

01421  
239



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

EL TRATAMIENTO CON LIPOPOLISACARIDOS INDUCE LA  
FOSFORILACION DE p-38 EN FIBROBLASTOS GINGIVALES  
HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
CIRUJANA DENTISTA  
P R E S E N T A :  
ONTIVEROS GRANADOS ANA GUADALUPE

TUTOR: DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS



MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2003  
1



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.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, por su protección y guía de cada día para lograr mis sueños y metas como la realización de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme abierto sus puertas para obtener las herramientas necesarias para ser una profesionista y haberme dado la oportunidad de ser universitaria.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por darme la oportunidad de conocer el mundo de la ciencia, por todos sus consejos y por haber compartido sus conocimientos conmigo. Por todo su esfuerzo y apoyo para la realización de esta tesis.

A mi mamá por todo tu amor incondicional, tu comprensión, compañía, paciencia, apoyo, por enseñarme a salir adelante en la vida, y por preocuparte por darme siempre lo que necesito.

A mi abuelita por toda la paciencia y el apoyo moral, gracias por preocuparte por mí.

A mi tío Octavio, tío Javier, tía Toña y Jenny, gracias por la ayuda que me han brindado y por todo su cariño.

A todos los profesores que han compartido conmigo sus experiencias y conocimientos. Al Dr. Florentino Hernández, al Dr. Raúl Cabrera, al Dr. Martín Arriaga, a la Dra. Angeles Mondragón y al Dr. Manuel García Luna, y al Dr. Jaime Vera por enseñarme que en la Odontología como en todo en la vida siempre hay una solución, solo hay que esforzarse por encontrarla. A Fede por compartir conmigo tus experiencias, tus consejos, por tu apoyo y paciencia a mis ratos de torquedad.

A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica: Rita, Cesar, Perla, Karla, Silvia, Carlitos, Cielo, Martita, Sr. Armando por todo su apoyo, por compartir conmigo sus experiencias, su tiempo y haberme permitido ser una integrante más de este gran equipo.

A todos mis amigos: Karolina, Miguelito, Sandra, Rosi, Juan Pablo, Rigo, Joaco, Ana Francis, Cesar, Lulú, Edgar, Liliana, Victor, Sadotito, por su compañía, cariño; por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas.

A todas las personas que a lo largo de mi vida me han brindado una palabra de aliento en los momentos en los que más la he necesitado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DEDICATORIA

A ti mamá por ser el pilar fundamental en mi vida, por todo el amor que me has brindado, que resume todo lo que un ser humano puede hacer por otro y por ese espíritu de lucha que siempre me has demostrado y que me hace sentir muy orgullosa de ser tu hija.

A ti papá ☹ por haberte perdido lo mejor de mí.

A ti abuelita por que siempre has sido como una segunda madre para mí, por todos tus cuidados, por el tiempo que me has brindado, por darnos siempre todo cuanto has tenido y por hacerme reír siempre con tus anécdotas.

A mis primas y primos: Jenny, Liz, Katia, Rocio y Braulo por todo su cariño, su apoyo y porque siempre han sido como los hermanos que me hubiera gustado tener.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS.

Índice de tablas	3
Índice de figuras	3
1.- Abreviaturas	5
2.- Resumen	6
3.- Antecedentes	7
4.- Introducción	
4.1 Periodonto	8
4.2 Placa dentobacteriana y Enfermedad periodontal	17
4.3 Bacterias periodontopatógenas	25
4.4 Lipopolisacárido y sus receptores celulares	30
4.5 Vía MAP quinasa p38.	39
5.- Planteamiento del problema	53
6.- Justificación	53
7.- Hipótesis	54
8.- Objetivos	55
8.1 Objetivo general	55
8.2 Objetivo específico	55
9.- Tipo de estudio	55
10.- Material y Métodos	55
11.- Análisis de resultados y métodos estadísticos	66
12.- Resultados.	67
13.- Discusión	77
14.- Conclusiones	82
15.- Bibliografía	83
16.- Anexo	90
SB203580	

## ÍNDICE DE TABLAS

Título	Página
Tabla 1. Microorganismos asociados a enfermedades periodontales	29
Tabla2. Tipos de receptor TLR identificados.	36
Tabla 3. MAP quinasas	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Título	Página
<i>Fig 1. Esquema de las estructuras del periodonto.</i>	8
<i>Fig.2. Imagen de la encía clínicamente sana.</i>	9
<i>Fig 3. Esquema de un corte histológico que describe la composición de la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte.</i>	10
<i>Fig 4. Microscopía de interferencia de Nomarski de fibroblasto gingival humano. Imagen obtenida en el Laboratorio de Bioquímica de Posgrado de Odontología.</i>	12
<i>Fig 5. Esquema de las fibras del ligamento periodontal.</i>	15
<i>Fig 6. Fases de la formación de placa dentobacteriana</i>	18
<i>Fig 7. Esquema de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas</i>	28
<i>Fig 8. Esquema de la estructura general de una molécula de Lipopolisacárido</i>	30
<i>Fig 9. Esquema de la interacción de CD14m y CD14s con el complejo LBP:LPS</i>	33
<i>Fig 10. Esquema de la estructura de los receptores TLR.</i>	35
<i>Fig 11. Esquema de la señalización del complejo LBP:LPS con su receptor TLR</i>	37
<i>Fig 12. Ejemplificación de las señales de transducción</i>	39
<i>Fig 13. Fosforilación y defosforilación de residuos de Tirosina.</i>	41
<i>Fig 14 Sitio de fosforilación de p38. Observamos la fosforilación de un sustrato por p38 en presencia de Zn.</i>	43

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<i>Fig 15. Esquema de la vía de señalización de p38 por el LPS y el receptor TLR4</i>	43
<i>Fig 16. Quinasas activadas por p38</i>	45
<i>Fig 17. Participación de p38 en la respuesta inflamatoria en mamíferos.</i>	47
<i>Fig 18. Participación de p38 en la diferenciación de células T.</i>	49
<i>Fig 19. Regulación de la expresión de COX-2 por p38</i>	52
<i>Figuras de resultados:</i>	67
<i>Fig 1 A. Inducción de pp-38 por la acción de lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos. Curso temporal</i>	
<i>Fig 1 B. Gráfico.</i>	
<i>Fig 2 A. Inducción de pp-38 en FGH estimulados con LPS. Dosis-respuesta.</i>	68
<i>Fig 2 B. Gráfico.</i>	
<i>Fig 3 A. Inhibición de la inducción de la enzima NOS-2 por el inhibidor específico de p-38 SB203580 en fibroblastos gingivales humanos estimulados por LPS.</i>	69
<i>Fig 3 B. Gráfico.</i>	
<i>Fig 4 A. Curso Temporal de la inducción de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS.</i>	70
<i>Fig 4 B. Gráfico</i>	
<i>Fig 5 A. Efecto del pretratamiento con SB203580 sobre COX-2 en FGH tratados con LPS.</i>	71
<i>Fig 5 B. Gráfico</i>	
<i>Fig 6 A. Curso temporal de COX-2 en FGH tratados con LPS mediante aislamiento de mRNA y reacción RT-PCR</i>	72
<i>Fig 6 B. Efecto del inhibidor SB203580 sobre COX-2 en FGH tratados con LPS mediante aislamiento de mRNA y reacción de RT-PCR.</i>	72
<i>Fig 6 C. Gráfico</i>	73
<i>Fig 7 A. Fosforilación in vivo de p38 por LPS en fibroblastos gingivales humanos.</i>	73
<i>Fig 7 B. Gráfico</i>	74
<i>Fig 8 A. Efecto del inhibidor SB203580 en la fosforilación in vivo de p38 por LPS en Fibroblastos Gingivales Humanos.</i>	74
<i>Fig 8 B . Gráfico.</i>	75
<i>Fig 9. Microscopía confocal de p38 y pp38 mediante inmunofluorescencia.</i>	76

---

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## ABREVIATURAS

AP-1= Proteína activadora -1  
ASK1= Quinasa reguladora de la señal de apoptosis  
CD14m= Proteína CD14 membranal  
CD14s= Proteína CD14 soluble  
COX-2= Ciclooxigenasa-2  
DMEM= Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco  
ERK= Proteína quinasa activada extracelularmente  
FGH= Fibroblastos gingivales humanos  
ICAM-1= Molécula de adhesión intercelular -1  
IL-1= Interleucina 1  
IRAK= Proteína quinasa asociado a receptor IL-1  
JNK= quinasa amino-terminal reguladora del factor de transcripción c-JUN  
KGF-1= Factor de crecimiento de queratinocitos 1.  
LBP= Proteína de unión a LPS  
LPS= Lipopolisacárido  
MAPK= Proteína quinasa activada por mitógeno  
MAPKK= Proteína quinasa activadora de MAPK  
MAPKKK= Proteína quinasa quinasa activadora de MAPK  
MyD88= Gen 88 de respuesta primaria para la diferenciación mieloide.  
NF- $\kappa$ B= Factor nuclear - $\kappa$ B  
NOS2= Enzima óxido nítrico sintetasa-2  
PI3K= Fosfatidilinositol 3-quinasa  
PKR = Proteína quinasa regulada por RNA  
mRNA= ácido ribonucleico mensajero.  
RT-PCR= Reacción en cadena de la polimerasa.  
SB203580= Inhibidor específico de p38  
SBF= Suero Bovino Fetal  
TLR= Receptor Toll  
TNF $\alpha$ = Factor de Necrosis tumoral alfa.

## 1. RESUMEN

La enfermedad periodontal y la caries dental son las principales enfermedades de atención odontológica que se presentan con mayor incidencia en la población mexicana, su etiología está asociada con la presencia de microorganismos, en el caso de la enfermedad periodontal como la gingivitis y la periodontitis los principales agentes patógenos son las bacterias de tipo Gram-negativas que poseen en su superficie moléculas denominadas lipopolisacáridos.

Los lipopolisacáridos se asocian a receptores presentes en diversos tipos celulares entre los que se encuentran macrófagos, monocitos y fibroblastos gingivales humanos, estos receptores se denominan CD14 y TLR4. Su presencia permite el reconocimiento de los lipopolisacáridos y la activación de diferentes respuestas celulares, entre las que se encuentran la síntesis y liberación de citocinas e incluso la muerte celular, ambos procesos implican la activación de señales intracelulares, activación de sistemas de transducción y de factores de transcripción lo que conlleva a la inducción de genes, que a nivel clínico se pueden observar en las distintas fases de la enfermedad. Uno de los sistemas de transducción más estudiado en los últimos años es el de la familia de las proteínas quinasas asociadas a la mitosis (MAPK).<sup>21-25,37,50</sup>

La familia de las MAPK está integrada por ERK, JNK y p38. Esta última es una quinasa de peso molecular de 38 KDa que es activada por citocinas inflamatorias y por estrés celular; contribuye así mismo a la regulación de factores de transcripción y ha sido relacionada con la apoptosis.<sup>57-60</sup>

En este trabajo se estudió la fosforilación y activación de la proteína p38 mediada por LPS en fibroblastos gingivales humanos. Se realizaron estudios dosis respuesta y curso temporal, para caracterizar la fosforilación de esta quinasa y se analizaron por ensayos de western Blot. También se realizaron estudios de fosforilación *in vivo* y ensayos de inmunoprecipitación. Así mismo se estudió el efecto del inhibidor de p38 el SB203580 (5µM) sobre la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa y en la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). Por otra parte, ya que algunos autores mencionan la traslocación de las MAPK al núcleo al ser fosforiladas<sup>17,59</sup>, se observó si p38 se trasloca al núcleo al ser inducida por el LPS, para esto se realizaron ensayos de inmunohistoquímica y se observaron las muestras al microscopio confocal.

Los experimentos se realizaron en cinco ocasiones por separado y se analizaron para la obtención de la densidad óptica mediante el sistema Labworks, de los resultados obtenidos se obtuvieron las medias +/- error estándar, se realizó el análisis t-de student y se obtuvo la diferencia de cada variable con respecto al control que se tomó como el 100% del basal.

Nuestros resultados muestran que el lipopolisacárido induce la fosforilación de p-38 desde dosis de 0.1µg/ml y a partir de los 5 minutos de tratamiento. Por otra parte encontramos que p-38 está involucrada en la inducción de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa tipo 2 (NOS-2) y en la inducción de la enzima ciclooxigenasa-2, al ser estimulado con LPS; en cuanto a la traslocación de p38 al núcleo, en el microscopio confocal no se observaron cambios significativos que indiquen la traslocación de p38.

En conclusión habiendo caracterizado la fosforilación de p38 en FGH y conociendo por medio bibliográfico que existen 4 isoformas de p38 se continuará la investigación para conocer la isoforma involucrada en los fibroblastos gingivales humanos por medio de oligonucleótidos antisentido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. ANTECEDENTES

En los últimos 50 años gracias a los avances tanto en el área de la Microbiología Médica como en Biología Molecular y Celular, tenemos una mayor comprensión sobre la etiología y patogénesis de las diversas enfermedades que se presentan en el ser humano. El área Odontológica no está exenta de estos avances ya que entre las principales enfermedades a las que nos enfrentamos son las periodontales como la gingivitis y la periodontitis, las cuales han sido asociadas desde hace más de 100 años con la presencia de microorganismos presentes en la placa dentobacteriana, cuyo principal factor patogénico es la molécula conocida como lipopolisacárido, esta molécula se encuentra como parte estructural en la membrana celular de todas las bacterias Gram negativas, incluyendo las presentes en la enfermedad periodontal.<sup>1,21-25,37,50.</sup>

Dada la participación de estas moléculas en el desarrollo de las enfermedades se han realizado múltiples estudios a fin de caracterizar los mecanismos de acción de estas moléculas con las células del huésped entre las que se encuentran macrófagos, monocitos y fibroblastos gingivales humanos.

En estudios anteriores se ha observado que los LPS se asocian al receptor CD14 que se encuentra en fibroblastos gingivales humanos y recientemente se ha descrito que estas células expresan así mismo al receptor TLR, algunas evidencias señalan que la proteína TLR4 promueve una serie de respuestas celulares por medio de la activación de vías de transducción como la activación de la familia de las MAP-quinasa<sup>7,8</sup>. El sistema MAP-quinasa se ha estudiado en mamíferos y se han encontrado tres subfamilias ERK, c-JUN y p38<sup>10,11,13</sup>.

El presente trabajo será enfocado a demostrar la fosforilación de p38 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con LPS, por otra parte se determinará si la fosforilación de p-38 puede conducir a desencadenar eventos fisiológicos como el aumento en la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa e inducción de la enzima COX-2 involucrada en la producción de prostaglandinas.

En esta tesis se caracterizó el efecto de los lipopolisacáridos sobre la fosforilación de p-38 y los eventos fisiológicos que a través de esta vía se regulan.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1 PERIODONTO

El periodonto, también llamado "Aparato de inserción" o "Tejido de sostén del diente", está formado por los siguientes tejidos (Fig1):

- Encía
- Ligamento periodontal
- Cemento radicular
- Hueso alveolar

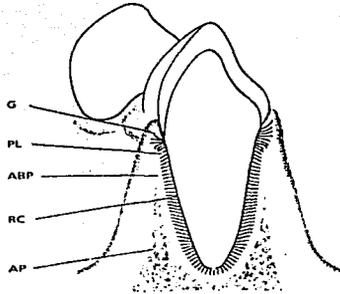


Fig 1. Esquema de las estructuras del periodonto: encía (G), ligamento periodontal, (PL), cemento radicular (CR), el hueso alveolar propio (ABP) y apófisis alveolar (AP).

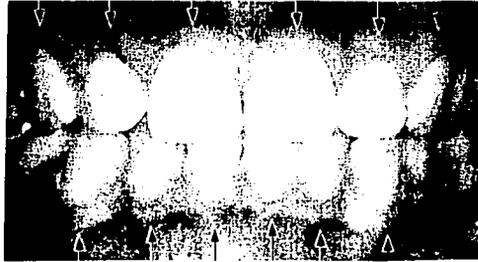
*Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karting.*

La función principal del periodonto es unir el diente al tejido óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. <sup>1-3</sup>

#### ENCÍA:

La encía es la parte de la mucosa masticatoria que cubre los procesos alveolares y rodea las porciones cervicales de los dientes. Anatómicamente está dividida en encía marginal e insertada (Fig. 2).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



*Fig 2. Imagen de la encía clínicamente sana.  
Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karting.*

### **ENCÍA LIBRE O MARGINAL.**

La encía libre es el borde de la encía que rodea los dientes a modo de collar, es de color coral, tiene una superficie opaca, consistencia firme y comprende el tejido gingival de las zonas vestibulares, lingual y palatino de los dientes, así como la encía interdental o papilas interdentarias. (Fig2)

En el lado vestibular y lingual de los dientes, la encía libre va en sentido coronal del margen gingival libre, en sentido apical hasta el surco gingival que está ubicado en un nivel que se corresponde con el nivel del límite cementoadamantino, cuya profundidad al sondeo no excede los 2 o 3 mm.<sup>2</sup>

La encía interdental corresponde a las papilas interdentales, su forma está dada por las relaciones de contacto entre los dientes, la anchura de las superficies dentales proximales y el curso de la unión cementoadamantina.

### **ENCÍA ADHERIDA:**

Se encuentra limitada en sentido coronario por el surco gingival libre y se extiende en dirección apical hacia la unión mucogingival, donde se continúa con la mucosa alveolar. Tiene una textura firme, rosa coral y suele mostrar un puntilleado fino que le da el aspecto de cáscara de naranja. Este tipo de mucosa está firmemente adherida al hueso alveolar y cemento subyacentes, por medio de fibras conectivas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

y es por tanto casi inmóvil en relación con la encía libre.

### DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DE LA ENCÍA.

La encía esta formada por tejido epitelial y tejido conjuntivo.

#### A) Tejido epitelial:

La encía libre esta formada por un epitelio que se encuentra diferenciado de la siguiente forma: epitelio bucal que da hacia la cavidad bucal, epitelio sulcular bucal que va hacia el diente sin ponerse en contacto con el mismo, y un epitelio de unión que permite el contacto encía y diente (Fig 3).<sup>1-3</sup>

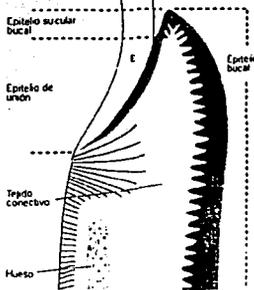


Fig 3. Esquema de un corte histológico que describe la composición de la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte.  
Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karting.

El epitelio bucal es un epitelio escamoso estratificado queratinizado, del cual se diferencia en varias capas según su grado de queratinización:

- 1.- Capa basal
- 2.- Capa de células espinosas
- 3.- Capa de granular
- 4.- Capa cornificada

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las células basales son células cilíndricas o cuboides que están en contacto con la membrana basal. Las células basales tienen la capacidad de dividirse por medio de divisiones mitóticas. En la capa cornificada se observan las células epiteliales aplanadas, muy cerca entre sí, que han perdido sus núcleos en el proceso de queratinización por lo cual se les llama ortoqueratinizadas.

El tejido epitelial está separado del tejido conectivo por medio de la membrana basal, la cual está formada por dos capas; una lámina lúcida que mira hacia las células basales y en una lámina densa que mira hacia el tejido conectivo y de la cual se desprenden las fibras de anclaje.

Las células basales que se encuentran en contacto con la lámina lúcida presentan unas zonas gruesas conocidas como hemidesmosomas. Los tonofilamentos citoplasmáticos de la célula convergen hacia esos hemidesmosomas, así estas estructuras participan en la inserción del epitelio a la membrana basal.

La unión entre las células está dada por otras estructuras conocidas como desmosomas, que pueden considerarse como hemidesmosomas encontrados.

## **B) Tejido conjuntivo:**

Es el tejido predominante de la encía y del ligamento periodontal. Sus componentes principales son las fibras colágenas (60%), fibroblastos (5%), vasos, nervios y matriz (aproximadamente un 35%).<sup>1-3</sup>

### ***Células:***

Entre las células que se encuentran están predominantemente: los fibroblastos (65% aproximadamente), macrófagos, mastocitos, neutrófilos, linfocitos, y plasmocitos.

El *fibroblasto* es una célula grande, plana y ramificada, fusiforme o estrellada (Fig 4). Su núcleo es de forma ovalada y tiene una delicada membrana nuclear, uno o dos nucleolos notables y una pequeña cantidad de cromatina en gránulos finos. En su citoplasma se observa un retículo endoplasmático granuloso bien

desarrollado con ribosomas; su aparato de Golgi es de tamaño considerable y sus mitocondrias son grandes y numerosas. Además en su citoplasma se observan muchos tonofilamentos delgados. Adyacentes a la membrana celular, en la periferia se pueden hallar una gran cantidad de vesículas. Su principal función es la producción de los diversos tipos de fibras halladas en este tejido (fibras colágena, reticulina y elásticas) y de algunos componentes de la matriz celular (glucosaminoglucanos y glucoproteínas). Los demás componentes de la matriz celular son formados por los mastocitos. El fibroblasto también está involucrado en la reparación y destrucción de los tejidos en la enfermedad periodontal. <sup>1-3,41.</sup>



*Fig 4. Microscopia de interferencia de Nomarski de fibroblasto gingival humano. Imagen obtenida en el Laboratorio de Bioquímica de Posgrado de Odontología. Aumento la barra aumento 100x <sup>70</sup>*

El *mastocito* es responsable de la producción de ciertos componentes de la matriz celular, también produce sustancias vasoactivas que pueden afectar el sistema microvascular y controlar el flujo de la sangre a través del tejido; tales sustancias son la histamina y la heparina, que se acumulan en una gran variedad de vesículas que se encuentran en el citoplasma de la célula.

El *macrófago* presenta funciones principalmente de tipo fagocíticas por lo cual pueden observarse en su citoplasma vesículas lisosómicas con material fagocitado conocidos como fagosomas. Los macrófagos abundan en los tejidos inflamados y derivan de los monocitos sanguíneos dentro de los tejidos. <sup>1-3</sup>

Las demás células como los neutrófilos y linfocitos, participan principalmente en la respuesta inflamatoria.

**Fibras:**

Las fibras presentes en el tejido conectivo de la encía se dividen en: fibras colágenas, fibras elásticas, fibras de reticulina y fibras oxitalánicas.

Las *fibras colágena* son las predominantes y son producidas principalmente por el fibroblasto, aunque también los cementoblastos y osteoblastos poseen esta capacidad. Algunas de ellas se distribuyen al azar y otras se organizan en fascículos con una orientación definida distinguiéndose: <sup>2</sup>

Fibras circulares: siguen un curso dentro de la encía libre y rodean al diente.

Fibras dentogingivales: están incluidas en el cemento de la porción supra-alveolar de la raíz y siguen un trayecto en abanico hacia la encía libre.

Fibras dentoperiósticas: siguen un trayecto en abanico igual que las anteriores pero van hacia el cemento de la porción infra-alveolar de la raíz.

Fibras transeptales: se extienden del cemento supra-alveolar de dientes vecinos.

Las *fibras elásticas* se encuentran asociadas con los vasos sanguíneos.

Las *fibras de reticulina* se caracterizan por teñirse con la tinción argirofílica y se encuentran principalmente adyacentes a la membrana basal, y en el tejido conjuntivo laxo que rodea a los vasos sanguíneos.

Las *fibras oxitalánicas* están presentes en la encía y en el ligamento periodontal, sin embargo su función es desconocida.

**Matriz:**

La matriz del tejido conectivo es el medio donde están incluidas las células del tejido conectivo, es el medio donde se difunden los nutrientes para que estas sobrevivan. Su componente principal son macromoléculas de polisacáridos y proteínas, se dividen en: proteoglicanos y glucoproteínas. Los proteoglicanos contienen glucosaminoglicanos como polisacáridos que están unidos a su porción proteica, excepto uno de los glucosaminoglucanos llamado ácido hialurónico. El componente proteico predominante son las glucoproteínas como la fibronectina y osteonectina y algunos proteoglicanos.

## **LIGAMENTO PERIODONTAL:**

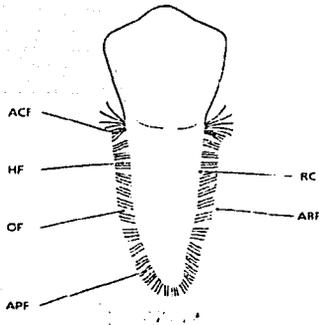
El ligamento periodontal es el tejido conectivo blando que rodea las raíces dentales y se une al hueso <sup>2</sup>.

Las fibras que conforman el ligamento periodontal se clasifican en (Fig5):

- a) Grupo de la cresta alveolar, que se extiende desde el área cervical de la raíz hasta la cresta alveolar.
- b) Grupo horizontal, estas fibras corren de manera perpendicular desde el diente hasta el hueso.
- c) Grupo oblicuo, estas fibras están orientadas de forma oblicua con inserciones en el cemento y se extienden más oclusalmente en el alveolo.
- d) Grupo apical, se diseminan desde el ápice del diente hasta el hueso.

Esta disposición de las fibras permite sustentar las fuerzas recibidas por el diente.

El ligamento periodontal está compuesto principalmente de fibrillas colágenas dispuestas en haces. La colágena representa el 50% del peso seco de todo el ligamento periodontal. Aunque también están presentes fibras elásticas asociadas a los vasos sanguíneos y fibras oxitalánicas. Cerca de la parte media del ligamento, cruzan canales de tejido conectivo laxo, el cual contiene vasos sanguíneos, linfáticos y haces nerviosos. La mayoría de sus vasos sanguíneos surgen de la médula ósea.



*Fig 5. Esquema de la ubicación de las fibras del ligamento periodontal con respecto al hueso (ABP) y el cemento radicular (RC). Fibras de la cresta alveolar (ACF), Fibras horizontales (HF), fibras oblicuas (OF), Fibras apicales (APF).*

*Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karting.*

### **CEMENTO RADICULAR:**

El cemento es un tejido mineralizado especializado que recubre las superficies radiculares de los dientes, no posee vasos sanguíneos ni linfáticos, no posee innervación, no presenta reabsorción ni remodelado fisiológico, pero se deposita continuamente toda la vida. <sup>1</sup>

Consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica. Su contenido mineral, lo constituye principalmente la hidroxiapatita en un porcentaje del 95% del peso. Sus funciones principales son la reparación de la superficie radicular y la de la inserción del ligamento periodontal.

Hay dos tipos: el cemento acelular o primario que se forma a medida que se va formando la raíz; y el cemento celular o secundario que se forma después de la erupción dentaria y en respuesta a las exigencias funcionales.

El cemento acelular cubre siempre la parte cervical del diente y en la porción apical la raíz está cubierta por cemento celular.

Ambos cementos son producidos por el cementoblasto que al quedar contenidos

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

dentro del cemento reciben el nombre de cementocitos.

En la parte que corresponde al cemento acelular se pueden observar la inserción de fibras del ligamento periodontal que se insertan tanto en el cemento como en el hueso y se conocen como fibras de Sharpey.<sup>1,2</sup>

### **HUESO ALVEOLAR:**

La apófisis alveolar o el hueso alveolar es la parte de los maxilares superior e inferior que forma y sostiene los alvéolos de los dientes.

Se pueden distinguir dos tipos de hueso:

- 1.- La porción de hueso alveolar que cubre el alveolo conocida como hueso cortical o a veces llamado lámina dura.
- 2.- La porción de la apófisis alveolar denominada por su aspecto de red, hueso esponjoso.

Junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal constituyen el aparato de inserción de los dientes, cuya función principal es distribuir y reabsorber las fuerzas generadas por los contactos dentarios.

La lámina dura o hueso compacto está perforado por múltiples conductos de Volkmann, a través de los cuales pasan los vasos sanguíneos y linfáticos, así como fibras nerviosas, estos conductos van desde el hueso alveolar hasta el ligamento periodontal.

Las unidades estructurales básicas del hueso cortical son el sistema Haversiano, que son estructuras cilíndricas y orientadas longitudinalmente alrededor de los conductos vasculares.

El hueso es formado por las células llamadas osteoblastos, y es reabsorbido por los osteoclastos. Los osteoblastos primero producen el osteoide, constituido por fibras colágenas y una matriz que contiene proteoglicanos y glucoproteínas; este osteoide experimenta una mineralización por depósitos de minerales, como calcio y fosfato, que posteriormente se transforman en hidroxiapatita. Durante este proceso de mineralización los osteoblastos pueden ser incluidos en el osteoide y quedar atrapados, y reciben el nombre de osteocitos, los cuales se nutren y comunican por medio de sus prolongaciones citoplásmicas.

## 4.2 PLACA DENTOBACTERIANA Y ENFERMEDAD PERIODONTAL.

La placa dental es el acúmulo de depósitos bacterianos en la cavidad bucal. Se clasifica de acuerdo a su localización en supragingival y subgingival.<sup>4,5</sup>

### PLACA SUPRAGINGIVAL.

Se detecta a simple vista cuando alcanza cierto grosor, es amarilla o blanquecina y tiene mayor grosor a lo largo del tercio gingival del diente y áreas interproximales.<sup>2</sup>

Su formación inicia con la aposición al esmalte de la película adquirida, la cual es una cubierta heterogénea que se establece por la adsorción selectiva de proteínas y glucoproteínas salivales a la hidroxiapatita (FASE 1). A los pocos minutos de haberse establecido la película adquirida inicia la colonización bacteriana, el primer colonizador es *Streptococcus sanguis*, posteriormente se instala *Actinomyces viscosus*, estos se asocian con las glucoproteínas de la película. La mayor parte de las bacterias provienen de la microflora salival que baña el diente y algunas otras son transportadas por células descamadas que las llevan adheridas (FASE 2). Posteriormente se inician los fenómenos de agregación bacteriana y se incorporan nuevas bacterias, además de que continúa la multiplicación de las ya presentes (FASE 3), en esta etapa la placa es fina, fácilmente desprendible, el metabolismo bacteriano es principalmente aerobio y está formada principalmente por cocos.

La colonización continúa hasta llegar a la placa madura (FASE 4) en donde se han agregado bacterias anaerobias y anaerobias facultativas por el metabolismo bacteriano y la producción de  $H_2O_2$ , las especies predominantes son los cocos Gram-positivos anaerobios facultativos entre ellos *S.sanguis* y *S.mitis* y algunas especies de *Actinomyces*. Las superficies receptoras de los cocos y bacilos Gram positivos permiten la posterior adherencia de organismos gram negativos. La acumulación de la placa a lo largo del margen gingival origina una reacción inflamatoria de los tejidos gingivales<sup>1,4,5</sup>. La placa madura se forma en

un lapso de tiempo variable, pero puede alcanzarse a las 2 o 3 semanas. Al envejecer la placa las capas más profundas se ven privadas de oxígeno y de nutrientes, los productos de desecho se acumulan y hay una reducción gradual en la cantidad de microorganismos vivos, de tal forma que los estudios microscópicos revelan la presencia de espacios vacíos por autólisis de algunas bacterias. (Fig 6).

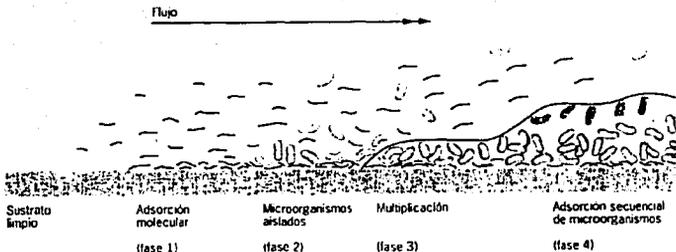


Fig 6. Etapas en la formación de biopelícula sobre una superficie limpia, dura y no descamante. Fase 1: Adsorción molecular para favorecer la formación de la biopelícula. Fase 2 Adhesión bacteriana, Fase 3: Desarrollo de la matriz extracelular y multiplicación bacteriana. Fase 4: Adsorción secuencial de más bacterias para formar biopelícula más compleja y madura. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring.

**PLACA SUBGINGIVAL.**

Es delgada, contenida dentro del surco gingival o bolsa periodontal por lo que resulta difícil su estudio *in situ*. En las porciones más próximas al esmalte va a estar influenciada directamente por la placa supragingival, por lo que su composición es muy similar a ésta, con cocos Gram positivos anaerobios facultativos. La placa no adherida al diente puede estar adherida al epitelio o estar flotante. Las bacterias de la placa flotante comprenden: bacilos Gram negativos anaerobios facultativos como: *Actinobacillus actinomycetem-comitans*, especies de *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia buccalis* y *Seletonas*. La placa adherida al epitelio esta provista por bacterias que tienen la capacidad de adhesión por medio de fimbrias, como *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella melaninogenica*, *Capnocytophaga*, *Seletonas* y *Fusobacterium*.<sup>4,5</sup>

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## **ENFERMEDAD PERIODONTAL.**

Los padecimientos más frecuentes de los tejidos periodontales son los procesos inflamatorios gingivales y del aparato de inserción dental; son infecciones microbianas relacionadas con la acumulación local de placa dental, cálculos y flora periodontal patógena subgingival <sup>2</sup>.

El huésped responde ante el ataque de las bacterias periodontopatógenas por medio de un proceso inflamatorio e inmune, su objetivo es evitar la extensión de los microorganismos y la invasión a otros tejidos. Sin embargo en ocasiones estas reacciones pueden ser perjudiciales para el huésped mismo, ya que la inflamación daña a las células circundantes y al tejido conectivo.

Una encía clínicamente sana tiene una capacidad de respuesta contra los microorganismos como se describe a continuación:

- Producción de anticuerpos contra los microorganismos.
- Función fagocitaria de los neutrófilos y macrófagos.
- Producción de elementos del complemento.
- Descamación celular
- Mantenimiento de una barrera epitelial.
- Un flujo líquido positivo de la hendidura gingival, que puede eliminar los microorganismos y productos nocivos.

Todos estos factores pueden actuar en conjunto para reducir la carga bacteriana y así prevenir una respuesta excesiva de los sistemas de defensa de los tejidos que podría conducir a la formación de una lesión. La relación huésped-microorganismo que constituye una encía libre de infiltrado inflamatorio es modificada en la gingivitis y periodontitis.

Las fases clásicas de la inflamación aguda y crónica no son fáciles de aplicar a la enfermedad periodontal, por lo que se utiliza el sistema de Page y Schroeder para definir la histopatogenia de la enfermedad periodontal. <sup>1</sup>

## **LESIÓN GINGIVAL INICIAL**

Se inicia con una lesión gingival inicial, que como se mencionó con anterioridad comienza con la dilatación de arteriolas, capilares y vénulas, lo que lleva a un aumento de la presión hidrostática dentro de la microcirculación y se forman brechas intercelulares entre células endoteliales capilares adyacentes, con lo que se produce una exudación de líquido y las proteínas que invaden los tejidos y se produce una penetración de células inflamatorias (linfocitos, macrófagos y neutrófilos) en el tejido conectivo subyacente al epitelio de unión.

Simultáneamente a las alteraciones vasculares, se produce la migración de leucocitos desde los capilares, ésta salida es reforzada por moléculas de adhesión como ICAM-1 y (molécula de adhesión intercelular -1) y la molécula-1 de adhesión leucocitaria endotelial (ELAM-1) y otras adhesinas. Estas moléculas ayudan a los leucocitos a unirse a las vénulas postcapilares y ayudan a las células a dejar el vaso sanguíneo.

Los leucocitos migran por quimiotaxis de factores microbianos y del huésped. Entre los factores quimiotácticos que atraen los leucocitos se encuentran el péptido metionil leucil fenilalanina (FMLP) y citocinas como la IL-8, moléculas producidas por los neutrófilos como la leucotrina B4 y sistema de complemento C5a. Los linfocitos pueden ser retenidos en los tejidos en contacto con el antígeno, citocinas o moléculas de adhesión.

## **LESIÓN GINGIVAL TEMPRANA.**

Se caracteriza por la presencia de vasos dilatados, los linfocitos y neutrófilos constituyen un infiltrado leucocitario predominante en esta etapa y se observan pocos plasmocitos, el infiltrado constituye hasta un 15% del tejido conectivo debajo del epitelio de unión. Los fibroblastos degeneran probablemente por un proceso de apoptosis y para que exista un mayor espacio para el infiltrado inflamatorio. Se produce aumento de las células basales del epitelio de unión y sulcular, lo cual probablemente ocurre por un intento del cuerpo por reforzar la barrera innata la placa. También se presenta destrucción de colágena, la cual se debe principalmente a la inducción de proteasas del huésped.<sup>1</sup>

### **LESIÓN GINGIVAL ESTABLECIDA.**

En esta hay un incremento de exudado líquido y migración de leucocitos hacia los tejidos y la hendidura gingival. Su característica principal es que está dominada por plasmocitos, encargados de la defensa humoral, que se caracterizan por la producción de anticuerpos contra un agente patógeno, su función se relaciona con la capacidad de opsonizar bacterias para prevenir la colonización microbiana.

Continúa con la pérdida de colágeno y la proliferación de las células epiteliales, el epitelio de la bolsa no está adherido a la superficie dentaria y tiene una fuerte infiltración leucocitaria con predominio de neutrófilos, en comparación con el epitelio de unión original, el epitelio de la bolsa es más permeable al paso de sustancias hacia dentro y hacia fuera de los tejidos conectivos subyacentes.

### **LESIÓN GINGIVAL AVANZADA**

El infiltrado inflamatorio se extiende lateral y apicalmente, la lesión avanzada tiene las características de una lesión establecida excepto porque existe una pérdida de hueso alveolar y un importante daño de las fibras, el epitelio de unión migra apicalmente desde el límite cementoalveolar.

### **CLASIFICACIÓN**

Se han utilizado diferentes clasificaciones de las enfermedades periodontales, en fechas recientes un comité de expertos clínicos e investigadores científicos convocados por la Academia Americana de Periodontología desarrollaron un sistema de clasificación para ordenar las diversas entidades clínicas de la enfermedad periodontal.

La clasificación que actualmente es en base a su etiología y la capacidad de respuesta del huésped <sup>48,47</sup>:

I.- Enfermedades gingivales.

A.- Enfermedad por placa dental.

1 Gingivitis asociada únicamente a placa

2 Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos.

- a. Asociadas al sistema endócrino
  - b. Asociadas a discrasias sanguíneas
    - 1) Gingivitis en la leucemia
  - 3.- Enfermedades gingivales influenciadas por medicación
    - a. Influencia por drogas
      - 1) Agrandamientos gingivales inducidos por drogas
      - 2) Gingivitis influenciada por drogas
    - b. Influenciada por anticonceptivos
    - c. Otros.
  - 4.- Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición
    - a. Gingivitis por deficiencia de ácido ascórbico
    - b. Otros.
- B.- Enfermedades gingivales no asociadas a la placa
- 1 Lesiones originadas por bacterias específicas
    - a. *Neisseria gonorrea*
    - b. *Treponema pallidum*
    - c. *Estreptococal sp.*
    - d. Otras variedades.
  - 2 Enfermedad gingival de origen viral
    - a. Infecciones por herpes
    - b. Otras
  - 3 Enfermedad gingival de origen fúngico
    - a. Infecciones por *Candida sp.*
    - b. Eritema gingival lineal
    - c. Histoplasmosis
    - d. Otras
  - 4 Lesiones gingivales de origen genético
    - a. Fibromatosis gingival hereditaria
    - b. Otras
  - 5 Manifestaciones gingivales de ciertas condiciones sistémicas
    - a. Desórdenes mucocutáneos

- 1) Liqueen plano
  - 2) Penfigoide
  - 3) Pénfigo vulgar
  - 4) Eritema multiforme
  - 5) Lupus eritematoso
  - b. Reacciones alérgicas
    - 1) Materiales dentales
    - 2) Otros.
- 6 Lesiones traumáticas
- 7 Reacciones a cuerpo extraño
- 8 No especificadas

## II. Periodontitis.

### 1.- Crónica

- A. Localizada
- B. Generalizada

### 2.- Periodontitis agresiva

- A. Localizada
- B. Generalizada

### 3.- Periodontitis con manifestaciones de enfermedades sistémicas.

- A. Asociada con desórdenes hematológicos
  1. Neutropenia adquirida
  2. Leucemias
  3. Otras.
- B. Asociada con desórdenes genéticos
- C. No especificadas (NES)

### 4.- Enfermedades periodontales necrotisantes.

- A. Gingivitis ulcerativa necrosantes (GUN)
- B. Periodontitis ulcerativa necrosante (PUN)

### 5.- Abscesos en el periodonto.

- A. Absceso gingival
  - B. Absceso periodontal
  - C. Absceso pericoronar
- 6.- Periodontitis asociadas con lesiones endodónticas
- 7.- Deformidades y condiciones del desarrollo y adquiridas
- A. Factores localizados al diente que modifican o predisponen la acumulación de placa e inducen enfermedad gingival y periodontitis.
  - B. Deformidades mucogingivales y condiciones alrededor del diente.
  - C. Deformidades mucogingivales y condiciones de procesos edéntulos.
  - D. Trauma oclusal.

La gingivitis es un proceso inflamatorio de la encía, en el cual el epitelio de unión se localiza en su nivel original, es decir en o cerca de la unión cemento-esmalte. Esta inflamación se presenta con cambios de color, forma de la encía, posición, aspecto de la superficie y la presencia de hemorragia o exudado leve.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica, destructiva, supurativa e inflamatoria de los tejidos de soporte del diente, se define como la migración del epitelio de unión hacia apical de la unión cemento-esmalte. Clínicamente puede observarse inflamación de la encía dependiendo de las bolsas periodontales, migración apical del epitelio de unión y exposición del cemento radicular al medio ambiente oral, además el diente presenta movilidad, debido a la pérdida del ligamento parodontal. La velocidad de la progresión de esta enfermedad varía considerablemente. Otra característica importante es que el epitelio de la bolsa está ulcerado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 4.3 BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

La historia de la microbiología bucal es paralela a la de la microbiología y la enfermedad infecciosa en general, y comienza en 1683 con el descubrimiento de la primera bacteria encontrada en la placa dental por Leeuwenhoek.

Por otro lado en 1890 Miller obtuvo fama por su teoría acidogénica de la caries dental y también propuso que la piorrea alveolar no la causaba una bacteria específica, sino que participaban diversas bacterias; como un proceso supurativo en el cual se implican varias bacterias. Esta es una de las primeras declaraciones de lo que ahora es la hipótesis de placa no específica.

A principios del siglo XX, algunos investigadores como Bass, Smith, Barret consideraron que estaban implicadas en la enfermedad periodontal algunos tipos de amibas, de hecho Bass le llamó *Endoameba buccalis*; otros autores mencionaron espiroquetas, estreptococos, *Staphylococos*, y al *Bacterioides melaninogenicum* como causantes de la enfermedad. Constituyendo la hipótesis de placa específica.

En la mitad de los años ochenta, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Wolinella recta* y otros microorganismos son asociados a la enfermedad periodontal, la lista de los patógenos posibles asociados a la enfermedad continúa creciendo, gracias a los avances de las técnicas de cultivo y de observación. <sup>1,4,5,22,23</sup>

En conclusión ahora podemos hablar de que las enfermedades periodontales son causadas por bacterias presentes en la placa dental bacteriana, hecho demostrado experimentalmente de diferentes formas: en pacientes con mala higiene dental; o por medio de la terapéutica que incluye una eliminación mecánica de los acúmulos de placa dentobacteriana; o por último debido a estudios *in vivo* e *in vitro* en los cuales microorganismos que en el ser humano causan enfermedad periodontal y al ser inoculados en animales también provocan dicha enfermedad: Con estos tres aspectos decimos que la enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa. Aunque para poder determinar si es debida a un microorganismo en particular o a varios es sumamente difícil, debido a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

la dificultad de aislar los microorganismos sin que estos se contaminen con otros del medio además de que no cumplen con los postulados de Koch, por lo que Socransky modificó estos postulados para poder determinar que bacterias debían ser consideradas como causales de la enfermedad, estos son:

- 1.- Los patógenos están presentes en la proximidad de las lesiones periodontales y en grandes cantidades.
- 2.- Los pacientes infectados desarrollan altas concentraciones de anticuerpos en el suero, saliva y líquido gingival.
- 3.- La eliminación de estos microorganismos disminuye la gravedad de la enfermedad.
- 4.- Los microorganismos deben poseer factores de virulencia relevantes en la iniciación y progreso de la enfermedad.
- 5.- La implantación experimental del microorganismo en el surco gingival de un animal permite el desarrollo de alguna de las características de la enfermedad.

La enfermedad periodontal esta asociada con una microflora compleja en la cual más de 350 especies pueden ser encontradas, esto entre bacterias y algunos hongos como *Candida*.

Una variedad de microorganismos predominantemente Gram negativos, anaerobios y móviles participan en la etiología de la enfermedad.

Entre las especies más mencionadas encontramos: *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Camphylobacter rectus*, *Eubacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus intermedius* y especies de *Treponema*. Ya que su estructura bacteriana, sus componentes extracelulares y sus metabolitos pueden provocar diversos efectos sobre los tejidos del huésped.

4,5,21,23,34,42,43

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **ESTRUCTURA BACTERIANA.**

Las bacterias son células unicelulares procariotas, su información genética está contenida en una gran molécula circular de ADN bicatenario, el material genético no se encuentra delimitado en un núcleo por una membrana nuclear. El citoplasma celular contiene muchos ribosomas pero carece de otros organelos por lo cual muchas de sus funciones metabólicas las realiza en la membrana celular. En todas las bacterias, excepto en los micoplasmas, la célula está rodeada por una pared celular compleja, que ha sido considerada para la clasificación de las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Por fuera de la pared celular las bacterias pueden poseer cápsulas, flagelos y pilis que desempeñan papeles importantes en la relación huésped-parásito<sup>37,40</sup>.

### **Pared Celular.**

La pared celular difiere en las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Fig 7), sin embargo tienen un componente común llamado péptidoglucano (mucopéptido o mureína), es un polímero mixto de azúcares hexosa (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) y aminoácidos.

En las bacterias Gram positivas, la pared forma una gruesa capa externa de la membrana celular y puede contener otras macromoléculas.

En las bacterias Gram negativas, la capa de peptidoglucano es delgada y está cubierta por una membrana externa, las principales moléculas presentes en ésta membrana externa son lipopolisacáridos y lipoproteínas. El lipopolisacárido de la membrana le confiere a estas especies propiedades tóxicas y antigénicas.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

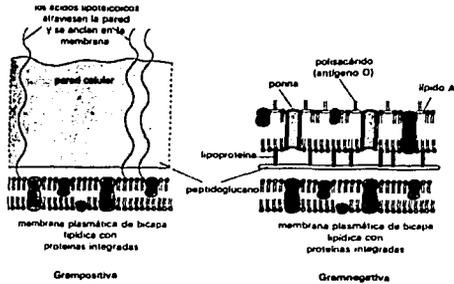


Fig 7. Esquema de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Mims A.Cedric, Playfair John. Microbiología Médica.

### Cápsula.

Esta estructura está rodeando a la pared celular, está presente solo en algunas especies, está formada por polisacáridos de alto peso molecular. Esta superficie proporciona protección contra la fagocitosis por células del huésped.

### Flagelos.

Son filamentos helicoidales largos que se extienden desde la superficie celular para generar fuerzas de propulsión y permitir que la bacteria se mueva en su medio, pueden estar limitados a los polos de la célula y ser únicos (polares) o formar penachos (lopotricos), o bien aparecer distribuidos sobre la superficie general de la célula (peritricos). Los flagelos están constituidos por componentes proteínicos (flagelinas) fuertemente antigénicos.

### Pili.

Son otra forma de proyecciones superficiales bacterianas, están formados por proteínas conocidas como adhesinas. Su función consiste en promover la adherencia a otras bacterias o a las células del huésped. La existencia de muchos pili sobre la superficie bacteriana evita la fagocitosis por parte de la defensa del huésped.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los principales microorganismos asociados a distintas enfermedades periodontales se presenta en la tabla 1.

Tabla I. Microorganismos asociados a enfermedades periodontales <sup>A</sup>

Microorganismo	Gingivitis asociada a PDB.	Perio. crónica	Perio. juvenil local y gral.	Perio. Sistémicas. VIH.	Enf.
<i>A.actinomycetemcomilans</i>	-	++	+++	+	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	+++	-	+	
<i>Prevotella intermedia</i>	++	++	+	++	
<i>Bacteroides forsythus</i>	-	+++	+	?	
<i>Fusobacterium (spp)</i>	+++	++	-	+	
<i>Peptostreptococcus micros</i>	-	+++	-	++	
<i>Woiilenella recta</i>	+	++	+	+++	
<i>Treponema denticola</i>	++	++	-	++	
<i>Actinomyces (spp)</i>	+++	-	-	-	
<i>Capnocytophaga (spp)</i>	-	++	+	-	
<i>Eikenella corrodens</i>	-	+	+	?	
<i>Streptococcus (spp)</i>	+++	-	-	-	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.4 LIPOPOLISACÁRIDOS.

Son moléculas que están presentes en la pared celular de las bacterias Gram-negativas, también recibe el nombre de endotoxina y se define generalmente como un complejo proteínico estable al calor.

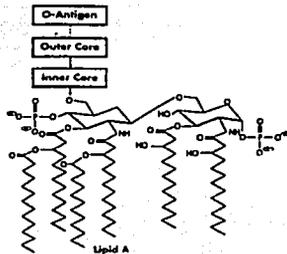
Los LPS constan de las siguientes partes (Fig 8):

a) Una porción superficial polisacárida que es antigénica y específica de especie y se denomina antígeno específico O, antígeno O ó antígeno somático; es el principal antígeno de las bacterias Gram-negativas.

b) La capa intermedia está formada por oligosacáridos y ácido ketodesoxioctónico denominado "core" o KDO.

c) La parte interna es lipídica y se llama lípido A; es muy tóxica y constituye la endotoxina responsable inicial del cuadro de shock séptico. Está constituido por disacáridos de D-glucosamina, fósforo y diversos ácidos grasos (laúrico, palmítico, mirístico y  $\beta$ -hidroximirístico).

Se ha demostrado que el LPS tiene una alta afinidad por las proteínas de membrana en los mamíferos y es capaz de desencadenar una gran cantidad de señales intracelulares una vez ligado a su receptor. <sup>4,5,34,42,43,44,45,49,50.</sup>



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig 8. Esquema de la estructura general de una molécula de Lipopolisacárido, presentando su parte polisacárida o antígeno O, su capa intermedia o KDO y la parte interna lipídica llamada lípido A. Guha Mausumee, Mackman Nigel. LPS induction of gene expression in human monocytes.

### **Actividad Biológica del LPS en los Tejidos Gingivales.**

La estimulación biológica de monocitos y otras células por el LPS estimula la producción de citocinas, algunas de estas citocinas están involucradas en la respuesta inflamatoria e inmune del huésped. Se ha demostrado recientemente altos niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6, en tejidos gingivales de sitios con lesiones periodontales activas.<sup>42,43</sup>

De igual forma aunque se sabe que tanto la composición bacteriana como factores derivados del huésped están involucrados en la estimulación de la pérdida de hueso en la periodontitis. El LPS es uno de los componentes bacterianos que más induce la resorción ósea en cultivos *in vitro*, especialmente el LPS de *P.gingivalis*.<sup>23,34,42,43,50,51</sup>, fracciones de LPS de *P.gingivalis* inhiben la síntesis de colágena y aumentan la actividad de los osteoclastos provocando la resorción ósea, además las citocinas inducidas por ésta molécula provocan la activación de factor de transcripción NF $\kappa$ -B que induce la expresión de genes que codifican KGF-1 e ICAM, moléculas que participan en la proliferación y migración de células epiteliales, que es uno de los primeros pasos de la periodontitis.<sup>32</sup>

### **Interacción de los Fibroblastos con El LPS**

Se ha observado que el LPS de *P.gingivalis*, *P.intermedia* y *E.coli* causan una inhibición tipo dosis-respuesta del crecimiento celular de los fibroblastos *in vitro*, a altas dosis el LPS inhibe el crecimiento celular y a bajas dosis promueve la proliferación.<sup>34,41,42,43</sup>

Los fibroblastos *in vitro* producen varias citocinas en respuesta a estimulantes exógenos y endógenos, en el caso del LPS de *P.gingivalis* induce la liberación de citocinas inflamatorias, las más importantes son IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ . Así los fibroblastos gingivales como células productoras de citocinas pueden contribuir a la respuesta inmune e inflamatoria de los tejidos periodontales.<sup>32,34,50,51</sup>

### **Receptores de los LPS.**

Dada la importancia de esta macromolécula para desencadenar un gran número de respuestas inflamatorias y septicemia se han realizado diversos estudios sobre

el mecanismo por el cual estas moléculas activan mecanismos de transducción en diferentes líneas celulares, en estudios realizados sobre monocitos y macrófagos se ha demostrado que el LPS induce la expresión de genes y citocinas al formar un complejo de asociación con receptores presentes en la membrana celular. Este complejo inicia con la asociación del LPS a una proteína conocida como LBP que es la proteína de unión al LPS. LBP se encuentra presente en el plasma sanguíneo a una concentración de 3 a 10 µg/ml, esta concentración puede aumentar al aumentar la cantidad del LPS.

#### CD14

Una vez formado el complejo LBP-LPS éste se transmite a la proteína conocida como CD14, esta es una proteína que presenta dos formas una membranar CD14m y una soluble CD14s (Fig 9), se sintetiza a partir de la vía inositol glicerolfosfato (GPI), en el caso de la CD14m se ancla a la membrana; en la forma soluble, se libera de la célula y se une a células que no poseen CD14m como las células endoteliales para que reconozcan el complejo LBP-LPS y produzcan citocinas.

En diversos estudios han demostrado que los fibroblastos gingivales humanos presentan la proteína CD14 anclada a la membrana (CD14m) en la superficie de la célula, el peso molecular de CD14m es de 55kDa, es una proteína de tipo glucosil-fosfatidilinositol que carece de dominio citoplásmico y transmembranar por lo cual es necesaria la participación de otra proteína a la cual se asocia para desencadenar señales de transducción. <sup>7,8,32,32,36,37,39,43.</sup>

Sin embargo otros autores argumentan que la forma de CD14 que expresan los fibroblastos gingivales humanos es CD14s <sup>38.</sup>

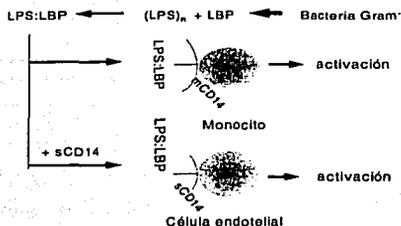


Fig 9. Esquema de la interacción de CD14m y CD14s con el complejo LBP:LPS

### RECEPTORES TLR.

Las proteínas con las cuales se asocia el LPS, son de la familia TLR (toll like receptor), principalmente TLR4 y TLR2, aunque esta última no ha manifestado mucha afinidad con el LPS. <sup>35,43.</sup>

Las proteínas TLR son proteínas transmembranales que poseen un dominio extracelular rico en leucina y un dominio intracelular llamado Toll como por ejemplo MyD88 (Fig 10). El descubrimiento de los receptores de la familia TLR se llevó a cabo gracias a los estudios realizados sobre la mosca *Drosophila*, en la cual el receptor Toll reconoce al patógeno y se induce una respuesta inmune innata por la activación de factores de transcripción como Rel, Dif y Relish los cuales son homólogos a NFκ-B. Debido a la semejanza estructural y funcional de los receptores encontrados en las células de los mamíferos con los receptores Toll de la mosca se les llamó receptores parecidos a Toll. En mamíferos como el roedor la respuesta inmune innata puede inducirse por la asociación del LPS a uno de estos receptores TLR y desencadenar la expresión de genes y la producción de citocinas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

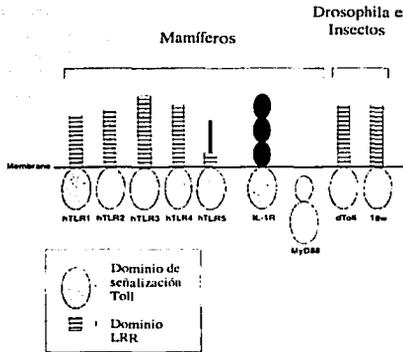


Fig 10. Esquema de la estructura de los receptores TLR, que presentan un dominio extracelular rico en leucina (LRR) y un dominio intracelular llamado Toll.  
A. Guha Mausumee, Mackman Nigel. LPS induction of gene expresión in human monocytes.

Actualmente se han identificado 10 receptores TLR (Tabla 2) cada es un receptor específico para diversos estímulos externos que lleguen a las células. El papel de TLR1,2,4 y 6 ya se conoce, TLR2 fue el primer receptor TLR identificado en humanos y posteriormente se identificó TLR4. En estudios realizados con LPS purificado de bacterias gram negativas se observó que éste actuaba sobre TLR2 y TLR4, sin embargo actualmente se sabe que TLR2 tiene poca afinidad por el LPS y que esto pudo ocurrir por la presencia de lipoproteínas en el LPS aislado, concluyendo que TLR2 reconoce las lipoproteínas de las bacterias Gram positivas y TLR4 el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas.

TLR3 está implicado en la respuesta a RNA viral, TLR5 a flagelina, TLR9 a DNA de bacterias.

Otros estudios han aportado que la formación del complejo no solo presenta CD14 y TLR sino también una proteína accesoria conocida como MD2, esta es una proteína transmembranal soluble que hace más eficaz la respuesta de TLR4 al LPS. Para que se lleve a cabo el proceso de señalización a través de TLR4

también es necesaria la participación de la molécula tipo Toll MyD88 y el receptor quinasa asociado a la interleucina 1 (IRAK). De hecho la señalización del LPS ocurre de forma muy similar a la señalización hecha por la IL-1. La señalización de la IL-1 es iniciada por la formación de un complejo IL-1, receptor de IL-1 y la proteína accesoria asociada al receptor de IL-1. (IL-1R-AcP). El adaptador citoplásmico es MyD88 que se une al complejo por interacciones Toll/Toll, seguido por el reclutamiento de IRAK al complejo.

Después IRAK se disocia de el receptor e interactúa con el receptor asociado al factor 6 del factor de necrosis tumoral (TRAF6), lo cual resulta en la activación de factor nuclear NF- $\kappa$ B, o la activación de JNK o p38, quienes están envueltos en la activación de numerosos genes inflamatorios.<sup>35,43,69.</sup>

Otras superficies moleculares involucradas como receptores del LPS son las integrinas CD11b/CD18 sin embargo faltan más estudios para saber su forma de participación en el complejo de unión.<sup>36</sup>

Tabla II. Miembros de la familia TLR conocidos.<sup>69</sup>

TLRs	Ligando principal	Patógenos
TLR1	Cofactor de TLR2	Gram <sup>+</sup> , Gram <sup>-</sup> , mycobacterias, espiroquetas, micoplasma
TLR2	lipoproteínas, glucopéptidos, péptidoglucano.	Gram <sup>+</sup> , Gram <sup>-</sup> , mycobacteria, espiroquetas
TLR3	Hebra doble de RNA	Virus
TLR4	LPS	Gram-
TLR5	Flagelinas	Flagelos de Gram <sup>+</sup> y Gram <sup>-</sup>
TLR6	Cofactor de TLR2	Gram <sup>+</sup> , Gram <sup>-</sup> , mycobacterias, espiroquetas, mycoplasma
TLR7	Imidazoquinoline	Componentes antivirales sintéticos
TLR8	desconocido	-
TLR9	DNA modificado CpG	todas las bacterias
TLR10	Desconocido	-

Otras características de estos receptores TLR es que comparte dominios con los receptores de la familia de IL-1, conocidos como receptores toll-interleucina 1 que han sido involucrados en la respuesta alérgica.

Hasta este momento el complejo de señalización de LBP-LPS incluye la participación de CD14, TLR4-MD2, la porción Toll de TLR4 MyD88 o sus homólogos como MAL/TIRAP y el receptor quinasa asociado a IL-1 conocido como IRAK. A partir de este complejo se activa hasta la última regulación de transcripción de genes pro-inflamatorias, así como NF- $\kappa$ B, la fosforilación de quinazas como las MAPK, JNK y p38, aunque aún no se comprenden en su totalidad muchas vías en cuanto a su participación en la síntesis de mediadores de procesos inflamatorios o su participación en eventos como la muerte celular programada (Fig 11).<sup>9,17,18,24,25,33.</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

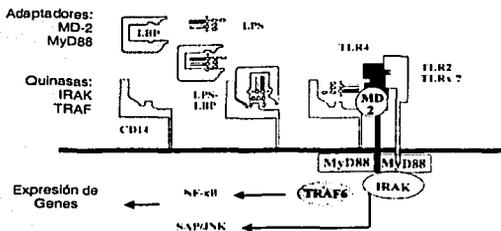


Fig 11. Esquema de la señalización del complejo LBP:LPS con su receptor TLR, la proteína MD2, el dominio Toll MyD88 e IRAK para la expresión de genes vía MAP quinasas JNK o SAP y el factor NF-κB. Didier Heumann, Roger Thierry. *Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria.*

## SEÑALES CELULARES Y VIAS DE TRANSDUCCIÓN.

La membrana plasmática separa a la célula del medio que la rodea. Sólo es permeable a pequeñas moléculas solubles en lípidos, como las hormonas esteroideas, que pueden difundir a través de ella para adentrarse en el citoplasma. Es impermeable a los materiales solubles en agua, incluyendo los iones, pequeñas moléculas inorgánicas, y polipéptidos o proteínas. La respuesta al material hidrofílico depende de la interacción sobre la cara extracelular de la célula con un componente proteínico de la membrana plasmática. La molécula extracelular es llamada generalmente el ligando y la proteína de la membrana plasmática que la une se le llama receptor. <sup>10,11,12, 13,14, 20.</sup>

Así podemos definir un receptor como una estructura química capaz de recibir al mensajero y de transmitir el mensaje para que se produzca la respuesta de la célula. El receptor es una proteína grande de peso molecular elevado, y sus funciones principales son reconocer al mensajero y activar la secuencia de eventos que conducen a la respuesta celular. La información para su síntesis está almacenada en el material genético de cada célula; su superficie presenta un sitio de reconocimiento al que se une el mensajero. Las superficies del mensajero y del receptor se unen con un alto grado de selectividad entre sí, así como de afinidad.

La afinidad puede definirse como una medida de la facilidad de interacción entre dos sustancias. Por su localización los receptores se pueden dividir en dos grandes familias; los que se localizan en la membrana plasmática y los intracelulares.<sup>12-14</sup>

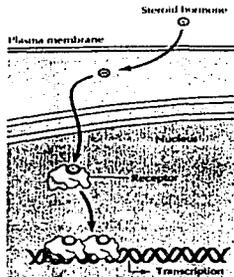
La transmisión de una señal implica la interacción de un ligando extracelular con una proteína transmembranal que tiene dominio a ambos lados de la membrana. La unión del ligando convierte al receptor de su forma inactiva a la activa. El principio básico de esta interacción es que la unión del ligando en la cara extracelular influye en la actividad del dominio del receptor que se encuentra en la cara citoplásmica. Este proceso recibe el nombre de transducción de la señal.<sup>10,11</sup>

La transducción de la señal proporciona un medio de amplificación de la señal original. El principio de la transducción de señales es que la forma activa de un receptor dispara una actividad catalítica en el citoplasma. La amplitud de la señal producida es mucho mayor que la señal extracelular original. Una molécula citosólica en respuesta a la transducción de una señal extracelular se denomina segundo mensajero.

### **VIAS DE TRANSDUCCIÓN.**

Una vez que se produce la asociación entre el ligando con su receptor membranal este estimula a la enzima blanco que se encuentra en el espacio intracelular. Estas enzimas intracelulares sirven como señales que propagan y amplifican la señal inicial y la unen a su ligando. Así las vías de transducción conectan la superficie celular al núcleo provocando cambios en la expresión genética en respuesta al estímulo (Fig 12).

Se conocen diferentes vías de transducción en donde intervienen distintos segundos mensajeros como pueden ser la fosforilación de proteínas a través de AMPc o GMP, o la de fosfolípidos y calcio, en este caso nos interesara conocer la vía de las MAP quinasa de donde se desprende p38.<sup>10,11,12,20.</sup>



*Fig 12. Ejemplificación de las señales de transducción. La hormona esteroidea se difunde a través de la membrana plasmática y se une a un receptor nuclear, el cual estimula directamente la transcripción de sus genes blanco.*  
*The cell a molecular approach. Geoffrey M. Cooper*

#### 4.5 VIA MAP QUINASA.

La vía de las MAP quinasas refiere una cascada de proteínas que se han conservado a lo largo de la cadena evolutiva y juegan un papel central en la transducción de señales en todas las células eucarióticas. El elemento central de la ruta es una familia de proteínas quinasas treonina-serina llamada MAP quinasa (mitogen-activated protein kinases) que son activadas en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares. En levaduras, esta vía controla una gran variedad de factores de crecimiento y otras respuestas celulares, como su reproducción, forma y esporulación. En los mamíferos regula el crecimiento celular y la diferenciación, motivo por el cual se les denominó proteínas quinasas activadas mitogenamente.<sup>57</sup>

Existen en las células eucariontes de los mamíferos varias rutas de las MAP quinasas, cada cascada consiste de tres proteínas quinasas: una quinasa terminal y dos quinasas intermedias que regulan distintas respuestas celulares. Entre las familias de proteínas de las cuáles se desprenden estas cascada se encuentran ERK, JNk y p38, que son las que se han estudiado más ampliamente en mamíferos.<sup>57,58,59,60</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla III. Familia MAP quinasa.<sup>10</sup>

Estimulo	Factores de crecimiento	Citocinas/ Stress celular
Quinasa antecesoras	RAF	MEKks
	MEK	MKks
MAP quinasa	ERK	JNK/p38
Respuesta celular	Proliferación, diferenciación y supervivencia celular	Muerte celular e inflamación

ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (quinasa regulada por señal extracelular) es activada en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares. En las levaduras ERK lleva la reproducción, forma celular y esporulación. JNK y p38, a diferencia de ERK, son activadas en respuesta a citocinas inflamatorias y estímulos celulares como la radiación ultravioleta.  
10,11,12,20,48

Mientras que las señales de ERK conllevan principalmente a la proliferación, supervivencia y diferenciación celular; las señales de JNK y p38 provocan inflamación y muerte celular. Esto lo hacen mediante su translocación al núcleo y la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión genética.<sup>17,59</sup> ERK es una de las MAP quinasa mejor caracterizada en las células de los mamíferos, su activación de ERK se lleva a cabo mediante la unión del ligando a receptores acoplados a proteínas tirosina-quinasa o a receptores acoplados a proteínas G.

La activación de ERK es mediada por dos proteínas quinasas intermedias, las cuales se acoplan con factores de crecimiento por un lado y por otro con un GTP, estas proteínas son RAS y RAF, las cuales fosforilan y activan una segunda proteína quinasa llamada MEK. MEK es una proteína con especificidad dual, esto es activa miembros de la familia ERK por fosforilación de dos residuos de: treonina y tirosina. Una vez activada ERK fosforila una variedad de blancos como pueden ser otras proteínas quinasa y factores de transcripción.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las tres MAPK son activadas por una quinasa intermedia MAPKK, que tiene especificidad dual, fosforila residuos treonina y tirosina en un sitio tirosina-X-treonina específico para cada MAPK (Fig 13),<sup>55,56,57,58,63</sup>

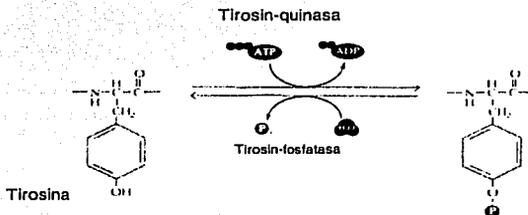


Fig 13. Fosforilación de residuos de Tirosina por la proteína tirosina-quinasa y defosforilación del residuo por la proteína tirosina fosfatasa.  
*The cell a molecular approach. Geoffrey M. Cooper.*

Los tripéptidos de las MAP quinases son: de ERK, Thr-Glu-Tyr, de p38 Thr-Gly-Tyr, y de JNK Thr-Pro-Tyr. La fosforilación de estos residuos tirosina-treonina es llevada a cabo por las proteínas quinasas activadoras de MAPKK (MAPKKKS) como son Rafs, MEKK1, quinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), MLKs, TAK, etc. <sup>15-18,24,25,28,48,56.</sup>

### p38

p38 es el tercer miembro de la familia MAPK, también se le conoce como SAPK2/RK o quinasa reactiva o quinasa activada por estrés. Fue originalmente identificada por la estimulación de macrófagos de ratón con LPS. Es una proteína de peso molecular de 38 kDa <sup>74</sup> que se encuentra presente en el citoplasma celular de células involucradas en la respuesta inflamatoria como monocitos y macrófagos, en células involucradas en la respuesta inmune como células T, CD4 y CD8 y neutrófilos. También ha sido caracterizada en fibroblastos, en células del sistema nervioso como astrocitos y microglia, en células epiteliales, en plaquetas y en células del músculo vascular. <sup>15,18,27,29, 33,35,36,37,48,58,63,64,65.</sup>

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Se han descrito cuatro isoformas de p38 : $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , sin embargo la forma  $\alpha$  es la que más se ha estudiado en diversas líneas celulares y la más caracterizada. Algunos autores mencionan que las cuatro isoformas son idénticas en un 57-73% de sus secuencias de aminoácidos pero difieren en sus factores de expresión, y en su sensibilidad a inhibidores conocidos contra estas enzimas, así SB203580 y SB202190 son específicos para p38 $\alpha$  y p38 $\beta$ .<sup>57,58,60</sup>

Como se comentó anteriormente los estudios realizados sobre p38 muestran que es estimulada por citocinas inflamatorias como IL-1, TNF, LPS, trombina y colágena, y estrés celular como un shock osmótico o un shock por calor, radiación UV y agentes químicos.<sup>15, 18,19,25, 33,48,57,58,59.</sup>

Estos estimuladores inducen la fosforilación de p38 en su dominio constituido por el tripéptido: treonina, glicina y tirosina.<sup>61</sup>

Para su activación se han encontrado en el complejo de señalización moléculas como Cdc42, PAK y Rac1.<sup>29,33,52,53.</sup>

Cdc42 es una proteína de unión de GTP de tipo RAS, miembro de la familia Rho, que tiene una alta afinidad por dominios de proteínas quinasas tipo serina/treonina.

La activación a través del complejo de señalización de los receptores al asociarse con el LPS, fosforila las MAPKKK de p38, entre las cuales se han identificado: PKR o proteína quinasa regulada por RNA, MLK3/SPRK, ASK1 (quinasa activadora de la señal de apoptosis -1)<sup>17</sup> y TAK1, estas MAPKKK activa la MAPKK de p38 que involucra dos quinasas específicas MKK3 y MKK6<sup>17,56</sup>. Un knock out del gen de MKK3 causa un defecto en la activación de p38 y en la activación del gen para TNF $\alpha$ . También existen algunas evidencias de que MKK4 puede fosforilar a p38 (Fig 14)<sup>56,57,60,62,63</sup>

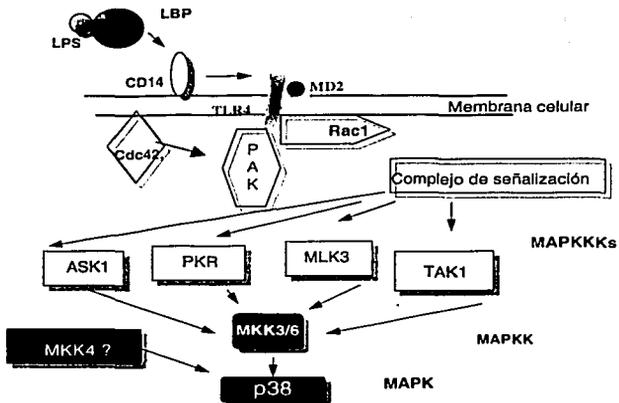


Fig 14. Esquema de la vía de señalización de p38 por el LPS y el receptor TLR4

La importancia de p38 radica en su capacidad para la expresión de genes de muchas citocinas y su rol en la respuesta inmune (Fig 15).<sup>58,59,61,62,63</sup>



Fig 15. Sitio de fosforilación de p38. Observamos la fosforilación de un sustrato por p38 en presencia de Zn.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

p38 fosforilada activa varios factores de transcripción que incluyen ATF-2, ELK1, CHOP, MEF2C, AP-1, IF4E (Factor de iniciación eucariótica) y Sap1a, estos factores están involucrados en numerosas funciones celulares como la activación, proliferación y transformación celular; así como en la transcripción y translación de mediadores proinflamatorios. También se ha involucrado la participación de p38 en la inducción del factor de transcripción NFκB, se cree que p38 no actúa directamente sobre el factor de transcripción o sobre las proteínas quinasas IKβ, sino que actúa en un segundo nivel de activación que involucra un complejo basal en el cual participan p65/p50 que interactúa con el coactivador CBP que se encuentra en el complejo basal. La inhibición de p38 ha demostrado que reduce la unión de la proteína TBP que une la porción de p65/p50 al complejo basal. Aún no se comprenden bien los mecanismos por los cuales esta quinasa activa estos factores de transcripción, se sabe que tiene un papel importante porque al ser inhibida puede disminuir la inducción de estos genes, algunos estudios refieren que p38 actúa en la fosforilación de otras quinasas que se encuentran debajo de ella y que a su vez activan estos factores de transcripción, por otro lado también se ha referido que las MAPK son capaces de translocarse al núcleo.<sup>33,58,59,60,61</sup>

Entre las quinasas que se han caracterizado y que son inducidas por p38 por estar debajo de esta vía se mencionan MNK1/2, MAPKAPK2 (MK2), MSK1 y PRAK las cuales regulan la expresión de genes por la fosforilación de otros factores de transcripción como CREB y ATF-1 (Fig 16).

Otros estudios realizados con anterioridad involucran la presencia de la proteína p38 en diversos eventos fisiológicos como la producción de la enzima NOS2 de óxido nítrico, aumento de la producción de ácido araquidónico por la enzima fosfolipasa C (cPLA2), y apoptosis.<sup>15,16,17,18,24,25,28</sup>

p38 regula la expresión del factor de transcripción de IL-1β (C/EBPβ y C/EBPδ) y TNFα en monocitos y macrófagos, estos resultados se obtuvieron en diversos estudios, en algunos de ellos se utilizó uno de los inhibidores específicos de p38, SB203580, que pertenece a un grupo del compuesto pirlvinilimidazol. El efecto de este inhibidor es atribuido a la unión en el dominio quinasa para ATP. La

conclusión de la participación de p38 se obtuvo ya que al preincubar este inhibidor previamente al tratamiento con LPS se inhibía la activación de p38 y se redujo la inducción de IL-1 y TNF $\alpha$ .<sup>54,55</sup>

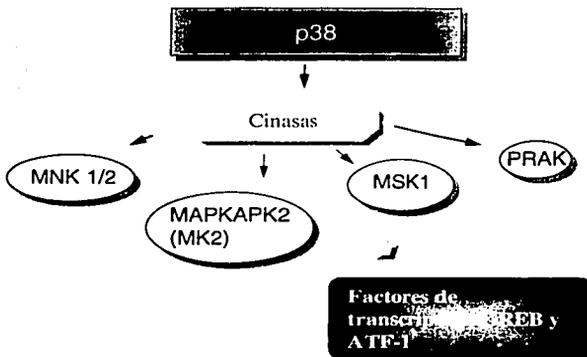


Fig 16. Quinasas activadas por p38 y los factores de transcripción que se desprenden de ellas.

### Participación de p38 en la respuesta inmune innata.

La respuesta inmune está envuelta en un gran número de tipo celulares que funcionan como iniciadores, reguladores y efectores de medios de defensa del huésped contra patógenos invasores. Éstas células interactúan entre sí y tienen una regulación cruzada, las células blanco responden usando vías de señales de transducción que regulan la expresión de genes y funciones inmunes.

Los mayores conocimientos que se tienen sobre la respuesta inmune innata en mamíferos ha sido gracias a los avances realizados en estudios hechos sobre la mosca de la fruta *Drosophila*, en la cual se identificó un grupo de 8 proteínas de la familia Toll, la cual es el centro de la defensa innata, que envuelve el reconocimiento de bacterias y hongos, y la inducción de péptidos antimicrobianos. Está bien establecido que la vía NF- $\kappa$ B es un importante blanco de los receptores

Toll en la respuesta inmune innata de *Drosophila*. Las MAP quinasa como JNK y p38 son activadas por patógenos en las células del insecto. p38 en la mosca parece atenuar la expresión génica de péptidos antimicrobianos seguida a la exposición del LPS.

En mamíferos se ha observado que una vez inducida p38 por el LPS media la producción de IL-1, IL-12, el factor de necrosis tumoral  $TNF\alpha$  en la respuesta inmune innata.

Su participación en la producción de  $TNF\alpha$  lo hace vía (MAPKAP) MK2 y MK3, a través de elementos ricos en AU (ARE) en la región de transcripción 3'. La supresión en el genoma de esta región en ratones provoca un  $TNF\alpha$  anormal que conlleva la expresión de genes y desarrollo de dos tipos de autoinmunidad: artritis y enfermedad inflamatoria del intestino.

Para examinar el rol funcional de p38 en la respuesta inmune, Luc. y col. analizaron la deficiencia de la quinasa de p38 MKK3 en ratones. La disrupción de MKK3 causó en aproximadamente un 40 a 70% la reducción total de la actividad de p38 en macrófagos tratados con LPS. La actividad residual pudo ser atribuida por MKK6 o probablemente por MKK4. El mismo resultado se observó por el uso de inhibidores específicos de p38 como SB203580, SB202190 y SB202474.

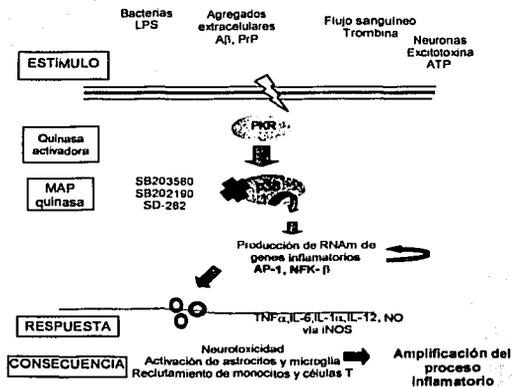


Fig 17. Participación de p38 en el proceso inflamatorio en mamíferos.

Por otro lado p38 también se ha visto involucrada en la activación y diferenciación de células T (Fig 18). Las células CD4 cooperadoras juegan un papel central en la respuesta del sistema inmune, como las células CD8 citotóxicas, las células CD4 se desarrollan en el timo, y tienen especificidad para reconocer complejos péptidos MHC presentes sobre células que presentan el antígeno llamadas (APC). Una vez reconocido este antígeno se desencadena una señal en el receptor de las células T, en donde también interviene un coestimulador llamado CD28, esto lleva a la producción de interleucina 2 por parte de la célula T y al mismo tiempo a que la célula entre en el ciclo celular, es decir la célula se divide rápidamente durante varios días y las células T se diferencien en células efectoras.

Durante este proceso de diferenciación, se expresa un nuevo patrón de expresión de citocinas que conlleva la producción de genes responsables de las funciones efectoras específicas de estas células, y también a su papel en la protección del huésped de una gran variedad de patógenos.

Se han identificado dos clases de células T efectoras CD4 en base a las citocinas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

que secretan y sus efectos inmunomediadores conferidos por estas citocinas. Las células efectoras Th 1 producen citocinas proinflamatorias como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y linfotóxina- $\alpha$  (Lt- $\alpha$ ), las cuales organizan centros inflamatorios y desencadenan la respuesta celular inmune contra ciertos patógenos como *Mycobacterias*, *Salmonella* y otros agentes a través de la activación de defensas antimicrobianas. Las células efectoras Th2 producen diferentes citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 y otras) que estimulan a las células B para diferenciarse y secretar anticuerpos. También interactúan con diferentes tipos celulares para la respuesta antiparasitaria. Por lo que Th2 juega un papel importante en la protección contra ciertos patógenos bacterianos y parásitos.

Ricon y col. por primera vez describen la ruta de p38 como activadores de células Th1 en ratones. Estudios recientes también sugieren el rol de p38 en la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-2 y IL-18 para la activación de células T. Estos resultados se han obtenido usando inhibidores del grupo imidazol que bloquean p38, lo cual a su vez bloquea la producción de IFN- $\gamma$  y por las células Th1.

P38 y JNK están frecuentemente coordinadas en la regulación de muchos procesos fisiológicos. En las células Th1, tanto p38 como JNK están activadas de forma selectiva, aún no se comprende bien el mecanismo de selección, sin embargo se ha encontrado que es necesaria la participación de una proteína Rac2 para la activación de estas quinasas, se cree que esta proteína juega un importante papel en la selección para p38 y JNK, mientras que para activar JNK es necesaria la expresión de GADD45 que activa JNK mediante la activación de MEKK4 por lo cual se considera que si MKK4 es una de las rutas que activa p38 puede ser también activada por esta proteína GADD45.

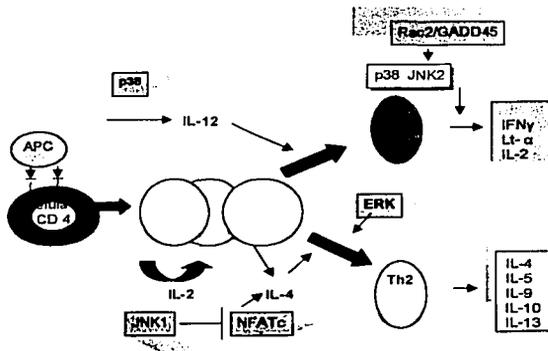


Fig 18. Participación de p38 en la diferenciación de células T.

Se piensa que p38 está involucrada en el mismo mecanismo de producción de IFN- $\gamma$  y en células citotóxicas CD8, sin embargo faltan más estudios para corroborar esta hipótesis. También se ha involucrado la participación p38 como reguladora de la activación de la muerte celular programada en células CD8.<sup>33</sup>

### Participación de p38 en la producción de Óxido nítrico a través de NOS2.

El óxido nítrico es un gas reactivo con radicales libres, es una de las mayores moléculas de señales parácrinas en el sistema nervioso, inmune y en el sistema circulatorio. El óxido nítrico es capaz de difundirse directamente a través de la membrana plasmática a su blanco en las células, es sintetizado a partir del aminoácido arginina y oxígeno molecular por la enzima óxido nítrico sintetasa ya sea inducida o constitutiva. En los macrófagos la enzima NOS es expresada solo por inducción transcripcional, entre los factores que producen grandes cantidades de óxido nítrico se tienen algunas citocinas y el LPS que generan la forma inducida de la enzima conocida como iNOS o enzima óxido nítrico sintetasa-2 (NOS2).<sup>9,24,65,67</sup>

Una vez sintetizado el óxido nítrico difunde fuera de la célula y puede actuar localmente afectando células cercanas. Su acción es local debido a su

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inestabilidad con una vida media de pocos segundos. Una de sus acciones bien caracterizadas es su acción como señalizador de la vasodilatación.

También se cree que el óxido nítrico tiene funciones bactericidas, tumoricidas y probablemente sea un regulador de la respuesta inmune. Una vez inducida la enzima iNOS sintetiza altos niveles de óxido nítrico a tiempos prolongados y se incrementa la concentración de este metabolito, el cual se piensa que contribuye con el desarrollo de arteroesclerosis, daño del DNA e hipotensión asociado con el shock séptico. Por esto es de suma importancia la regulación de la producción de la enzima iNOS.

Estudios realizados con anterioridad muestran que p38 juega un papel importante en la inducción de iNOS. El LPS activa p38 y una vez activada es capaz de modular la respuesta funcional a través de la fosforilación de factores de transcripción y la activación de otras quinasas. Uno de los factores de transcripción más estudiados que juega un rol primario en la regulación de iNOS es el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B.<sup>9,24</sup>

## Participación de p38 en la inducción de la enzima Ciclooxygenasa-2.

Las prostaglandinas son reguladores críticos de la respuesta inmune, la fiebre y el dolor, también actúan como moduladores autócrinos y parácrinos de la respuesta celular que juega un papel importante en la mitogénesis y apoptosis.

Las prostaglandinas se forman a partir del metabolismo del ácido araquidónico, por medio de dos enzimas la ciclooxigenasa-1 y la ciclooxigenasa-2.

El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono que procede de la dieta o de la conversión del ácido linoléico. Se encuentra esterificado en los fosfolípidos de la membrana celular y su liberación se lleva a cabo por la activación de las fosfolipasas celulares por estímulos mecánicos, químicos y físicos o por otros mediadores, como por ejemplo C5a.

Como se menciona anteriormente las ciclooxigenasas catalizan la conversión de ácido araquidónico y O<sub>2</sub> a prostaglandinas, especialmente PGH<sub>2</sub>.

La ciclooxigenasa-1 (COX-1) es una enzima constitutiva cuya expresión es regulada. COX-1 cataliza la síntesis de prostaglandinas en el retículo endoplásmico, es la única ciclooxigenasa presente en las plaquetas y también se ha asociado con la producción de tromboxano A<sub>2</sub>. En contraste la enzima COX-2 recientemente descubierta de peso molecular de 82KDa<sup>75</sup>, es una enzima inducida que normalmente no se encuentra presente en las células, de hecho solo algunas líneas celulares expresan COX-2; pero su inducción es rápida y transitoria, entre los estímulos que la inducen se encuentran factores de crecimiento y citocinas. Entre los productos finales a los cuales se asocia COX-2 están PGE<sub>2</sub> y las prostacilinas.

En estudios anteriores hechos en macrófagos alveolares se demostró la inducción de la enzima COX-2 por LPS, en este proceso se encontró involucrada la MAP quinasa p38.<sup>71</sup>

La activación de p38 ha sido relacionada con la expresión de diversos genes que codifican para citocinas inflamatorias y de igual forma a sido relacionada con la estabilidad de mRNA de COX-2, por otro lado también se menciona que p38 induce directamente la expresión de mRNA de COX2 a través de MAPKAP2, sin

embargo también se menciona que la participación de p38 solo no es suficiente para inducir el gen de COX-2, es necesaria la participación negativa de la enzima PI3K que se encuentra en la membrana celular, una vez inhibida esta enzima se produce un aumento en la inducción de p38 (Fig 19).<sup>71,72</sup>

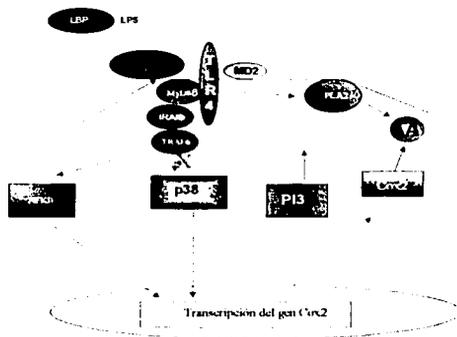


Fig 19. Regulación de la expresión de COX-2 por p38

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad periodontal es una de las principales patologías que aquejan a la población en México, y su etiología ha sido ampliamente relacionada con la presencia de distintas bacterias, especialmente de tipo Gram-negativas que poseen en su pared celular la molécula llamada LPS <sup>21,22</sup>, los estudios realizados con anterioridad muestran que esta endotoxina estimula los mecanismos de defensa del huésped, específicamente en lo que concierne a la respuesta inflamatoria del huésped. <sup>41-45</sup>

En el presente trabajo se observó que estos estímulos inducen la fosforilación de la MAP-quinasa p-38, una importante vía de transducción presente en diversas líneas celulares encargada de la fosforilación de algunos factores de transcripción que inducen la expresión de la enzima NOS-2 elevando la producción de óxido nítrico; por otro lado p38 se ha relacionado con la inducción de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), de igual modo p38 también se relaciona con la liberación de citocinas, y así mismo ha sido involucrada con la apoptosis.

## 6. JUSTIFICACIÓN

Al caracterizar la fosforilación de p38 por LPS, hemos identificado una de las vías en que llega la información a la célula para la formación de citocinas, producción de prostaglandinas, elevación en la producción de óxido nítrico y la muerte celular programada, lo cual puede contribuir a la observación de los signos clínicos de las enfermedades periodontales, gingivitis y periodontitis atribuidas a bacterias Gram negativas. Este estudio nos permitirá en un futuro lograr el establecimiento de un marcador temprano de la enfermedad periodontal y de nuevos fármacos que logren inhibir la acción de estos estímulos mediante el bloqueo de la vía de esta MAP-quinasa p-38.

## **7. HIPÓTESIS**

### **7.1 Hipótesis Verdadera:**

Si el lipopolisacárido al asociarse a su receptor activa la proteína p38, entonces provocará en esta la fosforilación y las consecuencias fisiológicas que conlleva.

### **7.2 Hipótesis Falsa:**

Si el lipopolisacárido al asociarse a su receptor no activa la proteína p38, entonces no provocará en esta la fosforilación ni las consecuencias fisiológicas que conlleva.

### **7.3 Hipótesis Verdadera:**

Si p38 está involucrado en la inducción de la enzima NOS2 al ser fosforilado por el LPS, entonces su inhibidor específico SB203580 bloqueará la inducción de NOS2 en fibroblastos gingivales humanos.

### **7.4 Hipótesis falsa:**

Si p38 no está involucrado en la inducción de la enzima NOS2 al ser fosforilado por el LPS, entonces su inhibidor específico SB203580 no bloqueará la inducción de NOS2 en Fibroblastos gingivales humanos.

### **7.5 Hipótesis Verdadera:**

Si p38 está involucrado en la inducción de la enzima COX-2 al ser fosforilado por el LPS, entonces su inhibidor específico SB203580 bloqueará la inducción de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos.

### **7.6 Hipótesis falsa:**

Si p38 no está involucrado en la inducción de la enzima COX-2 al ser fosforilado por el LPS, entonces su inhibidor específico SB203580 no bloqueará la inducción de COX-2 en Fibroblastos gingivales humanos.

## **8. OBJETIVOS**

### **Objetivo General.**

El propósito de este trabajo es observar la fosforilación de p-38 por LPS en fibroblastos gingivales humanos, en distintas dosis y a diferentes tiempos.

### **Objetivo Específico.**

Caracterizar la participación de la proteína p-38 en la regulación de eventos fisiológicos.

## **9. TIPO DE ESTUDIO.**

Experimental, comparativo y prospectivo.

## **10. MATERIALES Y METODOS**

### **MATERIALES**

#### **10.1 Equipo (Marca)**

Agitador magnético. (Nuova)

Balanza GA200. (Ohaus)

Baño de agitación. ( Precision Scientific)

Baño de temperatura controlada (Fisher)

Cajas de cultivo celular de 6 pozos. (Costar)

Cámara de electroforesis horizontal (GIBCO-Life Technologies)

Cámara de electroforesis vertical. (Hoeffer)

Cámara de transferencia. (Hoeffer)

Campana de flujo laminar (Nuair)

Celdas de cuarzo

Centrífuga (Sorvall)

Digi-Doc

Espectrofotómetro (Perkin Elmer)

Gendarme (Costar)  
Gradillas (Nalgene)  
Incubadora (Nuair)  
Megatoscopio  
Microcentrífuga (Sorvall)  
Microscopio de objetivos invertidos C22 (Olympus)  
Orbit Shaker (Labline)  
Pipetas de 10ml y 5 ml (Finnipipette)  
Potenciómetro (Equipar)  
Portaobjetos  
Probetas graduadas  
Propipeta (Pepet-aid)  
Sonicador (Lab-Line instruments)  
Termociclador (Perkin-Elmer)  
Timer  
Tubos clínicos  
Tubos de ensayo  
Tubos Eppendorf  
Vasos de precipitado  
Vortex (Scientific industries)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 10.2 Reactivos.

Acrilamida (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)

Agarosa (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)

Antibiótico-Antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomcina, anfotericina B (INVITROGEN Life Technologies.Ca. USA.).

Anticuerpos mouse monoclonal pp-38(sc-7973), rabbit polyclonal p38 (sc-7149) (Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)

Anticuerpo rabbit polyclonal NOS2. (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz Ca. USA)

Anticuerpo gota polyclonal COX-2. (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca. USA)

Azul de bromofenol (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI.USA)

Bromuro de etidio (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)

Cloruro de sodio (DIFCO)

Desoxicolato de sodio (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)

Duodecil sulfato de sodio (J.T. BAKER.NJ. USA)

Etanol 75% (J.T. BAKER.NJ. USA)

EDTA (J.T. BAKER.NJ. USA)

Fenol saturado (J.T. BAKER.NJ. USA)

Fosfato de sodio (J.T. BAKER.NJ. USA)

Fluoruro de sodio (J.T. BAKER.NJ. USA)

Fluoroforo anti-rabbit (fluoresceína), anti-mouse (rodamina) (Santa cruz Biotechnology.Ca.USA)

Glicina (J.T. BAKER.NJ. USA)

Glicerol (J.T. BAKER.NJ. USA)

Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology.Ca.USA)

Lipopolisacárido de *Salmonella enteritidis* (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA))

Luteolina (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI.USA)

Marcador de bases nitrogenadas (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)

Marcador de peso molecular (Santa cruz Biotechnology.Ca.USA. sc-2361)

Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)

Medio de cultivo de Hanks (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)

Membrana de nitrocelulosa (Bio-rad Laboratorios, Inc. Ca. USA.)

Nonident P-40 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI.USA)

Oligos de COX-2 sense, anti-sense (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)

Ortovanadato de sodio (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)

**Paraformaldeido (DIFCO Laboratories. Mi. USA)**  
**Persulfato de amonio (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI.USA)**  
**Reactivos para RT-PCR (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)**  
**Resina sintética (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI.USA)**  
**PI<sup>32</sup> (Amersham pharmacia biotech. Ca. USA)**  
**Proteína A sepharosa (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI.USA)**  
**SB203580 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI.USA)**  
**Suero bovino fetal (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)**  
**Tiocinato de Guanidina (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)**  
**Trisma (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)**  
**Tripsina (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)**  
**Triton 100X (J.T. BAKER.NJ. USA)**  
**Tween (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI.USA)**

### 10.3 Métodos.

#### **10.3.1 Cultivo de fibroblastos gingivales humanos (FGH):**

Los FGH se obtienen a partir de muestras de tejido de encía de pacientes clínicamente sanos, que acudieron a las clínicas de la Facultad de Odontología. El tejido de colocó en medio de Hanks (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.), posteriormente se obtienen las células y se colocan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.) adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.) y 1% de antibiótico antimicótico (INVITROGEN Life Technologies.LA. USA.) y se colocan en la incubadora a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C

#### **10.3.2 Detección de la fosforilación de la fosfoproteína p38 por medio de ensayos de Western Blot.**

Para caracterizar la fosforilación de p38 por el LPS en FGH se realizaron experimentos tipo dosis respuesta y curso temporal. Se sembraron los fibroblastos gingivales humanos en cajas de 6 pozos hasta la semiconfluencia.

Se dejaron 24 horas en DMEM libre de suero bovino fetal con 1% de antibiótico-antimicótico (INVITROGEN Life Technologies.LA. USA.). Posteriormente se trataron con LPS (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA) en DMEM adicionado con 2% de SBF a tiempos desde 5 minutos hasta 60 minutos; y dosis desde 0.1µg/ml hasta 50µg/ml, según se indica en cada pie de figura de los resultados.

Al término de la incubación, se obtuvieron las células mediante una raspado con gendarme y se colocaron en buffer de fosfatos salino (NaCl; KCl; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.) adicionado con 1mM de ortovanadato de sodio (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA), las células se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm a 4°C y se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl 20mM, Triton 1%, NaCl 137mM, EDTA 2mM, Vanadato de sodio 1mM, Glicina 10% ). Posteriormente se sonicaron 30w por 30 segundos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry<sup>30</sup>. Se tomaron 25µg/ml de la muestra para su hidrólisis por medio de jugo azul desnaturizante para fosfoproteínas y su tratamiento térmico. Se realizó la electroforesis en gel de archilamida (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA) al 10% a 100V. La proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-rad Laboratorios, Inc. Ca. USA.) para la incubación del anticuerpo específico de la fosfoproteína p38 (Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA). Se reveló mediante el Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology.Ca.USA).

Los experimentos se realizaron en cinco ocasiones por separado y se analizaron con el software Labworks. Los resultados se representaron como la media ± Error Standard y se interpretaron los resultados mediante la obtención de la T de Student. Se presenta un experimento representativo de cada caso y su interpretación gráfica en base a la densidad óptica del por ciento del basal de la fosforilación de la fosfoproteína p38, también presentamos el control de cada experimento con la proteína p38 en las mismas condiciones.

### ***10.3.3 Inhibición de La Enzima NOS2 Vía p-38 por la acción del Inhibidor SB203580 En Fibroblastos Gingivales Humanos tratados con LPS, mediante ensayo de Western Blot.***

Para mostrar la participación de p38 como una de las vías capaces de inducir la expresión de NOS2 en FGH por acción del LPS, y mostrar el efecto del inhibidor SB203580 específico para p38, se realizaron experimentos tipo dosis-respuesta del inhibidor SB203580 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA).

Se cultivaron las células en cajas de 6 pozos hasta la semiconfluencia, se ayunaron durante 24 horas con DMEM sin SBF adicionado con 1% de antibiótico antimicótico. Se preincubaron las células con el inhibidor SB203580 por 2 horas, a dosis desde 0.5µM hasta 50µM, posteriormente se incubó el LPS (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA) por 24 horas para mostrar la inducción de la enzima NOS2. Se agregó buffer de fosfato salino con ortovanadato de sodio y se rasparon las células con gendarme. Se centrifugaron las muestras por 10 minutos

a 10,000rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 20µl de buffer de lisis, se sonicó la muestra 10 segundos a 30A y se realizó la cuantificación de proteínas mediante el método de Lowry. Se tomaron 25µg de proteína para realizar la electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa (Bio-rad Laboratorios, Inc. Ca. USA.) a 100V. Para realizar el ensayo de Western Blot, se incubó el primer anticuerpo anti-NOS2 (Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)

a una concentración de 1:3000 y un segundo anti-rabbit (1:5000), para ser revelado mediante el Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology. Ca. USA). Los experimentos se realizaron en cinco ocasiones por separado y se analizaron con el software Labworks. Los resultados se representaron como la media ± Error Standard y se interpretaron los resultados mediante la obtención de la T de Student. Se presenta un experimento representativo de cada caso y su interpretación gráfica en base a la densidad óptica del por ciento del basal de la inducción de NOS2.

#### ***10.3.4 Inhibición de La Enzima COX-2 Vía p-38 por la acción del Inhibidor SB203580 En Fibroblastos Gingivales Humanos tratados con LPS, mediante ensayo de Western Blot.***

Se realizaron experimentos de tipo curso temporal para caracterizar la inducción de la enzima COX-2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS. Se cultivaron las células en cajas de 6 pozos hasta la semiconfluencia, se ayunaron durante 24 horas con DMEM (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.) sin SBF adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.). Se trataron las células con 10 µg/ml de LPS a diferentes tiempos, según se indica en cada pie de figura en los resultados. Al término de la incubación se obtuvieron las células mediante raspado con gendarme y se colocaron en buffer de fosfato salino. Las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en buffer de lisis. Posteriormente se sonicaron a 30W por 30 segundos. Se realizó la cuantificación de proteínas mediante el método de

Bradford <sup>31</sup>, se tomaron 25µg/ml de cada muestra y se realizó la electroforesis. Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa para la incubación del anticuerpo específico anti-COX-2 (3:5000) y anti-goat (1:5000). Se reveló mediante el Kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California Ca, USA). Se presenta un experimento representativo de cinco repeticiones por separado, las muestras se analizaron con el sistema de cómputo Digi doc y las gráficas se expresan como la media ± error estándar. Posteriormente se hizo un análisis estadístico tipo t-de Student y se obtuvo la diferencia de cada variable con respecto al control.

Una vez caracterizada la inducción de COX-2 mediante los resultados obtenidos del curso temporal, se realizaron ensayos de western blot para mostrar la participación de p38 como una de las vías de transducción capaces de inducir la enzima COX-2 en FGH. Una vez obtenido el cultivo celular hasta la semiconfluencia y posterior al ayuno de 24 horas en DMEM sin SBF adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico; se preincubó el inhibidor SB203580 (5µM) (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA) por 2 horas, posteriormente se incubó el LPS por 4 horas. Al término de la incubación se obtuvieron las células por raspado con gendarme y se colocaron en buffer de fosfato salino. Las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en buffer de lisis. Posteriormente se sonicaron las muestras a 30W por 30 segundos. Se realizó la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford <sup>31</sup>, se tomaron 25µg/ml de cada muestra y se realizó la electroforesis. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-rad Laboratorios, Inc. Ca. USA.) para la incubación del anticuerpo específico anti-COX-2 (3:5000) y anti-goat (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA). Se reveló mediante el Kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA). Se presenta un experimento representativo.

### **10.3.5 Inhibición de La Enzima COX-2 Vía p-38 por la acción del Inhibidor SB203580 En Fibroblastos Gingivales Humanos tratados con LPS, mediante extracción de mRNA y reacción de RT-PCR.**

Otro procedimiento utilizado para observar la inhibición de COX-2 por el inhibidor SB203580 en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS fue por medio de la extracción de mRNA y la reacción de RT-PCR.

Se cultivaron las células hasta la semiconfluencia, posteriormente se ayunaron durante 24 horas en DMEM sin SBF adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico, al término se incubaron en DMEM al 2% de SBF adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico y se estimularon las células con el lipopolisacárido y en otras condiciones las células se preincubaron con el inhibidor SB203580 (5µM) por 2 horas y posteriormente se trataron el lipopolisacárido (10 µg/ml) por 4 horas. Al término del tratamiento se realizó la extracción de mRNA según el método de Chomczynski y Sacchi <sup>77</sup>, la muestra se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato 1%, las muestras se cuantificaron a 260 y 280, se obtuvo la relación 260/280. Para corroborar la integridad del mRNA, las muestras se separaron en gel de azarosa 1% en presencia de formaldehído y se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización en luz UV en gel de azarosa.

Se preparó la reacción de RT-PCR de acuerdo a la especificación del kit one-step (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.), los primers para COX-2 fueron sense: 5'- TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3', antisense: 5'- AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3', que permiten obtener un producto de 309 pb. Como control se utilizó GADPH (gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa) para el cual se usaron los primers sense 5' TCC CTC AAG ATT GTC AGC AAA-3', antisense 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA ATT-3' que producen un fragmento de 506 pb del cDNA. La desnaturalización se realizó a 94°C por 1 minuto, el primer alineamiento a 55°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 1.5 minutos ( 35 ciclos) usando 1µg del mRNA total.

Los productos obtenidos se separaron en un gel de agarosa (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA) al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio para su

visualización en luz U.V. Se presenta un experimento representativo de cinco repeticiones por separado, las muestras se analizaron con el sistema de cómputo Digi doc y las gráficas se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Posteriormente se hizo un análisis estadístico tipo t-de Student y se obtuvo la diferencia de cada variable con respecto al control.

#### **10.3.6 Detección de la fosforilación *in vivo* de p38 mediante e inmunoprecipitación.**

Otro medio utilizado para mostrar la fosforilación de p38 fue por medio fosforilación *in vivo* mediante ensayos de inmunoprecipitación.

Para la fosforilación *in vivo*, se colocaron los fibroblastos gingivales humanos en cajas de 6 pozos hasta la semiconfluencia. Posteriormente se dejaron en DMEM libre de SBF por 24 horas y en DMEM libre de fosfatos por 1 hora. Las células se marcaron con  $625\mu\text{Ci}$  de [ $^{32}\text{P}$ ] (Amersham pharmacía biotech. Ca. USA) durante 3 hrs. Se trataron las células con LPS en DMEM al 2% de SBF, a diferentes tiempos desde 5 minutos hasta 60 minutos. Se rasparon las células con gendarme y se lavaron  $500\mu\text{l}$  de Buffer de fosfato salino +  $1\text{mM}$  de ortovanadato de sodio. Se centrifugaron las muestras a  $10,000\text{rpm}$  por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en RIPA (1%Norident P-40, 1% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS,  $0.15\text{M}$  NaCl,  $0.01\text{M}$  Fosfato de sodio,  $2\text{mM}$  EDTA,  $50\text{mM}$  fluoruro de sodio,  $0.2\text{mM}$  Ortovanadato de sodio). Se sonicaron las muestras 10 segundos a 30 A. Se centrifugaron las muestras 10 minutos a  $12,000\text{rpm}$ , se recuperó el sobrenadante y se incubó la pastilla en agitación toda la noche con  $5\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-p38 y  $50\mu\text{l}$  de proteína A sepharosa (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi .USA) a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente se centrifugaron las muestras a  $12,000\text{rpm}$  por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla en tres ocasiones con buffer de lavado ( $1\text{M}$  tris-HCl pH7.4,  $0.5\text{M}$  NaCl; 1% nonidet P-40). Se adicionó a la pastilla jugo azul desnaturalizante y se hirvieron 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$ . Se realizó la electroforesis en geles de acrilamida (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA) al 10%, se secaron los geles mediante técnica de vacío y se dejaron en exposición durante 24 horas.

### **10.3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL DE pp-38 y p38 MEDIANTE ENSAYO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.**

Para observar la inducción de p38 y pp38 en FGH por el tratamiento con LPS se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para observar las muestras en el microscopio confocal Nikon.

Se cultivaron las células en cajas de 48 pozos en donde previamente se colocó una lenteja de vidrio previamente cortada estéril. Las células fueron cultivadas en DMEM adicionado con 10% de SBF y 1% de antibiótico-antimicótico, hasta la semiconfluencia. Se ayunaron durante 30 minutos en DMEM libre de SBF. Se realizó el tratamiento de las células por 15 minutos con 10µg/ml de LPS en DMEM adicionado con 2% de SBF y 1% de antibiótico-antimicótico. Se retiró el medio y se colocaron 100µl de paraformaldehído al 2% por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer de fosfato salino estéril y se colocaron 50µl de triton 100X al 0.1% por 5 minutos a 4°C. Se realizaron 3 lavados con buffer de fosfato salino y se colocaron 5µl del anticuerpo anti-p38 y anti-pp38, y se dejaron en incubación durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Se hicieron 2 lavados con buffer de fosfato salino y se colocó el segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína (5µl) para p38 y rodamina para p-p38 (5 µl), el cual se dejó en incubación durante 30 minutos a 4°C. Se hicieron cinco lavados con buffer de fosfato salino y se retiró la lenteja con el cultivo celular. Se colocó una gota de resina en un portaobjetos y se colocó la lenteja. Se cubrieron las muestras con papel aluminio y fueron mantenidas a una temperatura de 4°C. Se observaron las muestras en el microscopio confocal con el objetivo 10X y se obtuvieron los resultados mediante el software cas40.

## 11. ANALISIS DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los experimentos se realizaron por 5 ocasiones por separado. Se realizaron ensayos de Western blot, fosforilación in vivo por  $\text{Pi}^{32}$  e inmunoprecipitación, aislamiento de mRNA y reacción de RT-PCR; y ensayos de inmunohistoquímica para ser observadas las muestras al microscopio confocal.

Los resultados obtenidos se analizaron por medio del software Labworks del cual se obtuvo la densidad óptica. Se obtuvo el promedio de los cinco experimentos y se compararon con el control de cada caso, el cual se tomó como el 100% del basal, sobre estos datos se obtuvo el análisis gráfico. Se muestra en los resultados un experimento representativo y el análisis gráfico del total de los 5 casos.

Posteriormente se hizo un análisis estadístico tipo t-de Student y se obtuvo la diferencia de cada variable con respecto al control.

## 12.RESULTADOS.

### 12.1 CURSO TEMPORAL DE LA FOSFORILACIÓN DE p-38 POR LA ACCION DE LIPOPOLISACÁRIDOS EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Para caracterizar la fosforilación de p-38 se realizaron experimentos de tipo curso-temporal con una dosis de LPS de 10 µg/ml (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA), utilizando tiempos desde 5 minutos hasta 60 minutos. Observándose la fosforilación de p-38 con un peso molecular de 38 kDa, desde los 5 minutos de tratamiento (Fig 1 A), la mayor inducción se produce a los 15 minutos de tratamiento, y comienza a descender la fosforilación a los 30 minutos (Fig 1 B). La fosforilación se detectó por medio de ensayos de Western Blot con el anticuerpo anti-pp-38 policlonal (3:5000) y anti-mouse (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA). Las membranas se desnudaron y se incubaron con el anticuerpo anti p-38 como control, con la finalidad de demostrar que los cambios observados se debían a la fosforilación y no a una diferencia en la concentración de proteínas.

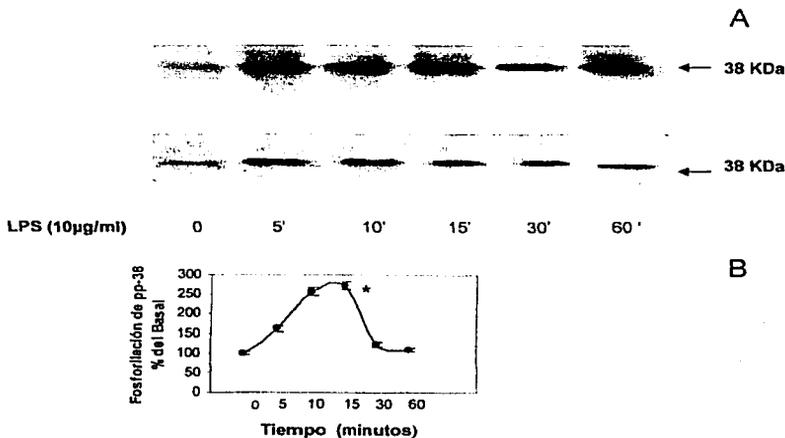


Figura 1. Curso Temporal de la fosforilación de pp38 y p38 en en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS.

A. Las células se trataron con 10 µg/ml de LPS a diferentes tiempos al término de la reacción las muestras se procesaron para su análisis mediante Western Blot.

B. Análisis gráfico del curso temporal del tratamiento de lipopolisacárido en fibroblastos gingivales humanos sobre la fosforilación de pp38. El control 0 se tomó como el 100% del basal en base a su densidad óptica obtenida con el software de Labworks. Los experimentos se realizaron al menos cinco ocasiones se analizó la media ± E.S \*p<0.05

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 12.2. DOSIS RESPUESTA DE LA INDUCCIÓN DE pp-38 EN FGH ESTIMULADOS CON LPS.

Para caracterizar la fosforilación de p-38 a diferentes dosis con un tiempo de 5 minutos de tratamiento. Se utilizaron dosis desde 0.1µg/ml hasta 50µg/ml, observándose la fosforilación de p38 desde una dosis de 0.1 µg/ml (Fig 2A), y una mayor inducción con una dosis de 10 µg/ml que continua hasta los 50µg/ml (Fig 2B). Para esto se realizaron ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos específicos anti-pp38 policlonal (3:5000) y anti-mouse (1:5000).

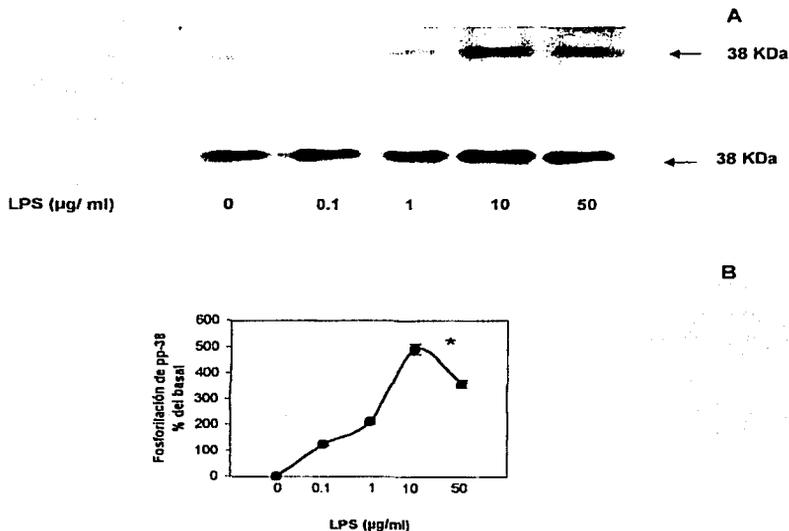


Figura 2. Dosis respuesta de la fosforilación de pp38 y p38 en FGH tratados con LPS.

A. Las células se trataron con dosis desde 0.1µg/ml hasta 50µg/ml durante 5 minutos y se procesaron las muestras para análisis de Western Blot.

B. Análisis gráfico del experimento dosis respuesta del tratamiento de lipopolisacárido en fibroblastos gingivales humanos sobre la fosforilación de pp38. El control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks. Los valores son la media de al menos 5 determinaciones  $\pm$  E.S. \*  $p < 0.05$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 12.3. INHIBICION DE LA INDUCCION DE LA ENZIMA iNOS POR SB203580 EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS ESTIMULADOS POR LPS.

Experimento tipo dosis respuesta para observar la inhibición de la enzima iNOS por el inhibidor SB203580 de p38 en FGH. Se preincubó el inhibidor SB203580 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA) a diferentes dosis como se observa en la figura 3 A. Posteriormente se colocó LPS a una dosis de 10µg/ml a un tiempo de 24 horas. Se utilizaron anticuerpos anti- NOS2 (1:3000) y anti-rabbit (1:5000)(Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA). Se observó que la enzima NOS2 es inducida por el LPS vía p38 y que su efecto disminuye hasta ser inhibida totalmente con el inhibidor SB203580, con dosis desde 0.5µM hasta 50 µM.

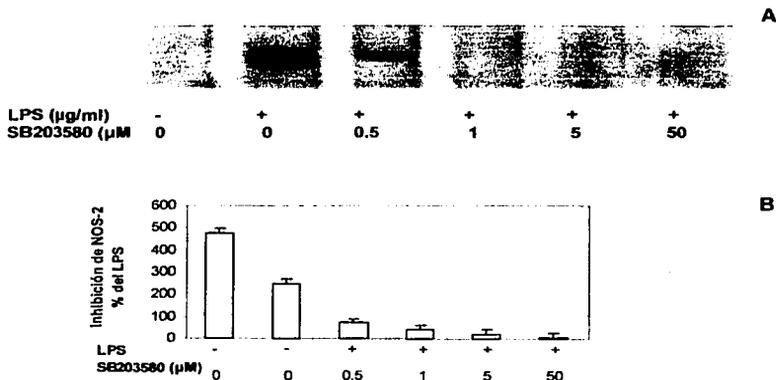


Figura 3. Efecto del pretratamiento con SB203580 sobre NOS2 en FGH tratados con LPS.

A. Preincubación con SB203580 a diferentes dosis durante 2 horas y posterior tratamiento con LPS 10 µg/ml por 24 horas, posteriormente se procesaron las muestras para análisis de Western Blot.

B. Análisis gráfico del efecto del pretratamiento con SB203580 sobre NOS2 en FGH tratados con LPS.

El control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

#### 12.4. CURSO TEMPORAL DE LA INDUCCIÓN DE LA ENZIMA COX-2 EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS ESTIMULADOS POR LPS.

Experimento tipo curso temporal para caracterizar la inducción de la enzima COX-2 en FGH al ser tratados con LPS (10µg/ml) a tiempos desde 2 hasta 24 horas. Observamos la inducción de COX-2 desde las 2 horas de incubación y una mayor inducción a las 16 horas (Fig 4 A). La inducción de COX-2 se detectó por medio de ensayos de Western Blot con el anticuerpo anti-COX-2 policlonal (3:5000) y anti-goat (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA).

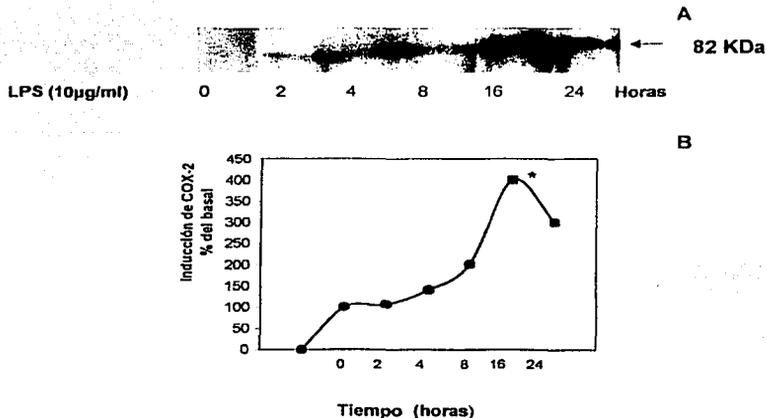


Figura 4. Curso Temporal de la inducción de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS. A. Las células se trataron con 10 µg/ml de LPS a diferentes tiempos al término de la reacción las muestras se procesaron para su análisis mediante Western Blot. B. Análisis gráfico del curso temporal del tratamiento de lipopolisacárido en fibroblastos gingivales humanos sobre la inducción de COX-2. El control 0 se tomó como el 100% del basal en base a su densidad óptica obtenida con el software de Labworks. Los experimentos se realizaron al menos cinco ocasiones se analizó la media ± E.S \*p0.05

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

## 12.5 INHIBICIÓN DE LA INDUCCIÓN DE LA ENZIMA COX-2 POR SB203580 EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS ESTIMULADOS POR LPS.

Para observar la participación de p38 sobre la inducción de COX-2 se preincubo el inhibidor SB203580 (5  $\mu$ M) por dos horas. Posteriormente se colocó el LPS a una dosis de 10 $\mu$ g/ml por un tiempo de 4 horas. Se realizó el ensayo de Western Blot usando anticuerpos anti-COX2 (3:5000) y anti-goat (1:5000). Se observó que la enzima COX2 es inducida por el LPS vía p38 y que su efecto disminuye hasta ser inhibida parcialmente con el inhibidor SB203580, con una dosis de 50  $\mu$ M. (Figura 5A).

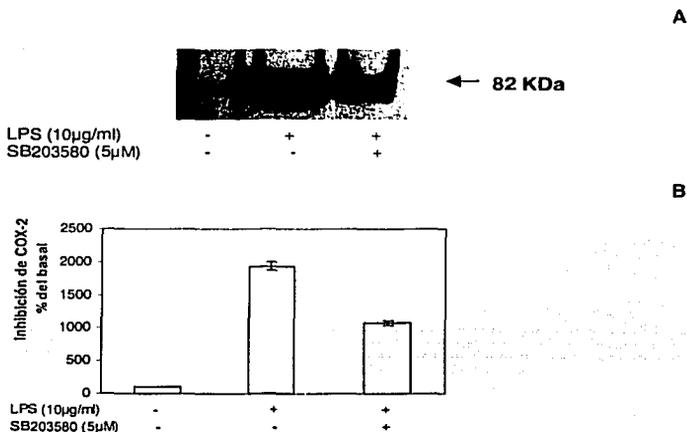


Figura 5. Efecto del pretratamiento con SB203580 sobre COX-2 en FGH tratados con LPS.

A. Preincubación con SB203580 5 $\mu$ M durante 2 horas y posterior tratamiento con LPS 10  $\mu$ g/ml por 4 horas. Se procesaron las muestras para análisis de Western Blot.

B. Análisis gráfico del efecto del pretratamiento con SB203580 sobre COX-2 en FGH tratados con LPS.

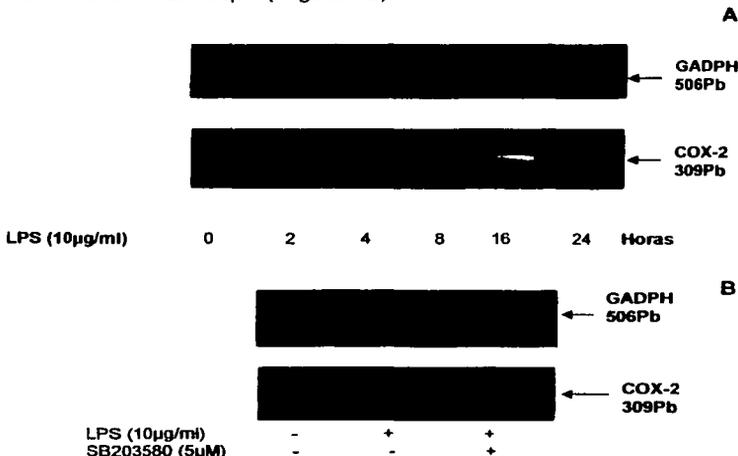
El control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

**12.6 EFECTO DEL INHIBIDOR SB203580 EN LA INDUCCIÓN DE COX-2 EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS TRATADOS CON LPS, MEDIANTE AISLAMIENTO DE mRNA Y RT-PCR.**

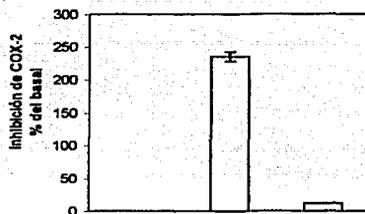
Otra técnica usada par observar el efecto del inhibidor SB203580 sobre la inducción de la enzima COX-2 en Fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS, fue mediante aislamiento de mRNA y la reacción de RT-PCR.

Se realizó la caracterización de COX-2 mediante un curso temporal con LPS 10µg/ml, se aisló el mRNA y se realizó la reacción de RT-PCR. Se obtuvo el producto cDNA de 309pb. (Figura 6 A).

Posteriormente se preincubó el inhibidor SB203580 (5µM) durante 2 horas, posteriormente se colocó el LPS (10µg/ml), posteriormente se realizó la extracción de mRNA y se obtuvo el cDNA mediante la técnica de RT-PCR. Se utilizó como control GADPH de 506pb. ( Figura 6 B).



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



C

LPS (10µg/ml)	-	+	+
SB203580 (5µM)	-	-	+

Figura 6. Efecto del pretratamiento con SB203580 sobre COX-2 en FGH tratados con LPS.

A. Curso temporal de COX-2 con LPS 10 µg/ml, se realizó aislamiento de mRNA y se obtuvo el cDNA mediante la reacción de RT-PCR.

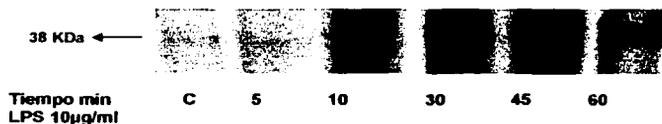
B. Preincubación con SB203580 5µM durante 2 horas y posterior tratamiento con LPS 10 µg/ml por 4 horas. Se procesaron las muestras para análisis de la reacción RT-PCR.

C. Análisis gráfico del efecto del pretratamiento con SB203580 sobre COX-2 en FGH tratados con LPS. El control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.7 FOSFORILACIÓN *IN VIVO* DE p38 POR LPS EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Se realizó un experimento tipo curso temporal para observar la inducción de p38 por LPS en FGH por medio de la fosforilación *in vivo* y ensayos de inmunoprecipitación, usando 625 µCi de [<sup>32</sup>P]. Se realizó a tiempos desde 5 minutos hasta 60 minutos con una dosis de LPS de 10µg/ml, se utilizó el anticuerpo policlonal anti-p38 (5µl). Se observó la fosforilación de p38 desde los 5 minutos de tratamiento hasta los 60 minutos.

4 A



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

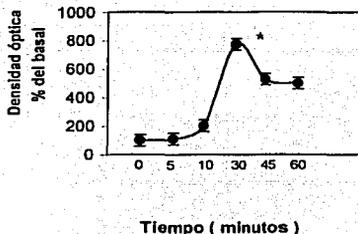


Figura 7. Curso temporal de la fosforilación *in vivo* sobre p38 en FGH tratados con LPS.

A. Las muestras obtenidas se procesaron para el ensayo de inmunoprecipitación.

B. Análisis gráfico del efecto de la fosforilación *in vivo* sobre p38 en FGH tratados con LPS a diferentes tiempos.

El tiempo 0 se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica obtenida por el software Labwork.

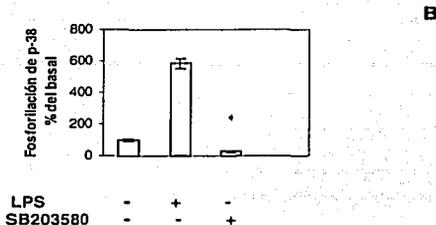
Los resultados son la media  $\pm$  ES \*  $p < 0,05$

## 12.8 EFECTO DEL INHIBIDOR SB203580 EN LA FOSFORILACIÓN *IN VIVO* DE p38 POR LPS EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Para observar el efecto inhibitorio de SB203580 las células se preincubaron con SB203580 (5 $\mu$ M) y 625  $\mu$ Ci de [<sup>32</sup>Pi] por 2 horas las células se lavaron y posteriormente se incubaron con el LPS (1 $\mu$ g/ml) durante 10 minutos. Se utilizó el anticuerpo anti-p38. Se observa que p38 está presente en la célula en el control y se induce en presencia del LPS, también se observa su inhibición con el inhibidor SB203580 (5 A y 5 B).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



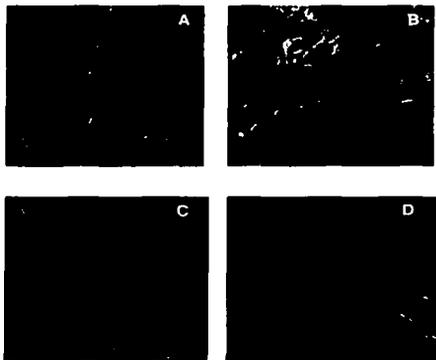
**Figura 8. Efecto del pretatamiento con SB203580 sobre la fosforilación *in vivo* sobre p38 en FGH tratados con LPS.**  
**A.** Las muestras se procesaron para el ensayo de inmunoprecipitación posterior al pretatamiento con SB203580 5  $\mu$ M por 2 horas y 5 min con LPS (1  $\mu$ g/ml).  
**B.** Gráfico del efecto del pretatamiento con SB203580 sobre la fosforilación *in vivo* sobre p38 en FGH tratados con LPS. El control se tomó como el 100% del basal de acuerdo a la densidad óptica obtenida por el software Labwork. Los resultados son la media  $\pm$  ES  $\cdot$   $p < 0.05$

## 12.9 EFECTO DEL INHIBIDOR SB203580 EN LA FOSFORILACIÓN *IN VIVO* DE p38 POR LPS EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS IMAGEN DE p38 Y pp38 EN MICROSCOPIO CONFOCAL MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA

Se han publicado algunos reportes que señalan que las proteínas de la vía de la MAP quinasa una vez que son fosforiladas se translocan al núcleo en donde son desfosforiladas por fosfatasa nucleares, por este motivo decidimos estudiar si el tratamiento con el LPS induce la translocación de p-38. Por lo que se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para observar la localización de p38 y pp38 en fibroblastos gingivales humanos con y sin el tratamiento con LPS. La observación se realizó mediante microscopia confocal. En la figura 6 A se observa que p38 se localiza en el citoplasma celular del FGH, se utilizó el anticuerpo anti-p38 (1:20) preincubado por 30 minutos a 4°C y el anticuerpo anti-ratón acoplado a fluoresceína (1:20). En la figura 6 B se observa p38 con el tratamiento del LPS a un tiempo de 10 minutos y una dosis de 10  $\mu$ g/ml, sin embargo no se observan cambios significativos que indiquen la translocación al núcleo.

En la figura 6 C se observa pp38 en el citoplasma del FGH previo al tratamiento con LPS, se utilizó el anticuerpo anti-pp38 (1:20) incubado por 30 minutos a 4°C y

el anticuerpo anti-ratón acoplado a rodamina (1:20). En la figura 6 D se observa pp38 con el tratamiento de LPS a una dosis de 10µg/ml a un tiempo de 15 minutos. No se observan cambios significativos que indiquen la translocación al núcleo.



**Fig 9. Microscopia confocal de p38 y pp38**

- A. Se realizó el cultivo de FGH hasta la semiconfluencia y se procesaron las células para ensayo de inmunohistoquímica. Se incubó el anticuerpo anti-p38 (5µl) y fluoresceína (5 µl).
- B. Se incubaron las células con 10µg/ml de LPS por 15 minutos, se colocaron los anticuerpos para p38 , se procesó la muestra para ensayo de inmunohistoquímica y se observó al microscopio confocal con el objetivo 10X.
- C. Se realizó el cultivo de FGH hasta la semiconfluencia, se procesaron las muestras para ensayo de inmunohistoquímica y se incubó el anticuerpo anti-pp38(5µl) y rodamina (5 µl)
- D. Se incubaron las células con 10µg/ml de LPS por 15 minutos, se colocaron los anticuerpos para pp38, se procesó la muestra para ensayo de inmunohistoquímica y se observó al microscopio confocal con el objetivo 10X.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 13. DISCUSION

La enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio de etiología diversa pero entre los factores que desencadenan la enfermedad se encuentra la interacción con microorganismos Gram negativos.<sup>32,42,43,50,51</sup> El lipopolisacárido presente en la membrana externa de estos microorganismos es el principal factor de virulencia, numerosos estudios refieren que promueve la síntesis de citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , esto ocurre por la estimulación de células como macrófagos, neutrófilos, linfocitos y fibroblastos gingivales que tienen una amplia participación en la cicatrización y en la remodelación del tejido conectivo del periodonto.<sup>9,23,2432-51</sup>

Para que el LPS desencadene esta respuesta en el huésped es necesaria la interacción de esta molécula con un complejo receptor que se encuentra en la membrana citoplásmica de células de defensa del huésped como monocitos y macrófagos, así como en los fibroblastos gingivales humanos. Este receptor está formado por una proteína identificada como CD14 que se encuentra en la superficie de la membrana citoplásmica y carece de región transmembranal, de CD14 existen dos formas una soluble que se encuentra en células epiteliales y una membranal que se asocia con células mieloides, estudios hechos con anterioridad refieren que los fibroblastos gingivales humanos presentan la forma membranal<sup>32</sup>, sin embargo otros autores mencionan que los fibroblastos gingivales humanos presentan la forma CD14s.<sup>38</sup>

En este complejo también participa un receptor TLR, se han identificado hasta la fecha 10 tipos en mamíferos, cada uno es específico para un sustrato, en el caso del LPS es reconocido por el receptor TLR4, aunque algunos autores mencionan que TLR2 puede estar involucrado en el reconocimiento, aunque tiene menor afinidad por el LPS a comparación con TLR4, en este complejo también se encuentran la proteína MD2 y la porción Toll del receptor MyD88, así como TRAF6 para activar la ruta de NF $\kappa$ B.<sup>35-39,41-45,50,51</sup>

La unión del complejo receptor al LPS desencadena una cascada de rutas de señalización que terminan con la producción de citocinas inflamatorias, y factores de crecimiento que son liberados por la célula como un mecanismo de defensa

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

contra el ataque bacteriano. Esto involucra la participación de sistemas de transducción celular, como la quinasa p38 que se encuentra presente en los fibroblastos gingivales humanos. p38 es una proteína que se ha encontrado y se ha caracterizado en muchas líneas celulares como monocitos, macrófagos, linfocitos y plaquetas, sin embargo poco se sabe de su comportamiento en células como los fibroblastos, y mucho menos en fibroblastos gingivales humanos. Esta quinasa forma parte de una familia que actualmente se encuentra como objeto de estudio de muchos investigadores. Forma parte del sistema de las MAP quinasa que principalmente está integrada por tres miembros ERK o quinasa regulada extracelularmente, JNK o quinasa amino-terminal reguladora del factor c-jun y p38. Cada una de estas quinasa es activada por diversos factores, ERK es activada principalmente por factores de crecimiento y algunas citocinas, mientras que p38 y JNK son activadas por citocinas inflamatorias o situaciones que generen estrés celular. La importancia de las MAPK radica en que intervienen en muchas respuestas celulares, como la expresión de genes, el movimiento celular, la mitosis, el metabolismo y la apoptosis, esto mediante la regulación de un sustrato que puede ser otra quinasa, un factor de transcripción o proteínas del citoesqueleto.<sup>48,57,58</sup>

Estas quinasa se caracterizan por poseer dominios de fosforilación formados por extremos tipo tirosina-X- treonina, el aminoácido X es el que caracteriza a cada quinasa, p38 posee el aminoácido glicina. La fosforilación de estos dominios que activa a p38 se lleva a cabo por medio de otras quinasa conocidas como MAPKK o quinasa que activa MAPK que a su vez es fosforilada por otra MAPKKK. Para p38 se han definido hasta el momento dos MAPKK que son MKK3 y MKK6, otros autores mencionan que MKK4 también puede ser una de las MAPKK de p38. La fosforilación ocurre de forma covalente en cada dominio.

El mecanismo de acción de cada una de estas MAPK no se conoce con exactitud, los estudios realizados con anterioridad indican que estas quinasa son capaces de fosforilar otras quinasa que se encuentran debajo de su vía, o que se translocan al núcleo celular, se ha demostrado que ERK puede translocarse al núcleo al ser inducida y ahí fosforilar muchos factores de transcripción, de JNK y

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

p38 se tienen menos estudios, sin embargo algunos autores mencionan que JNK también se transloca al núcleo donde regula factores como c-jun, ATF-2 (factor de transcripción 2) y Elk-1. Por su parte estos mismos autores mencionan que p38 también se dirige al núcleo en donde fosforila factores como ATF-2 y ELK-1 entre otros, sin embargo poco se sabe de la forma en la que ocurre este proceso y la regulación de la localización de estas quinasas. Nosotros realizamos ensayos de inmunohistoquímica p38 y pp-38 en FGH estimulados con LPS y no encontramos diferencias notorias que nos indiquen la traslocación de p38 y pp38 al núcleo, sin embargo se realizarán ensayos de western blot de la fracción citoplásmica y nuclear del FGH tratados con LPS para corroborar este efecto.<sup>59,63</sup>

Se han descrito cuatro isoformas de p38 que son  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , la forma  $\alpha$  ha sido la más estudiada y se cree que tiene un mayor grado de sensibilidad al inhibidor SB203580, por lo que podríamos pensar que la isoforma presente en los FGH es la forma  $\alpha$ , sin embargo para corroborar este efecto se realizaran estudios con oligonucleótidos antisentido.

Por otro lado los estudios realizados con anterioridad sobre p38 muestran que esta quinasa tiene una amplia participación en la respuesta inflamatoria y en la respuesta inmune innata, se le atribuyen la fosforilación de otras quinasas como MAPKAP (MK2 y MK3) a través de la cual produce TNF $\alpha$ . También activa factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B que generan genes que codifican para NOS2, COX-2, KGK-1, IL-1, IL-6, IL-12, ICAM-1, entre otras moléculas involucradas en la patogenia de la enfermedad periodontal.<sup>32,33,42,43,50,51.</sup>

En este trabajo encontramos que la fosforilación de p38 fosforilada inicia a partir de los 5 minutos de tratamiento con el LPS, observándose su mayor grado de fosforilación a los 15 minutos de tratamiento con una diferencia significativa ( $< 0.05$ ) con un 90% de confiabilidad en base al porciento del basal, y comienza a declinar su fosforilación aunque sigue observándose hasta los 60 minutos de tratamiento.

También se observó el grado de fosforilación de p38 fosforilada a diferentes dosis de tratamiento de LPS, encontramos que p38 fosforilada se estimula con dosis desde 0.1  $\mu$ g/ml de LPS y se observa una diferencia significativa ( $< 0.05$ ) con una

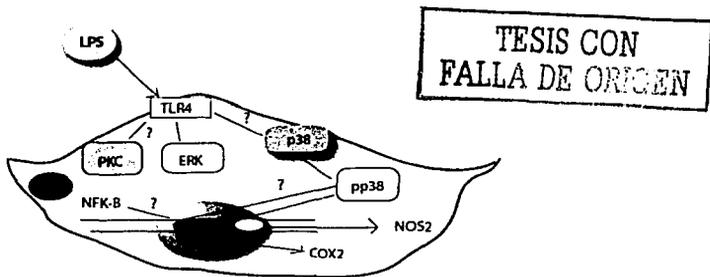
dosis de 10 $\mu$ g/ml en base al porcentaje del basal.

Para determinar la participación de p38 en la inducción de la enzima NOS2 utilizamos el inhibidor SB203580, el cual se preincubó por 2 horas a dosis de 0.5 $\mu$ M hasta 50  $\mu$ M, posteriormente se realizó el tratamiento con LPS a un tiempo de 24 horas, observamos que el LPS induce la enzima NOS2 y que el inhibidor SB203580 inhibe la expresión de NOS2 desde la dosis de 0.5 $\mu$ M logrando inhibirla totalmente con la dosis de 50  $\mu$ M, esto nos demuestra que p38 es una de las vías que induce la expresión de NOS2 al estar fosforilada por el LPS. NOS2 es la enzima óxido nítrico sintetasa que normalmente no se encuentra activada dentro de la célula sino que es inducida por citocinas inflamatorias o por LPS a través de factores de transcripción. Una vez activada esta enzima produce grandes cantidades de óxido nítrico que actúa como potente señalizador, entre las funciones que se le atribuyen están la vasodilatación y acciones bactericidas.

Por otro lado algunos autores mencionan la participación de p38 como una de las vías para inducir la enzima COX-2, esta enzima no se encuentra regularmente en las células sino que se presenta al ser inducida por factores de crecimiento, citocinas y LPS. COX-2 participa en la producción de prostacilinas y prostaglandinas, especialmente PGE2<sup>71,72</sup>. Para caracterizar la inducción de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS, se realizaron experimentos tipo curso temporal a tiempos largos, encontramos que COX-2 es inducida por el LPS en FGH a partir de las 2 horas de tratamiento y alcanza su mayor inducción a las 16 horas de tratamiento, y continúa su inducción hasta las 24 horas. Una vez caracterizada la enzima COX-2 se determinó si p38 estaba involucrada en la inducción de esta enzima, para lo cual se preincubaron las células por 2 horas con SB203580 5 $\mu$ M y posteriormente se colocó el LPS (10 $\mu$ g/ml) a un tiempo de 4 horas, se realizaron ensayos de Western Blott en los cuales observamos la inducción de COX-2 por el LPS y la inhibición parcial de esta enzima con el inhibidor SB203580. Para corroborar este efecto se realizó la extracción de mRNA y se obtuvo el cDNA mediante la reacción de RT-PCR, en nuestros resultados observamos la inducción de COX-2 posterior a las 4 horas de tratamiento con el LPS y la inhibición total de esta enzima con el inhibidor

específico de p38. Con esto determinamos la participación de p38 en la inducción de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS. Sin embargo aún no se sabe si p38 induce directamente el gen de COX-2 por medio de factores de transcripción o únicamente participa en la estabilidad del mRNA de COX-2. Por otra parte, ya que nuestros datos bibliográficos mencionan una regulación negativa de la enzima PI3K sobre p38, se continuará la investigación para caracterizar la participación de PI3K en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS.

De esto se desprende que el contenido de este trabajo puede contribuir a conocer una de las vías por las cuales se producen una amplia gama de citocinas involucradas en la patogenia de la enfermedad periodontal, para que en un futuro se desarrolle un fármaco que se pueda aplicar de forma clínica para inhibir la inducción de estos mecanismos de transducción y así disminuir la expresión de estas citocinas inflamatorias que conducen a la activación de la respuesta inflamatoria e inmune que puede provocar la destrucción de los tejidos periodontales en la enfermedad periodontal.



Modelo esquemático de las vías de transducción activadas en Fibroblastos Gingivales Humanos por LPS

## **14. CONCLUSIONES**

A partir de nuestros resultados podemos concluir que:

- 1.- El lipopolisacárido promueve la activación de la ruta de señalización de p38 en fibroblastos gingivales humanos, desde los 5 minutos de tratamiento
- 2.- p38 está involucrada en la expresión de NOS2
- 3.- El inhibidor SB203580 inhibe la expresión de NOS2 vía p38.
- 4.- p38 está involucrada en la inducción de la enzima COX-2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS.
- 5.- El inhibidor SB203580 inhibe la expresión de COX-2.

## 15.BIBLIOGRAFIA

- 1.-Lindhe Jan. Periodontología clínica e implantología odontológica. Editorial Médica Panamericana.España.2000
- 2.-Genco J. Robert. Periodoncia. Editorial Interamericana Mc-Graw-Hill. México.1993.
- 3.-Carranza Fermín A. Newman Michael G. Periodontología Clínica. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.1998.
- 4.-Liébana Ureña J. Microbiología Oral. Edit. Mc. Graw- Hill Interamericana. México 1997.
- 5.-Slots Jorgen and Taubman A. Martín.Contemporary oral and Immunology.Mosby Year Book, USA .1992.
- 6.-Pumarola A.C, C:R: Torres y J:A García. Microbiología y Parasitología Médica.Editorial Masson/Salvat. Barcelona. 1994.
- 7.-Gutiérrez Venegas Gloria, Kawasaki Cárdenas Perla et.al. Los Lipopolisacáridos: Estructura, receptores y transducción de señales. Simposium de Transducción de Señales. Universidad Nacional Autónoma de México. Julio 2002. pp31-38
- 8.-Kawasaki Cardenas Perla. Tesis. Efecto de los lipopolisacáridos sobre la via de transducción de tirosin-quinasa en fibroblastos gingivales humanos.. México D:F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003. pp. 21-24
- 9.-Bronislaw L.Slomiany and Amalia Slomiany. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide interferes with salivary mucin synthesis through inducible nitric oxide synthase activation by ERK and p38 Kinase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002;297:1149-1153
- 10.–Geoffrey M. Cooper. The cell. ASM Press. U.S.A. 2000.
- 11.-Lewin Benjamín. Genes VII. Marbán. 2001.
- 12.-García-Sainz Jesús Adolfo. Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. La ciencia para todos. México. 1997.
- 13.-Alberts Bruce. Dennis Bray. et. al. Biología molecular de la célula. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.1996.

- 14.-Berridge J. Michael. The Molecular Basis of Communication within the cell. *Sci.Am.* 253:124-134.
- 15.-Misako Hayama, Inoue Risa, et.al. ERK and p38 MAP Kinase are involved in arachidonic acid released induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and PDGF in mesangial cells. *Am.J.Physiol. Renal Physiol.*2001;282:F4845-F491.
- 16.-Taro Matsumoto, Koutaro Yokote, et.al. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J. Bio.Chem.*1999;274:13954-13960
- 17.-Hidenori Ichijo, Eisuke Nishida, et.al. Induction of Apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.*1997;275:90-94
- 18.-Ruth M. Kramer, Edda F.Roberts, Suzane L.Um, et.al. p38 Mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) in Thrombin-stimulated platelets. *J.Bio.Chem.* 1996;271:27723-27729.
- 19.-J.Han, J.D.Lee, L.Bibbs.et.al. A MAP Kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in Mammalian cells. *Science.* 1994;265:808-811.
- 20.-Lehninger. Principles of biochemistry. Worth publishers, 1993.
- 21.-Darveau RP, Tanner A y Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology* 2000;14: 12-32.
- 22.-Moore W y Moore L. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 1994; 5:66-77.
- 23.-Kumada H, Haishima Y, Umemoto T y Tamamoto K. Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 1995;177:2098-2106.
- 24.-Yukihiko Aramaki, Ryozeu Matsuno. Involvement of p38 MAP kinase in inhibitory effects of phosphatidylserine liposomes on nitric oxide production from Macrophages stimulated with LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2001;280: 982-987.
- 25.-Jiang Y, Ulevitch RJ. The signal transduction of cell activation by LPS: the studies from CD14 to p38 MAPK. *Cell Res* 2002;12 (5-6):331-7

- 26.-Stelmach JE, Liu L, Patel SB, Pivnichny JV, Scapin G, Singh S, Hop CE, Wang Z, et.al. Design and synthesis of potent, orally bioavailable dihydroquinazolinone inhibitors of p38 MAP kinase. *Shock*. 2002; 18 (5):401-6
- 27.-Harter L, Keel M, Steckholzer U, Ungethuen U, Trentz O, Ertel W. Activation of mitogen-activated protein kinases during granulocyte apoptosis in patients with severe sepsis. : *J Immunol* 2002;169(9):5260-9
- 28.-Kan WH, Yan WS, Jiang Y, Wang JZ, Qin QH, Zhao KS. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Glia* 2002 ;40(2):175- 183.
- 29.-Koistinaho M, Koistinaho J. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 ;97(5):1149-1153.
- 30.-Lowry O, Rosebrough N, et. al. Protein measurement with folin-phenol reagents. *J.Biol Chem*. 1951;193:265-275.
- 31.-Keith Wilson, John Walker. *Practical Biochemistry*. Cambridge University Press. U.S.A. 1994.
- 32.-E.Putnins Edward, Reza Ni Sanaie, et al. Induction of Keratinocyte Growth Factor 1 expression by Lipopolisaccharide is regulated by CD-14 and Toll-Like receptors 2 and 4. *Infection and Immunity*. 2002;12(70):6541-6548.
- 33.-Dong Chen,J.Davis Roger, et.al. MAP Kinases in the Immune response. *Annu.Rev.Immunol*.2002; 20:55-72.
- 34.-Genco Robert, Hamada Shigeyuki, et.al. *Molecular Pathogenesis of Periodontal Disease*. Library of Congress Cataloging in Publication Data. 1994.
- 35.-Guha Mausumee, et.al. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*. 2001,13:85-94.
- 36.-Sabroe,L.C. Parker, A.G.Wilson, et.al. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:984-989.
- 37.-Heumann Didier, Roger Thierry. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta*. 2002,323:59-72.
- 38.-Masaka Tamami, Hayashi Joichiro, et.al. Soluble CD-14 Dependet intercellular Adhesion Molecule-1 Induction by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide in Human Gingival Fibroblasts. *J.Periodontol*. 1999,70:772-776.

- 39.-Suzuki Nobutaka, Suzuki Sinobu. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *TRENDS in immunology*. 2002;23(10):503-506.
- 40.-Mims A. Cedric, Playfair John, et.al. *Microbiología Médica*. Editorial Mosby. España. 1995.
- 41.-Kent W.Leigh, Rahemtulla Firoz, Michalek M. Suzzane. Inteleukin (IL)-1 and *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Stimulation of IL-6 Production by Fibroblasts Derived From Healthy or Periodontally Diseased Human Gingival Tissue. *J.Periodontol*. 1999,70:274-282.
- 42.-Kent W.Leigh, Rahemtulla Firoz, Hockett D. Richard, et.al. Effect of Lipopolysaccharide and Inflammatory Cytokines on Interleukin-6 Production by Healthy Human Gingival Fibroblasts. *Infection and Immunity*. 1998;66(2):608-614.
- 43.-Wang P.L, Ohura X. *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Crit.Rev.Oral.Biol.Med*. 2002,13(2):132-142.
- 44.-Higashida-Guerrero Carolina, Gutiérrez-Venegas Gloria. Lipopolisacáridos:Extraordinarias moléculas activadoras de señales de Transducción celular. *BEB* 18(1):28-35
- 45.-Weinstein L. Steven, June H. Carl, et.al. Lipopolysaccharide-induced Protein Tyrosine Phosphorylation in human macrophages is mediated by CD14. *Journal of Immunology*.1993,151:3829-3838.
- 46.-Zerón Agustín. Nueva Clasificación de las enfermedades periodontales. *Revista ADM*. 2001;38(1):16-20.
- 47.-Armitage C. Gary. Classifying perlodontal diseases- long- standing dilemma. *Periodontology* 2000.30:9-23.
- 48 .-Lennon María Ana, Ramauge Martine, Pierre Michel. Role of Redox status on the activation of mitogen-activated protein kinasa cascades by NSAIDs. *Biochemical Pharmacology*. 2002,63:163-170.
- 49.-Roth A. James, Carole A. Bolin, et.al. Virulence Mechanisms of bacterial pathogens. *Library of congress*. 1995.
- 50.-W.Bainbridge Brian W. P.Darveau Richard. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate

- host defense system. *Acta Odontol. Scand.* 2001;59:133-138.
- 51.-Imantan T. Kato. T. Okuda K. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology.* 2001;16:65-72.
- 52.-Bagrodia Shubha, Dérijard Benoit, et.al. Cdc42 and PAK-mediated Signaling Leads to Jun Kinase and p38 Mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270(47):27995-27998.
- 53.-Zhang Shengjia, Han Jiahuai, et.al. Rho family GTPases regulated p38 mitogen-activated protein kinase through the Downstream Mediator Pak1. *Journal of Biological Chemistry.* 1995,41:23934-23936.
- 54.-Baldassare Joseph,Bi. Yanhua, Bellone J. Clifford. The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in IL-1 $\beta$  Transcription. *The Journal of Immunology.* 1999;162:5367-5373.
- 55.-Young R. Peter, Mc Laughlin Megan, Kumari Snajay, et.al. Pyridinyl Imidazole Inhibitors of p38 Mitogen-activated protein Kinase Bind in the ATP Site. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(18):12116-12121.
- 56.-Dérijard Benoit, Raingeaud Joel, Barret Tamara, et.al. Independent Human MAP Kinase Signal Transduction Pathways Defined by MEK and MKK isoforms. *Science.* 1995,267:682-685
- 57.-Johnson L. Gary, Lapadat Razvan. Mitogen-Activated protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK and p38 Protein Kinase. *Science.* 2002;298:1912-1934.
- 58.-Murall Krishna Rao. MAP Kinase activation in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology.* 2001;69:3-10.
- 59.-Brand Pia, Plochmann Sibylle, Valk Elke, et.al. Activation and Translocation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase after Stimulation of Monocytes With contact sensitizers. *Journal of Investigate Dermatology.* 2002;119:99-106.
- 60.-Ambrosino Concetta, Nebreda R. Angel. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biology of the Cell.* 2001;93:47-51.
- 61.-Raingeaud Joel, Gupta Shashi, Rogers S. Jeffrey, et.al. Pro-inflammatory Cytokines and Environmental Stress Casue p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine. *Journal of*

- Biological Chemistry.1995;270(13):7420-7426.
- 62.-Clerk Angela, J.Fuller Stephen, Michael Ashour, et.al. Stimulation of "Stress-regulated" Mitogen-activated Protein Kinases (Stress-activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Kinases and p38-Mitogen-activated protein Kinases) in perfused Rat Hearts by oxidative and other Stesses. Journal of Biological Chemistry.1998;273(13):7228-7234.
- 63.-Aplin E.Andrew, Hogan P. Brian, et.al. Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases. Journal of Cell Science.2002;115:2781-2790.
- 64.-Ajmone M.A. De Simone R. , et.al. Effects of phosphatidylserine on p38 mitogen activated protein kinase, cyclic AMP responding element binding protein and nuclear factor- $\kappa$ B activation in resting and activated microglial cells. Journal of Neurochemistry,2003;84:413-416.
- 65.-Nick A. Jerry, Young K. Scott, et.al. Selective Suppresion of Neutrophil acumulation in Ongoing Pulmonary Inflammation by Systemic Inhibition of p38 Mitogen-Activated protein Kinase. Journal of Immunology,2002;169:5260-5269.
- 66.-Kikuri Takashi, Hasegawa Tomokazu, et.al. Cyclic Tension Force Activates Nitric Oxide production in Cultured Human Periodontal Ligament Cells. J. Periodontol. 2002;71:533-539.
- 67.-Szabó Csaba. Reagents for Nitric Oxide Research. Calbiochem Signal Transduction Catalog and Technical Resource. 1996/97. Pp:267-270.
- 68.-M. English Jessie. Pharmacological inhibitord of MAPK pathways. TRENDS in Pharmacological Sciences.2002;23(1): 40-45.
- 69.-Ruiz López Cielo del Carmen. Tesina. Receptores parecidos a TOLL (TLRs) y su función en el parodonto. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, 2003. pp. 41.
- 70.-Pérez Garzón Miguel. Tesis. Efecto de la adherencia de *Actinomyces naeslundii* sobre la morfología, organización del citoesqueleto y activación de señales intracelulares en Fibroblastos Gingivales Humanos. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México 2003.
- 71.-Swiergiel H.Artur, Dunn J. Adrian. Distinct Roles for Cyclooxygenases 1 and 2

in interleukin-1-induced Behavioral Changes. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics;302(3):1031-1036.

72.-Monick M. Martha, Robeff K.Pamela, et.al. Phospahtidylinositol 3-Kinase Activity Negatively regulates Stability of Ciclooxygenase 2 mRNA.The Journal of Biological Chemistry.2002;277(36):32992-33000.

73.-Cotran Ramzi, Kumar Vinay, Robbins L. Stanley. Robbins Patología Estructural y Funcional. Editorial Mc Graw-Hill-Interamericana. 5ta edición. España.

74.-Santa Cruz Biotechnology, Inc. Catalog. Research Antibodies 2003.

75.-Reactivos y productos químicos para la investigación en Ciencias de la vida. SIGMA-ALDRICH Química.1999. pp.933

76.-Castillo Aleman José Ramiro. Tesis. Efecto de los lipopolisacáridos sobre la expresión de c-fos en fibroblastos gingivales humanos. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México 2002.

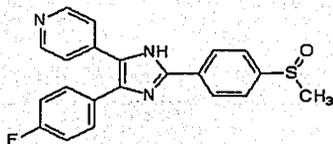
77.-Chomczynski y Sacchi. Anal. Biochem. 1987;162,156.

## 16.ANEXOS

### SB203580

Es un inhibidor sintético <sup>75</sup>, altamente específico de la MAP quinasa p38, previene la fosforilación de p38 en respuesta a IL-1, estrés celular, y LPS in vivo.

Pertenece al grupo de compuesto tipo piridinil imidazola, su estructura fue reportada desde 1988 al inhibir la producción de IL-1. Posteriormente se demostró su capacidad de inhibición principalmente de p38 $\alpha$ , de p38 $\delta$  y p38 $\gamma$  solo a altas concentraciones. <sup>26,54,68,75.</sup>



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN