 4, p.p. 1578-1582.
33. Diane Huthcins Meyer. Microtubules are associated with intracellular movement and spread of periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and immunity*; Dec.1997, p.p. 6518-6525.
34. N. Stromberg. Salivary receptors for GalNa cbeta-sensite adherence of *Actinomyces spp*: Evidence for heterogeneous Gal Nacbeta an proline Rich protein receptors properties. *Infection and immunity*; Aug. 1992, p.p. 3278-3286.
35. Shunji Sugawara. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblast and monocytes in a CD 14 dependent manner. *Infection and Immunity*, Apr. 1999, p.p. 1623-1632.
36. T. J. Mitchison. Actin based cell motility and cell locomotion; *Cell*, February 9, Vol. 84, p.p. 371-379.
37. Maria K. Yelung. Identification of gene involved in assembly of *Actinomyces naeslundii* T14V type 2 fimbriae. *Infection and immunity*; Apr. 1998, Vol. 66: No. 4, p.p. 1482 -1491.
38. Cantohony A. Hyman. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell*; February 8, Vol. 84, p.p. 401-410.
39. Thomas P. Stossel. On the crawling of animal cells. *Science*; May. 21, 1993. Vol. 260.p.p.200-210
40. Hallber K. *Actinomyces naeslundii* genoespecies 1 and 2 express different binding specificities to N-acetyl-beta-D- galactosamine, whereas *Actinomyces odontolyticus* expresses a different binding specificity in colonizing the human mouth. *Oral microbiol Immunol*; 1998, Vol. 13, p.p.327-336.

41. Cellular and molecular biology of intermiated filaments. Roberts D. Goldman. Plenum Press New York and London; 1990, p.p. 100-150.
42. Molecular pathogenesis of periodontal disease. Robert Genco. ASM Press Washington DC. 1994. p.p. 86-105
43. Benjamin Lewin. Lewin's Genes VII. Marban Edition. New York US. 2001. p.p.158-200.
44. Geoffrey M. Cooper. The cell a molecular approach. Mosby. Second edition. 2000.p.p. 25-68
45. Lehninger. Principles of biochemistry, Second edition. Worth Publishers, 1993, p.p. 200-263.
46. Alberts. Biología molecular de la célula. Ediciones. España. Tercera edición. 1992. p.p. 120-230
47. William Nolte. Oral microbiology. Ediciones Cuarta edición. Washington US. p.p. 425
48. Lindhe Jan. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Editorial Medica Panamericana. México.2000.p.p. 28-80.
49. Carranza L. Perry J. Periodontología Clínica. Ed. Interamerica Mc. Graw Hill. México, 1997.
50. Genco. J. Periodoncia. Interamericana Mc Graw. Hill. Vol. 1 num 12 p.p.475-482
51. Tobias P, Gener J, et al. J. Periodont. Res; 1997, Vol. 32. p.p. 99-103.
52. More W. Moore. Moore L. Periodontology 2000; Vol. 5, p.p. 66-77.
53. Stanley CH, Proguiske A. General microbiology metabolism and genetics, oral microbiology and immunology. Newman MG Edtion, Nisengard R, USA; 1988, p.p. 118-120.
54. March PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease in man. A light an electron microscopic study. J. Periodontol; 1976, Vol. 47, p.p. 1-18.
55. Demuth DR, Gloub EE, Malamud D. Streptoccal – host interactions: Structural and functional analysis of *Streptococcus sanguis* receptors for human salival glycoproteins. J. Biol. Chem; 1991; Vol. 281, .p.p. 283-289.
56. Rosan B. Mechanisms of oral colonization. Contemporary Oral Microbiology and Immunology; 1991, Editor Slots,J, USA. p.p. 125-138.
57. Schie A.A. Mechanisms of dental plaque formation. J. Periodontol; 1994,Num. 8. p.p. 246-253.
58. Socransky S.S. Microbiology of periodontal disease-present status and future considerations. J. Periodontal; 1977, Vol 48, p.p. 497-504.

59. Nyvad B & Ferjeskov O. Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian Journal of Dent. Res*; 1987, Vol. 95. p.p. 287-296.
60. Lenderberg. *Encyclopedia of microbiology*. NY. 2000, Academic Press, Second edition. p.p. 80-92
61. Rutter PR & VINCENT B. Physicochemical interactions of substratum microorganism and fluid phase. *Microbiological adhesion and aggregation*; 1984, Ed. Marshall, K. C. p.p. 90-120.
62. Busscher H. J. & Weerkamp A. H. Specific and non-interactions in bacterial adhesion to solid substrat. *FEMS microbiology. Review*; 1987, Vol. 46, p.p.165-173.
63. Van Loosdrecht MCM, lykema J, Norde W & Zhender. Characterization of microbial cells surfaces. *Experimental*, 1989, Vol. 45, p.p. 1047-1055.
63. Voet D. *Bioquímica Voet Jg*. 1991, Ed Omega S.A. México, p.p. 163-190.
64. Gibbons RJ, Van Houte. Bacterial adherence and the formation of dental plaques. In bacterial adherence. Receptors and recognition, 1980, series B , Vol. 6 Ed. London. p.p.15-58.
65. Gibbons RJ, Hay DI , Cisar JO, Clark WB. Adsorbed salivary proline- rich protein I and statherin: receptors for type I fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatic surfaces. *Infect. Immun.* 1988, Vol. 56, p.p. 2990-2993.
66. Van Houte J. Bacterial adherence in the mouth. *Reviews of infections Diseases*; 1983, Vol. 5 Supl. 4, p.p. 659-669.
67. Ellen RP. Specificity of attachment as tissue – tropic influence on oral bacteria. *Molecular basis of oral microbial adhesion*; 1985, Ed. Mergenhagen SE & Rosan B. New York. US. p.p. 85-90.
68. Gibbons RJ, Qureshi JV. Selective binding of blood grup- reactive salivary mucins by *Streptococcus mutans* and other oral organisms. *Infect. Immun*; 1978, Vol. 22. p.p. 665-671.
69. Hasty. D.L. Ofek I Minreview. Multiple adhesions of *streptococci*. *Infect Immun*; 1992, Num. 60, p.p. 2147-2152.
70. Kolenbrander PE, and london J. Adhere today, here tomorrow, oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* 1993, Vol. 175. p.p. 3247-3252.
71. Fives Taylor PM, Macrina FL, Prichard TJ, and Peene SS. Expression of *Streptococcus sanguis* antigens in *Escherichia coli*. Cloning of structural gene for adhesion fimbriae. *Infect. Immun.* Vol. 187. Num. 55. p.p.123-128.

72. Weinberg A, Belton M, Park. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect. Immun*; 1997. Vol. 65. p.p. 313-316.
73. Slots J, Gibbons Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* Sub. *accharoyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth in periodontal pockets. *Infect. Immun*. 1978, Num. 19, p.p. 254-265.
74. Naito T, Gibbons RJ. Attachment of *Bacteroides gingivales* to collagenous substrata. *J. Dent Res*; 1988, Num. 67, p.p. 1075-1080.
75. Amano A, Sharma A. Effects of temperatures stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun*, 1994, Num. 62, p.p. 4682-4685.
76. Woolley DE, Davies RM. Immunolocalization of collagenasa in periodontal tissue. *J. Periodont Res*, 1981, Vol. 16, p.p. 292-297.
77. SIGMA, Reactivos y productos químicos para investigación en las ciencias de la vida. 1999.
78. ATCC. Catalogue of cell lines & hybridomas 7th edition, 1992, p.p.165.
79. Santa Cruz Biotechnology, Inc. Research antibodies 2002, p.p. 85.
80. Ignacio Méndez Ramírez, El protocolo de investigación Lineamientos para su elaboración y análisis. Ed. Trillas. p.p.25-80.
81. Angélica Villa Reyes. Tesina. Mecanismos de adherencia bacteriana. UNAM. Facultad de Odontología 2002. p.p.25-60.
82. Willam F. Ganong. Fisiología Medica, Manual Moderno. Edición 16, 1995. p.p. 60-95.
83. Collins and Lynes. Microbiological methods, Sixth edition, Butterworth Heinemann, 1989.USA. p.p. 65-75.
84. Gibco BRL Products. Cell culture Techniques, Life technologies.1997. Mexico City
85. Siegrist y col. Difco Muanual, Difco, Tenth edition...,1991.