

01421
99



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**"EFECTO DE LUTEOLINA SOBRE LAS ACCIONES
DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS EN FIBROBLASTOS
GINGIVALES HUMANOS"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
CIRUJANO DENTISTA**

Presenta:

ESQUIVEL CHIRINO CÉSAR AUGUSTO

TUTOR: DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS



MÉXICO, D.F.

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

La siguiente investigación titulada "Efecto de luteolina sobre las acciones de los lipopolisacáridos" fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas
Tutor

César Augusto Esquivel Chirino
Sustentante

México D.F.

Noviembre 2003

B.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y ser esa luz necesaria en todo momento de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas para ser universitario, y darme la oportunidad de adquirir los conocimientos para formarme como profesionista.

A mis padres por darme todo su amor y confianza en todo momento, por apoyarme siempre para cumplir lograr mis metas y anhelos.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, por haberme enseñado que existe el mundo de la investigación, por su esfuerzo, confianza y apoyo incondicional para compartir sus conocimientos y contribuir a mi formación académica y personal.

A mis abuelos por todas las muestras de amor que me han dado.

A mi tío Javier y José Arturo por enseñarme como tomar y asumir las decisiones importantes en la vida.

A mi padrino, por su asesoría y apoyo, por ser un ejemplo de cómo luchar siempre por tus metas en la vida.

A todos los profesores de la facultad que se cruzaron en mi camino, ya que de ellos obtuve conocimientos y me enseñaron la responsabilidad y el compromiso que debe tener el cirujano dentista.

A mis compañeros de laboratorio: Rita, Ana, Perla, Miguel, Silvia, Carla, Blanca Armando, Martita, por haberme apoyado en la realización de este proyecto, compartiendo sus conocimientos y tiempo en todo momento.

A todos mis amigos, por contar con su amistad incondicional a pesar de todas las adversidades que se presentan.

A todos aquellos que en algún momento de mi vida, me brindaron su confianza, apoyo, que me enseñaron y compartieron algo de ellos conmigo.

0

DEDICATORIA

Para ti Edgar ♡ porque en donde quieras que estés compartes este momento conmigo.

A Hannia, por traer amor y alegría en los momentos difíciles.

A ti Mamá por ser un ejemplo de cómo luchar siempre para alcanzar mis anhelos, por darme tu amor y cariño incondicional, por todo lo que siempre ha significado eso y todo para mí.

A ti Papá por enseñarme y apoyarme para conseguir todas mis metas y demostrarme que se puede luchar por tus ideales siempre con dignidad, y como ser fuerte para vencer todas las adversidades que se presentan, por tu amor y cariño.

ÍNDICE

1.- Abreviaturas	3
2.- Resumen	4
3.- Antecedentes	5
4.- Introducción	7
4.1 Periodonto	7
4.2 Placa dentobacteriana y enfermedad periodontal	17
4.3 Clasificación de la Enfermedad Periodontal	23
4.4 Bacterias periodontopatógenas	26
4.5 Lipopolisacárido y sus receptores celulares	27
4.6 Transducción de Señales	32
4.7 Flavonoides	34
4.7.1 Luteolina	36
5.- Planteamiento del problema	37
6.- Justificación	37
7.- Hipótesis	38
8.- Objetivos	39
8.1 Objetivo general	39
8.2 Objetivo específico	39
9.- Tipo de estudio	39
10.- Material y Métodos	40
11.- Análisis de resultados y métodos estadísticos	42
12.- Resultados.	43
13.- Discusión	47
14.- Conclusiones	49
15.- Bibliografía	50

1.-ABREVIATURAS

DMEM= Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco

Ab-Am= Antibiótico-Antimicótico

LPS= Lipopolisacárido

LBP= Proteína de unión a LPS

CD14m= Proteína CD14 membranal

CD14s= Proteína CD14 soluble

FGH= Fibroblastos gingivales humanos

ELAM-1= Molécula-1 de adhesión leucocitaria endotelial

ICAM-1= Molécula de adhesión intercelular –1

IL-1= Interleucina 1

IL= Interleucina

IL-6= Interleucina 6

ERK= Proteína quinasa activada extracelularmente

MAPK= Proteína quinasa activada por mitógeno

MAPKK= Proteína quinasa activadora de MAPK

NF- κ B= Factor nuclear – κ B

2.-RESUMEN

Entre las causas principales de los padecimientos dentales, se encuentran los problemas en el periodonto, por lo general son causados por bacterias gramnegativas que poseen en su superficie moléculas denominadas lipopolisacáridos, estas producen inflamación de las encías lo que conlleva a la posterior destrucción de los tejidos de sostén, provocando pérdida ósea y por tanto la pérdida de los órganos dentarios.

Uno de los eventos iniciales en el desarrollo de la enfermedad se produce por el reconocimiento entre los lipopolisacáridos con las células del huésped, promueve la activación de señales de transducción que conducen a que las células liberen componentes que promueven procesos inflamatorios que conducen al desarrollo y manifestación de la enfermedad periodontal.

Los flavonoides son compuestos naturales que contienen propiedades distintas entre las que se encuentran antiinflamatorias, en algunos sistemas celulares se ha encontrado que inhiben la liberación de mediadores inflamatorios como interleucinas³⁷. Luteolina es un flavonoide que inhibe la síntesis del factor de necrosis tumoral (TNF- α) e Interleucina-6, cuando los macrófagos son tratados con lipopolisacáridos.³⁵

Por este motivo la presente investigación tiene el objetivo de caracterizar los mecanismos de acción de la luteolina sobre activación de cinasas cuando los fibroblastos gingivales humanos son tratados con lipopolisacáridos.

Para el desarrollo de esta investigación se realizaron cultivos celulares de fibroblastos gingivales. Se obtuvieron lipopolisacáridos con los que se trataron los cultivos celulares, se realizaron experimentos de tipo dosis respuesta y curso-temporal con el propósito de caracterizar la fosforilación de ERK, las células se preincubaron con luteolina a diferentes dosis y tiempos y las muestras se analizaron mediante ensayos Western blot utilizando anticuerpos que reconocen la forma fosforilada de estas cinasas. Los experimentos se realizaron en cinco ocasiones por separado, las muestras se analizaron con el sistema Labworks y obtuvo la media \pm el error estándar. Se realizó el análisis de t de Student para determinar la diferencia de cada variable con respecto al control.

Los resultados obtenidos mostraron que al tratar los fibroblastos gingivales humanos con lipopolisacáridos produce una rápida (5 min) y transitoria fosforilación de ERK 1/2 (30 min). Se encontró de igual manera que al preincubar las células con luteolina (10mM) se bloquea la fosforilación y activación de ERK 1/2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS (1 μ g/ml).

3.-ANTECEDENTES

La enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio del tejido conectivo lo que conduce a que se produzca la migración del epitelio de unión y la destrucción del soporte óseo alveolar, este padecimiento es la principal causa de pérdida de dientes en adultos. La gingivitis es considerada como una forma inicial de la enfermedad periodontal, que puede convertirse en periodontitis, cuando existe un deficiente cepillado dental o una higiene inadecuada, así mismo la enfermedad se desencadena por enfermedades sistémicas o por factores hereditarios.

Entre la etiología de la enfermedad periodontal se encuentran las bacterias gram negativas. Por este motivo los huéspedes han diseñado toda una estrategia molecular que permite el reconocimiento de moléculas patógenas y responde a su presencia mediante la síntesis de mediadores inflamatorios e inmunitarios a fin de defenderse de estos agentes infecciosos. Se ha visto que la actividad frustrada del sistema inmune del huésped hacia la acumulación de placa (subgingival) es el origen de la enfermedad periodontal porque hay pérdida de los tejidos de soporte del diente.

Los lipopolisacáridos son los principales agentes mediadores de los procesos inflamatorios que están presentes durante una infección, estas biomoléculas son el componente patógeno responsable en el establecimiento de las enfermedades periodontales. Entre sus blancos de acción se encuentran diversos tipos celulares como son los fibroblastos gingivales humanos, en donde inducen la activación de señales de transducción y la síntesis de mediadores inflamatorios.¹⁹

Los lipopolisacáridos son estructuras que se encuentran asociadas a la membrana celular externa de las bacterias gram-negativas y que han sido también identificadas como endotoxinas, la liberación de las endotoxinas de las paredes celulares bacterianas facilita la interacción de éstas con los receptores de membrana de las células del sistema inmunológico, como los neutrófilos y macrófagos, los que al ser excesivamente activados producen citocinas mediadoras de la inflamación, entre las que se mencionan la IL-1, IL-6, IL-8, TNF α entre otras cuyas consecuencias más severas pueden ser la aparición del shock séptico.

Por la severidad de las lesiones ocasionadas por los lipopolisacáridos, diversos grupos de investigación se han abocado a estudiar los mecanismos moleculares de reconocimiento de estas moléculas con las células del huésped y en las últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos encaminados a la prevención de enfermedades. Unas moléculas que presentan actividades interesantes son los flavonoides ya que presentan propiedades antiinflamatorias, y pertenecen al grupo más amplio de los fenoles naturales, se encuentran tanto en estado libre como químicamente glicosilado, distribuidos ampliamente en el reino vegetal.¹⁰

Cuentan con una diversidad estructural, proporcionan el sabor y color de algunas frutas y plantas, así como una diversidad de propiedades antialérgicas, antiinflamatorias, antihepatotóxicas, antivirales entre otras.

La luteolina es uno de los más potentes y eficaces flavonoides para inhibir el incremento del factor de necrosis tumoral (TNF- α), Interleucina-6 y las acciones de los lipopolisacáridos así como la expresión de óxido nítrico. Tiene la capacidad de bloquear la activación de Nf- κ B , cuando esta es inducida por lipopolisacáridos.³²

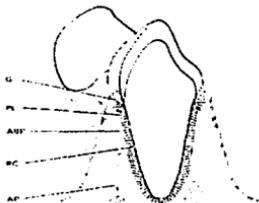
Un grupo de investigadores ha reportado la capacidad de luteolina para inhibir la toxicidad y la expresión de moléculas proinflamatorias inducidas por lipopolisacáridos *in vivo* e *in vitro*.³⁴

4. INTRODUCCIÓN

4.1. PERIODONTO.-

El periodonto también llamado "aparato de inserción" o "tejido de sostén del diente", está formado por un conjunto de tejidos que rodean y soportan al diente. Su función principal es la de unir el diente al tejido óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal, la estructura periodontal (fig 1) esta conformada por varios tejidos que comprenden:¹

- Encía
- Ligamento periodontal
- Cemento radicular
- Hueso alveolar



TEJIDOS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1 Dibujo esquemático del diente con su periodonto: la encía (G), el ligamento periodontal (PL), el cemento radicular (RC) y el hueso alveolar es decir el hueso alveolar propio (ABP) y la apófisis alveolar (AP). Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang.

Encía.-

Es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. Adquiere su forma y textura final con la erupción de los dientes.

En sentido coronario, la encía rosada coral termina en el margen gingival libre, que tiene un contorno festoneado, en sentido apical la encía se continúa con la mucosa alveolar de la cual se encuentra separada por la línea mucogingival.

La encía normal se caracteriza clínicamente por su color rosado y consistencia firme. La encía es un tejido que cuenta con muchas regiones y funciones especializadas. (fig 2,3)^{2,3}



Fig.2 Fotografia de una encía. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang.

Encía marginal o libre.-

Es de color rosa coral y consistencia firme, por lo regular tiene 1mm de ancho y forma la pared externa del surco gingival. Comprende el tejido gingival y las zonas vestibular y lingual de los dientes, la encía interdientaria y las papilas interdientarias, es la parte de la encía situada alrededor del cuello dentario. En el lado vestibular y lingual de los dientes, la encía libre se extiende desde el margen gingival libre en sentido apical hasta el surco apical libre que está ubicado en un nivel que corresponde con el nivel de la unión o límite cementoamantino.^{1,2}

Surco gingival:

Es el espacio poco profundo alrededor del diente circunscrito por su superficie en un lado, y el revestimiento epitelial del margen libre de la encía por el otro. La determinación clínica de la profundidad del surco gingival es un parámetro diagnóstico importante. Tiene una profundidad clínicamente normal de 1-3 mm.¹

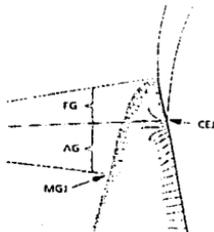


Fig 3. Clasificación clínica de la encía. Encía libre (FG), Encía adherida o insertada (AG), (MGI) límite mucogingival, (CEJ) límite cementoamantino. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang.

Encía insertada.-

En sentido coronario, está señalada por el surco gingival libre. Se extiende en dirección apical hacia la línea mucogingival hacia la unión mucogingival, donde se continúa con la mucosa alveolar. Tiene una textura firme, rosa coral, y suele mostrar un punteado delicado que le da aspecto de cáscara de naranja. Se extiende de la encía marginal a la mucosa oral de revestimiento, de la que se separa la línea mucogingival. Está unida firmemente al hueso alveolar y cemento subyacentes por medio de fibras conectivas.

La encía insertada tiene una superficie punteada de color rosado y un ancho variable; es más ancha en el sector incisivo (3.5 a 4.5 mm) y disminuye hacia los sectores posteriores.

Papila gingival:

Es la parte de la encía que se sitúa en el espacio interproximal creado por los dientes adyacentes en contacto. Puede ser deprimida en la zona central, debajo del punto de contacto, con dos papilas más elevadas en vestibular y lingual y en palatino. Esta integrada por encía marginal e insertada en cantidades variables, de acuerdo con el tipo de contacto de los dientes contiguos esta constituida por un sector central de tejido conectivo fibroso cubierto por un epitelio escamoso estratificado.¹

Fluido gingival:

El surco gingival y la unión epitelio-diente son bañados por un fluido gingival o crevicular, proveniente del tejido conectivo y que tiene una doble función: a) el arrastre mecánico de partículas tisulares o externas introducidas y b) la defensa inmunitaria, por la presencia de anticuerpos. Por otra parte, contiene también proteínas plasmáticas que aumentan la adherencia del epitelio al diente.²

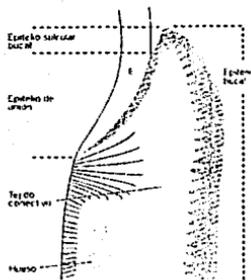


Fig 4. Esquema de un corte histológico que describe la composición de la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karting.

Histológicamente se observa que las células del epitelio escamoso estratificado se unen entre sí por medio de estructuras microscópicas llamadas desmosomas, que proveen una unión firme, al tiempo que permite a las células un movimiento independiente para desplazarse a la superficie.¹

Las células epiteliales basales se unen al tejido conectivo subyacente por medio de hemidesmosomas y una lámina basal. La adherencia del epitelio al esmalte o al cemento se hace por un medio similar que permite el desplazamiento de las células del epitelio de unión, que sufren un continuo recambio hacia su descamación en el surco gingival, y el pasaje del fluido gingival.¹

Tejido Conjuntivo

Es el tejido más predominante en la encía y del ligamento periodontal, en su mayoría está constituido por fibras de colágeno (60%) fibroblastos (5%), vasos, nervios y matriz (35%). Las fibras de colágeno soportan el reborde gingival y lo mantienen unido al diente y al hueso alveolar subyacente, forman fuertes cordones que unen y sostienen los tejidos, dando origen a unidades funcionales. Su estructura consta de tres cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí, formando la molécula básica de colágeno.

Las moléculas se agregan por los lados, dando lugar a filamentos de colágeno que se acumulan, a su vez, para formar la fibrilla de colágeno. Las fibras de colágeno de la encía están compuestas por numerosas fibrillas, unidas entre sí por los proteoglicanos.²

Células del tejido conectivo

Los diferentes tipos de células presentes en el tejido conectivo son ; fibroblastos, mastocitos, macrófagos, granulocitos neutrófilos, linfocitos y plasmocitos.^{2,3}

Fibroblasto

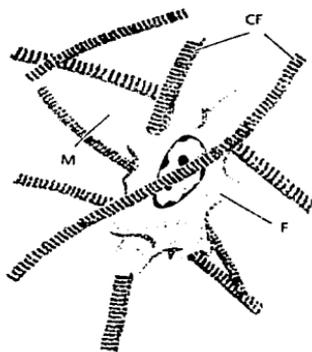
Es la célula que mas predomina en el tejido conectivo (65%), esta dedicado a la producción de diversos tipos de fibras que se encuentran en el tejido conectivo, interviene en la síntesis de la matriz de este tejido.

Es una célula grande, plana y ramificada, fusiforme o estrellada con núcleo de forma ovalada (fig 5).

El citoplasma contiene un retículo endoplasmático granuloso bien desarrollado, con ribosomas.

El aparato de Golgi suele tener tamaño considerable y las mitocondrias son grandes y numerosas, además el citoplasma contiene muchos tonofilamentos delgados. Se pueden hallar una gran cantidad de vesículas adyacentes a la membrana celular a lo largo de la periferia.

Su función principal es la producción de diversos tipos de fibras halladas en este tejido (fibras colágena, reticulina y elásticas) y algunos componentes de la matriz celular (glucosaminoglucanos y glucoproteínas). También está involucrado en la reparación y destrucción de los tejidos en la enfermedad periodontal.^{1,2,3,4}



TFSIS CON
FALA DE ORIGEN

Fig 5. Esquema de un fibroblasto. (F) Red de Tejido Conectivo, (CF) Espacio Intermedio (M) Matriz. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P.Lang.

Mastocito

Responsable de la producción de ciertos componentes de la matriz celular, también producen substancias vasoactivas que esta pueden afectar el sistema microvascular y controlar el flujo de la sangre a través del tejido; tales substancias son histamina y la heparina, que se acumulan en una gran variedad de vesículas que se encuentran en el citoplasma de la célula.

Macrófago

Dentro de sus principales funciones están principalmente de tipo fagocíticas por esto pueden observarse en su citoplasma vesículas lisosómicas con material fagocitado conocidos como fagosomas. Abundan en los tejidos inflamados y derivan de los monocitos sanguíneos dentro de los tejidos.¹⁻³

Los neutrófilos y linfocitos, participan principalmente en la respuesta inflamatoria.

Fibras:

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

Fibras colágenas:

Son las que mas predominan, son producidas principalmente por el fibroblasto, y también por los cementoblastos y osteoblastos ya que poseen esta capacidad. Algunas de ellas se distribuyen al azar y otras se organizan en fascículos con una orientación definida distinguiéndose:²

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 dentoperiosticas: 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.

Fibras elásticas: Se encuentran asociadas con los vasos sanguíneos.

Fibras de reticulita: Se caracterizan por teñirse con la tinción argirofilica y se encuentran principalmente adyacentes a la membrana basal, y en el tejido conjuntivo laxo que rodea a los vasos sanguíneos.

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, y 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 glucosaminoglucanos 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.

Vasos sanguíneos.

La vascularización del tejido periodontal proviene de las ramas de las arterias alveolares superior e inferior.³

Nervios.

La inervación de la encía procede de las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino.²

CEMENTO RADICULAR

Es un tejido mineralizado especializado que cubre las superficies radiculares de los dientes sin embargo no posee vasos sanguíneos, linfáticos e inervación, no experimenta reabsorción, pero se caracteriza por estar depositándose continuamente durante toda la vida.

Consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica, su contenido mineral principalmente de hidroxiapatita.

Su contenido mineral, lo constituye principalmente la hidroxiapatita en un porcentaje del 95% . Sus funciones principales son la reparación de la superficie radicular y la de la inserción del ligamento periodontal.

Su funciones principales son, permite que se insertan en él las fibras periodontales dirigidas a la raíz y contribuye al proceso de reparación consecutivo a un daño en la superficie radicular.^{2,5}

Se reconocen dos tipos de cemento radicular:

Cemento primario o Acelular

Se forma a medida que se va formando la raíz; cubre siempre la parte cervical del diente y en la porción apical la raíz esta cubierta por cemento celular.

Se forma conjuntamente con la raíz y la erupción dentaria y cubre los dos tercios coronarios de la raíz y no contiene células.

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.^{1,2}

Cemento secundario o celular.-

Se forma después de la erupción dentaria, en repuesta a las exigencias funcionales, sin embargo sobre la superficie radicular pueden alternar áreas de cemento acelular y celular, es más irregular y contiene células llamadas cementocitos.

Ambos tipos de cemento están constituidos por una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas colágenas. La inserción de las fibras principales del ligamento periodontal en el cemento, se hace por medio de la incorporación en el cemento de los extremos de fibras principales a esta porción de la fibra se llama fibra de Sharpey.^{1,2}

Ambos cementos son producidos por el cementoblasto que al quedar contenidos dentro del cemento reciben el nombre de cementocitos.

LIGAMENTO PERIODONTAL

Es el tejido conectivo blando, que está muy vascularizado y celular que rodea los dientes une al diente y hueso, une al cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar propio. En sentido coronario, se continúa con la lámina propia de la encía y se encuentra separado de ésta por los haces de fibras de colágenas que conectan la cresta del hueso alveolar con la raíz.

Interviene en posibilitar la distribución y absorción de las fuerzas generadas durante la función masticatoria y en otros contactos dentarios, hacia la apófisis alveolar por la vía del hueso alveolar propio. También es esencial para la movilidad de los dientes.

Sus funciones más importantes son:

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

- a) **Físicas:** dan soporte al diente y permiten movimientos de éste dentro de los alvéolos y amortiguan la presión ejercida al hueso durante la masticación.
- b) **Formativa y de remodelación:** de hueso y cemento, que ocurren en el movimiento dental fisiológico, en el acomodo del periodonto ante las fuerzas oclusales y en la reparación de las lesiones.
- c) **Nutritiva y sensorial:** proveen nutrición e inervación al cemento y hueso.^{2,5}

Las fibras que conforman el ligamento periodontal se clasifican en (fig 6):

-Fibras de la cresta alveolar

Se extienden en sentido oblicuo desde el cemento por debajo del epitelio de unión hasta la cresta alveolar. Evitan la extrusión del diente y se oponen a los movimientos laterales.¹

-Fibras oblicuas:

Ocupan la mayor parte del ligamento periodontal, se extienden desde el cemento en dirección coronal oblicuamente al hueso. Su función es detener la intrusión del diente.²

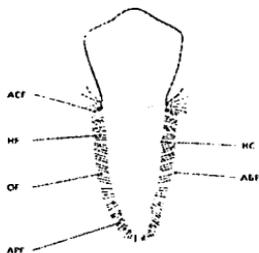
-Fibras apicales:

Divergen a partir del cemento hacia el hueso en el fondo del alveolo. Ocupan las zonas apicales en forma radial. No existen en raíces incompletamente formadas.

-Fibras horizontales:

Estas fibras corren de manera perpendicular desde el diente hasta el hueso.

El ligamento periodontal está compuesto principalmente de fibras colágenas dispuestas en haces. 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.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig 6. Esquema del ligamento periodontal, como se ubica entre el hueso alveolar propio 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 Karring, Niklaus P. Lang.

HUESO ALVEOLAR

Es la parte de los maxilares superior e inferior que forma y sostiene los alvéolos dentarios y que se continúa con el resto de la estructura ósea.²

Su función principal es la de distribuir y reabsorber las fuerzas generadas, por ejemplo, por la masticación y por otros contactos dentarios.

El hueso alveolar está constituido por una matriz colágena calcificada, con osteocitos encerrados en espacios denominados lagunas. Los osteocitos tienen prolongaciones que se anastomosan, traen oxígeno y sustancias nutritivas a las células. Las dos terceras partes de la estructura ósea están formadas por minerales (calcio, fosfato, carbonatos, entre otros) en forma de cristales ultramicroscópicos de hidroxipatita.²

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 como hueso esponjoso.

La matriz ósea, llamada osteoide, es depositada por osteoblastos, que gradualmente quedan encerrados en la matriz que se va calcificando y pasan a ser osteocitos. La reabsorción del hueso está a cargo de las células llamadas osteoclastos las cuales son grandes, multinucleadas y aparecen en erosiones de la superficie ósea llamadas lagunas de Howship.^{1,2,5}

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

La forma del tabique óseo interdental depende de la distancia entre los dos dientes adyacentes, de la convexidad de sus caras proximales y de la altura relativa de sus límites amelocementarios.^{1,2}

4.2.-PLACA DENTOBACTERIANA Y ENFERMEDAD PERIODONTAL.

La placa dentobacteriana se clasifica de acuerdo a su localización en supragingival y subgingival. Es el acúmulo de depósitos bacterianos en la cavidad bucal.

PLACA SUPRAGINGIVAL.

Se detecta a simple vista cuando alcanza cierto grosor, esto sucede en uno o dos días en aquellos sitios donde no se remueve de manera intencional, por fuerzas de masticación u otras funciones vitales. Es amarilla o blanquecina y tiene mayor grosor a lo largo del tercio gingival del diente y áreas interproximales.²

La formación inicia con la aposición al esmalte de la película adquirida, y esta 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 se inicia la colonización bacteriana, el primer colonizador es *Streptococcus sanguis*, después *Actinomyces viscosus*, estos son asociados con glucoproteínas de la película.

La mayor parte de las bacterias provienen de la microflora salival que baña el diente y otras son transportadas por células descamadas que las llevan adheridas (Fase 2). Seguido de esto se inician la agregación bacteriana y se incorporan nuevas bacterias, continua la multiplicación de las ya existentes (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 *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.^{2,6} 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 7)

PLACA SUBGINGIVAL.

Es aquella agregación bacteriana delgada que se encuentra por completo 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 actinomycetemcomitans*, especies de *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia buccalis* y *Selemonas*. 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*, *Selemonas* y *Fusobacterium*.^{2,6}

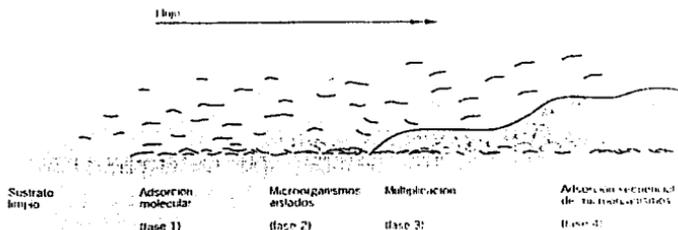


Fig 7. Etapas de la formación de biopelícula sobre una superficie limpia, dura y no descamante. Fase 1: Adsorción molecular para favorecer la formación de la biopelícula. Fase 2 Adhesión bacteriana, Fase 3: Desarrollo de la matriz extracelular y multiplicación bacteriana. Fase 4: Adsorción secuencial de más bacterias para formar biopelícula más compleja y madura. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe, Thorkild Karting.

ENFERMEDAD PERIODONTAL

Es un padecimiento que afecta las estructuras de sostén de los dientes y da como resultado la pérdida dental. Las reacciones inflamatorias e inmunitarias en respuesta a la presencia de la placa microbiana son características de la gingivitis y la periodontitis. Estas reacciones son visibles microscópicamente y clínicamente en el periodonto afectado y representa la respuesta del huésped a la microflora de la placa y a sus productos, actúan en los tejidos gingivales para protegerlos contra el ataque microbiano y evitan que los microorganismos se extiendan o invadan los tejidos, esto es una respuesta no sólo a una especie microbiana, si no a una gran cantidad de microorganismos y sus productos, que actúan durante un período relativamente prolongado.

Pero a veces esta reacción puede ser perjudicial, cuando las reacciones inflamatorias e inmunitarias se extienden más allá del fondo de la bolsa pueden afectar al hueso alveolar al destruirlo, se han identificado más de 400 diferentes microorganismos en las bolsas periodontales, cada uno con distinto potencial inductor de enfermedades.²

La destrucción periodontal puede ser el resultado de las combinaciones de factores bacterianos que varían con el tiempo, también puede deberse tanto a las enzimas virulentas producidas por las bacterias que inducen la inflamación, como a una reacción inmunitaria a los productos de desecho o al componente lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias gram-negativas.

En algunos sitios, la lesión inflamatoria puede estar limitada a la encía (gingivitis) durante largos períodos sin un progreso visible de la enfermedad hacia los tejidos más profundos, en otros sitios puede estar produciéndose destrucción periodontal activa y puede ser una consecuencia de una variedad de factores.²

Los conceptos actuales sobre etiología de la enfermedad periodontal derivan de los resultados de estudios epidemiológicos, pruebas clínicas etc.

Los hallazgos de estudios epidemiológicos revelaron de forma constante que la experiencia y extensión de la enfermedad periodontal aumenta con la edad, y con la higiene bucal inadecuada.

Los datos de las investigaciones implican con fuerza que la mayoría de los tipos de enfermedad periodontal son trastornos asociados a la placa que se inician como una manifiesta inflamación de la encía.

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

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

Las alteraciones clínicas pueden parecer sutiles en las primeras etapas de la gingivitis, pero existen grandes alteraciones a nivel histológico, se producen cambios en la red vascular, los lechos capilares son invadidos por líquido exudado y proteínas se produce una penetración de células inflamatorias. Al aumentar la infiltración celular, se modifica la composición estructural y celular de los tejidos.²

La encía clínicamente sana tiene una capacidad de respuesta contra los microorganismos y otras funciones como son la producción de anticuerpos contra los microorganismos, producción de elementos del complemento y mantenimiento de una barrera epitelial. Estos elementos 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.

Etapas de la Enfermedad Periodontal :

Lesión inicial

Se produce rápidamente inflamación en cuanto se deposita placa en el diente. A las 24 horas son evidentes los cambios acentuados en el plexo microvascular por debajo del epitelio de unión en cuanto llega más sangre al área. Histopatológicamente es evidente la dilatación de las arteriolas, capilares y vénulas.

Como resultado la presión hidrostática la microcirculación crece y se forman brechas intercelulares entre células endoteliales capilares adyacentes. El resultado es un incremento de la permeabilidad del lecho microvascular, de modo que se exudan líquidos y proteínas hacia los tejidos.²

Al agrandarse la lesión y aumentar el flujo de líquido crevicular gingival, las sustancias nocivas de los microorganismos se diluyen tanto en el tejido como en la hendidura. Las bacterias y sus productos entonces pueden ser eliminados por la hendidura. Las proteínas plasmáticas que escapan de la microcirculación son proteínas de defensa, como anticuerpos, complementos e inhibidores de proteasa y otras macromoléculas con funciones múltiples. Se ha caracterizado la naturaleza química y la concentración de las diversas proteínas plasmáticas, proteasas titulares, inhibidores, de degradación y enzimas leucocitarias en la hendidura gingival.

Los componentes del líquido crevicular gingival son considerados marcadores del proceso inflamatorio y se están utilizando como marcadores diagnósticos de la enfermedad periodontal.

Lesión temprana.

La lesión gingival temprana o precoz, se produce aproximadamente siete días después de acumulación de placa. Histológicamente, los vasos por debajo del epitelio de unión permanecen dilatados, pero su cantidad aumenta debido a la apertura de los lechos capilares previamente inactivos. El curso, tamaño y cantidad de las unidades microvasculares se reflejan en el aspecto clínico del margen gingival durante esta fase.

Los linfocitos y neutrófilos constituyen la infiltración leucocitaria predominante en esta etapa y se observan muy pocos plasmocitos en la lesión.

Dentro de la lesión los fibroblastos degeneran; probablemente se produce esto por apoptosis y sirve para eliminar a los fibroblastos del área, lo cual permite una mayor infiltración leucocitaria.^{1,2}

De modo similar, se produce destrucción de colágeno en el área infiltrada que es necesaria para que los tejidos puedan ser separados para dejar lugar a las células infiltrantes; se puede considerar un proceso de creación de espacios.

Las alteraciones inflamatorias son apreciadas clínicamente en esta etapa y, aproximándose al término de la segunda semana de acumulación de placa, se pueden hallar depósitos subgingivales.

No ha sido determinada la duración de la lesión precoz en los seres humanos. La lesión temprana puede persistir mucho más tiempo que cuanto se suponía antes la variación de susceptibilidad entre distintos sujetos.

Lesión establecida.

Se produce un refuerzo ulterior del estado inflamatorio mientras continúa la exposición a la placa. Existe un incremento del exudado líquido y migración de leucocitos hacia los tejidos y la hendidura gingival. Clínicamente se presenta una tumefacción edematosa mayor que la gingivitis temprana y puede ser considerada una gingivitis establecida. La lesión establecida, como la definieron Page y Schroeder.^{1,2}

En la lesión establecida clásica se ven grandes cantidades de plasmocitos maduros situados primariamente en los tejidos conectivos coronarios, así como en torno a los vasos. La pérdida de colágeno continúa en ambas direcciones, lateral y apical, al expandirse el infiltrado celular inflamatorio.

El resultado es que los espacios que han sido privados de colágeno se extienden más profundamente hacia dentro de los tejidos, y quedan disponibles para la infiltración leucocitaria.

Durante este periodo, el epitelio dentogingival continúa proliferando y el retículo epitelial se extiende más profundamente en el tejido conectivo en un intento por mantener la integridad epitelial y una barrera a la penetración microbiana.

El epitelio de la bolsa no está adherido a la superficie dentaria y tiene una fuerte infiltración leucocitaria, con predominio de neutrófilos que eventualmente migran a través del epitelio hacia la hendidura gingival o bolsa.^{1,2}

En comparación con el epitelio de unión original, el epitelio de la bolsa es más permeable al paso de las sustancias hacia adentro y hacia fuera de los tejidos conectivos subyacentes y puede estar ulcerado en algunos puntos.

Parecen existir dos tipos de lesión establecida, uno se mantiene estable y no progresa por meses o años, mientras el segundo se hace más activo y se convierte en lesiones periodontales destructivas.

Lesión avanzada.

Es la etapa final en este proceso, la lesión gingival avanzada.

Al profundizar la bolsa, probablemente debido al epitelio que se extiende apicalmente en respuesta a la irritación de la placa y a episodios ulteriores destructivos de corta duración y microscópicos, la placa continúa su crecimiento en profundidad y florece en su nicho ecológico anaerobio.

El infiltrado de células inflamatorias se extiende lateralmente y más apicalmente en los tejidos conectivos. La lesión avanzada tiene todas las características de la lesión establecida, pero difiere en forma importante en cuanto existe pérdida de hueso alveolar, el daño a las fibras es amplio, el epitelio de unión migra apicalmente desde el límite cementoamantino y hay amplias manifestaciones de lesión tisular inflamatoria e inmunopatológica. La lesión ya no está localizada y el infiltrado celular inflamatorio se extiende lateralmente y apicalmente en el tejido conectivo. En general se acepta que los plasmocitos constituyen el tipo celular predominante en la lesión avanzada. Hay similitudes mayores entre la lesión establecida de una gingivitis crónica y la lesión avanzada de periodontitis crónica.²

4.3.- CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

La clasificación actual de la enfermedad periodontal fue realizada en fechas recientes por un comité de expertos clínicos e investigadores científicos convocados por la Academia Americana de Periodontología.^{7,8,9}

Actualmente la clasificación es de acuerdo a su etiología y la capacidad de respuesta del huésped:

1.- Enfermedades Gingivales.

A.- Enfermedad por placa dental.

Gingivitis asociada únicamente a placa

- a) Sin otros factores locales
- b) Con otros factores locales

2.- Enfermedades Gingivales modificadas por factores sistémicos.

A) Asociadas al sistema endocrino

- 1. En la pubertad
- 2.-En el ciclo menstrual
- 3.-En el embarazo
 - a).-Gingivitis
 - b).-Granuloma piogéno
- 4.-Gingivitis en la diabetes mellitus

B) Asociadas a discrasias sanguínea

- a).-Gingivitis en la leucemia
- b).-Otras

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

6.- Lesiones originadas por bacterias específica

- a. *Neisseria gonorrhoea*
- b. *Treponema pallidum*
- c. *streptococcal*.
- d. Otras variedades.

7.-Enfermedad gingival de origen viral

a.-Infecciones por herpes

- 1.-gingivoestomatitis primaria
 - 2.-herpes oral recurrente
 - 3.-varicela-zoster
- b.-Otras

8.-Enfermedad gingival de origen fúngica.

a.- Infecciones por *Candida sp.*

- 1.-Candidiosis gingival generalizada
 - a)Eritema gingival lineal
 - b)Histoplasmosis
 - c)Otras

9.-Lesiones gingivales de origen genético

- a. Fibromatosis gingival hereditaria
- b. Otras

10.-Manifestaciones gingivales de ciertas condiciones sistémicas

a. Desórdenes mucocutáneos

- 1) Liquen plano
- 2) Penfigoide
- 3) Péufigo vulgar
- 4) Eritema multiforme
- 5) Lupus eritematoso
- 6) Inducido por drogas
- 7) Otros

b. Reacciones alérgicas

- 1) Materiales dentales
 - Mercurio
 - Níquel
 - Acrílico
 - Otros

11.-Reacciones atribuibles a :

- Dentríficos
- Enjuages bucales
- Aditivos del chicle
- Alimentos y aditivos
- Otros

12.-Lesiones traumáticas

13.-Reacciones a cuerpo extraño

14.-No específicas

Clasificación de la Periodontitis.

1.- Crónica

- A. Localizada
- B. Generalizada

2.- Periodontitis agresiva

- A. Localizada
- B. Generalizada

3.- Periodontitis con manifestaciones de enfermedades sistémicas.

- A. Asociada con desordenes 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 pericoronaral

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.

4.4. BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

Las enfermedades periodontales son causadas por bacterias presentes en la placa dental bacteriana, a esto se debe que es una enfermedad infecciosa. La enfermedad periodontal esta asociada con una microflora compleja en la cual más de 350 especies pueden ser encontradas.

Una variedad de microorganismos predominantemente gram-negativos, facultativos o anaerobios y móviles participan en la etiología de la enfermedad. Entre las especies asociadas a la enfermedad periodontal se encuentran : *Porphyromonas, gingivalis, Prevotella intermedia, Bacteroides forsythus, Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola*.

Ya que su estructura bacteriana, sus componentes extracelulares y sus metabolitos pueden provocar diversos efectos sobre los tejidos del huésped.^{2,4}

4.5.- LIPOPOLISACÁRIDOS

Se les denomina también endotoxinas bacterianas. Los lipopolisacáridos (LPS) son compuestos biológicamente activos, son los principales componentes de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, dentro de sus principales funciones se cuentan: participar en el mantenimiento e integridad de estos microorganismos. Diversos estudios han demostrado que específicamente el lípido A de su estructura es el responsable de su actividad biológica. Estas moléculas son los agentes causales del shock séptico. De acuerdo a su naturaleza química el (LPS) es una molécula anfifílica que consta de tres regiones :^{10,11,12}

- 1) Región Hidrofóbica (llamado lípido A)
- 2) Polisacárido Central que contiene heptosa
- 3) Polisacárido O-específico (actúa como antígeno serológicamente activo)

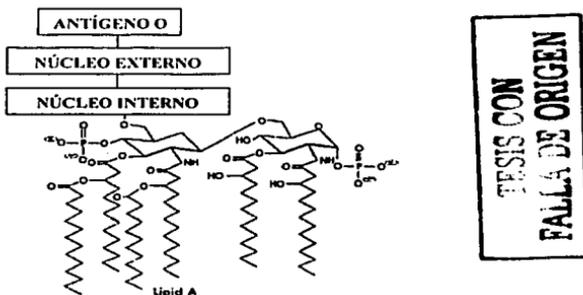


Fig 8. Esquema de la estructura general de una molécula de Lipopolisacárido. Guha Mausumee, Mackman Nigel. LPS induction of gene expression in human monocytes.

La estructura mínima de LPS que se requiere para el crecimiento de *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas llamadas Re, consiste en el lípido A y dos unidades de la octosa 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO).

La estructura interna del LPS se encuentra formada por KDO y heptosa. Las cepas bacterianas que poseen los Re LPS mínimos son hipersensibles a detergentes y antibióticos hidrofobitos.^{10,12,13}

Su especificidad serológica se encuentra en el polisacárido O-específico, mientras que en el centro bioactivo, corresponde al lípido A, que en un extremo tiene ácidos grasos y en el otro cuenta con grupos fosfato, esto lo hace ser anfifílico, cuando los LPS están aislados, forman micelas biológicamente activas.

Biosíntesis del Lípido A

La mayoría de las actividades biológicas de los LPS se atribuyen a la región del lípido A, esta estructura es la responsable de unir al LPS con la membrana celular. La estructura básica del lípido A es similar entre bacterias gram-negativas, incluyendo *enterobacterias*, *neisserias*, *pseudomonas*, que tienen propiedades endotóxicas.

Recientemente se han descubierto varias enzimas en *E. coli*, capaces de convertir a los precursores UDP-GlcNAc, R-3-hidroximiristoil-ACP, ATP, CMP-KDO, lauroil-ACP y miristoil-ACP a Re LPS.¹²

El primer paso en la acilación de la UDP-GlcNAc con R-3-hidroximiristato, que es catalizado por la proteína codificada en el gen *lpxA*, la UDP-GlcNAc se sitúa en el punto de bifurcación en el camino metabólico, ya que también se utiliza para la biosíntesis de peptidoglicano. El R-3-hidroximiristoil-ACP se localiza en otro punto de bifurcación, puede ser elongado a palmitoil-ACP e incorporado a los glicerofosfolípidos.

El precursor inmediato para la unidad no reductora de lípido A es UDP-2-3-diacilglucosamina, pero una parte está unida a una pirofosfatasa específica para generar una molécula demasiado inestable llamada lípido X, que es el productor directo del extremo reductor del lípido A. El producto del gen *lpxB* cataliza la formación de disacárido, y después, una cinasa específica incorporada al 4'-monofosfato, generando al lípido IVA, un intermediario que posee algo de bioactividad, por lo que tiene utilidad en la detección de proteínas receptoras de endotoxina en células animales.

Antes de que se complete el lípido A, la enzima codificada por el gen *kdtA* incorpora dos residuos de K do diferentes estereoquímicamente. Por último, se incorpora un residuo de laureato y uno de miristato al extremo no reductor del lípido A.^{12,14,16,18}

La menor variación en la estructura del lípido A modifica sus señales biológicas.

La remoción de todos los ácidos grasos resulta en la pérdida completa de actividad biológica. Además, la ausencia de uno solo de los grupos fosfatos, ya sea en C1 y C4, resulta en una pérdida significativa de toxicidad.

Biosíntesis del O-Polisacárido

Determina la especificidad antigénica de las bacterias y su LPS. Entre las especies y aún entre cepas varían los constituyentes del polisacárido O-específico, pero los miembros de un serotipo tienen al menos uno de los determinantes O-antigénicos en común con miembros de un serogrupo distinto.

El estudio bioquímico del O-polisacárido ha revelado la existencia de una secuencia de 10 a 100 o más unidades oligosacáridas repetitivas compuestas por 3 a 4 monosacáridos. Pueden darse cadenas cortas cuando las condiciones del medio son estresantes, como son temperaturas muy altas, bajo pH, bajos niveles de fosfato o magnesio o altos niveles de sales.

Los monosacáridos que han sido aislados de distintas bacterias son: pentosas, a-aminopentosa, hexosas, 2-aminohexosas, 3,6-desoxihexosas, 6- desoxiazúcares, entre otros. Las bacterias entéricas que producen O-antígenos con un grupo amino altamente hidrofóbico, como dideoxi-azúcares, tienden a ser más patógenos.^{15,17}

Biosíntesis del polisacárido central

Este polisacárido une al lípido A con el O-polisacárido, y es menos variable que el O-polisacáridos entre géneros y especies. Está compuesto por 5 azúcares: amino azúcar (N-acetilglucosamina), glucosa, galactosa, L- glicero-O-manoheptosa, y octosa 2-ceto-3-desoioctonato (K do).

El polisacárido central se separa en dos áreas una externa y una interna. La interna (K do) contiene heptosa, fosfato y ácido 2-ceto-3-desoioctulosónico, el cual, se une covalentemente al lípido A por uniones cetosídicas ácido-débiles.

RECEPTORES

Una gran incógnita que existía era como los LPS hacían contacto con sus células blanco. Se pensaba que era por su actividad anfipática, y se propuso que la interacción era por medio de su vía hidrofóbica del lípido A con los lípidos de las membranas de las células blanco, por lo tanto no existía una especificidad. Pero con estudios que se realizaron posteriormente se ha observado que hay activación selectiva por LPS de linfocitos B, la existencia de mutantes y la identificación de antagonistas a la bioactividad de la endotoxina, la presencia de líneas de ratones que presentaban respuestas inmunológicas y fisiológicas disminuidas a LPS, lo que nos hace pensar que existe algún tipo de receptor específico o receptores en la membrana de las células blanco donde empieza la interacción específica del lípido A.

PROTEÍNA DE UNIÓN A LPS (LBP)

Es una glucoproteína sérica de 60-kDa, presente en condiciones normales en concentración menor a 0.5 µg/ml, y se eleva hasta 50 µg/ml después de una respuesta de fase aguda. Los hepatocitos son los encargados de sintetizar LBP en forma de polipéptido sencillo de 50 kDa y se libera al plasma en forma glucosilada de 60 kDa. Se piensa que la síntesis de LBP por los hepatocitos es controlada por LPS, IL-, TNF, IL-6 y glucocorticoides y que el pretratamiento con LPS predispone a los hepatocitos a responder mediante la síntesis de TNF e IL-1 y LBP

LBP se une al LPS mediante el lípido A, al formarse el complejo LPS-LBP se descubrió que se involucra todavía un receptor para este complejo. Por lo tanto, se ha dicho que las funciones de LBP son opsonización y aumento de la sensibilidad para que los leucocitos reconozcan al LPS y así los monocitos, macrófagos y neutrófilos puedan unirse con afinidad a la estructura dada que esta cubierta por LBP.

CD14

La identificación del receptor CD14 que funciona como tal para el complejo LPS-LBP, es una glucoproteína de 55 kDa. Se puede localizar como una proteína sérica soluble y también puede estar anclada a la membrana de células mieloides a través del glucosilfosfatidilinositol (GPI), participa en la activación de células mieloides, mientras que sCD14 participa en la activación de células no mieloides fibroblastos por ejemplo las células endoteliales.

RECEPTORES (TLR) Toll-like

Receptores homólogos humanos de la drosófila existen y son designados como receptores toll-like ,participan en la respuesta inmune, La familia de los TLR se caracteriza por preservar por conservar su dominio homólogo Toll el cual es esencial para inducir la señal de transducción. TLR2 y TLR 4 son activados en respuesta a la estimulación del lipopolisacárido, el cual resulta en la activación y translocación de NF-kb, esto sugiere que estos receptores pueden estar involucrados en la respuesta inflamatoria.

TLR4

Recientemente se han descubierto otra familia de receptores llamados receptores Toll (toll like receptors) los cuales son cinco y se ha visto que sirven como medio de señalización para los LPS. Toll es un tipo de proteína transmembranaral que cuenta con un sitio extracelular que es rico en leucina y un sitio citoplasmático con una secuencia homóloga al receptor humano de interleucina 1 (IL-1).

Efecto de los lipopolisacáridos sobre las células del periodonto.

Los tejidos gingivales sanos presentan un bajo nivel de expresión de mediadores de la inflamación. La función de la molécula E-selectina, que se encuentra en la superficie del endotelio, facilita la salida de leucocitos del flujo sanguíneo a los tejidos circundantes con el fin de atacar a las bacterias presentes en el sitio de la infección.

La expresión de IL- 8 guía a los leucocitos al sitio de la colonización bacterial. Cuando las bacterias, proteínas y LPS son reconocidos por el huésped en particular mediante la asociación de estas moléculas con los monocitos, la distribución de los leucocitos en los tejidos gingivales aumenta.

En forma similar, las células epiteliales de la encía, que constituyen el primer punto de contacto con los LPS en el periodonto, liberan IL-1.

Las endotoxinas también actúan sobre los fibroblastos gingivales que sintetizan y liberan IL-8 y la proteína quimiotáctica monocítica (MCP-1). Al igual se ha demostrado, que en fibroblastos obtenidos de encías inflamadas, la respuesta a la producción de IL-8 disminuye cuando se tratan a estas células con LPS extraídos de *P. gingivalis*. Los monocitos, son capaces de responder a concentraciones muy bajas de LPS produciendo una amplia variedad de mediadores de procesos inflamatorios que estimulan a otros tipos celulares como los linfocitos y los osteoclastos.

De igual forma, los neutrófilos liberan citocinas en respuesta al tratamiento con LPS, en particular los extraídos de *P. gingivalis* y *Campylobacter jejuni* que son capaces de estimular la producción de IL-1, IL-8 y TNF- α en estas células.

Los LPS, en los macrófagos, promueven la síntesis de IL-1/3, que a su vez estimula a las células no mieloides (endoteliales, epiteliales y fibroblastos) a secretar prostaglandinas y metaloproteinasas, mismas que se encuentran en altas concentraciones en los tejidos periodontales y en particular en el fluido crevicular, con lo que se inicia la destrucción de tejidos de soporte, como el ligamento periodontal y del hueso alveolar.

De los mediadores de los procesos inflamatorios, el más ampliamente caracterizado es IL-1, entre cuyos efectos se encuentra la inducción de la proliferación de células T, degranulación de neutrófilos, liberación de citocinas y prostaglandina E₂ (PGE₂), así como de los fibroblastos gingivales y de los monocitos.^{11,13 18}

4.6.-TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Las células de todos los organismos vivos están provistos de mecanismos de señalamiento que les permiten percibir estímulos ambientales y responder adecuadamente a ellos, el buen funcionamiento de estos asegura que el organismo sobreviva a sus distintos cambios. Es gracias a esta comunicación entre células que el organismo mantiene una funcionalidad como entidad unitaria, como por ejemplo : el desarrollo embrionario, la proliferación y diferenciación celular entre otras. A todas estas interacciones moleculares mediadoras de las respuestas homeostáticas y del desarrollo de los organismos multicelulares se les denomina transducción de señales.⁴³

Pero también es importante saber como actúa cada señal activada para conocer de que manera podemos bloquearla o modificarla.

Las membranas celulares tienen muchos transportadores, existen proteínas transmembranales que transportan nutrientes hacia el interior de las células y productos de desecho hacia el exterior. Las células también pueden poseer proteínas superficiales de membrana (receptores de señales) que presentaran sitios de unión altamente específicos para moléculas extracelulares.

Cuando un ligando externo se une a su receptor específico, la proteína receptora transduce la señal transportadora por el ligando en forma de mensaje intracelular.

MAP KINASAS

Una familia de proteínas cinasas superior de las MAP cinasas ha sido identificado. El prototipo miembro de esta familia, ha sido designado MAP cinasa cinasa, o MEK-1, específicamente fosforila a las MAP cinasas regulada por residuos de treonina y tirosina, presentes en los aminoácidos (Thr-Glu-Tyr).

Refiere una cascada de proteínas que desempeña un papel importante en la transducción de señales. El elemento central de la vía es una familia de proteínas quinasas treonina-serina llamada MAP quinasa por sus siglas en inglés (mitogen-activated protein kinases) y son activadas en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares. En los mamíferos regula el crecimiento celular y la diferenciación, motivo por el cual se les denominó proteínas quinasas activadas mitogénicamente.^{43,44,45}

ERK 1, ERK 2

La activación de rutas por factores de crecimiento, hormonas, y neurotransmisores es mediada a través de dos MAP cinasas, p44 y p42, las cuales se les denomina Erk 1 y Erk 2 respectivamente. Ambas proteínas son reguladas por una fosforilación dual en sitios específicos de tirosina y treonina.

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.^{46,47}

ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (quinasa regulada por señal extracelular) es activada en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares.

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. ERK es una de las MAP quinasa mejor caracterizada en las células de los mamíferos, su activación de ERK. Su activación es mediada por dos proteínas quinasa intermedias, las cuales se acoplan con factores de crecimiento, son RAS y RAF.⁴⁵

P38

Es una proteína, es el tercer miembro de la familia MAPK, también se le conoce como SAPK2/RK o quinasa reactiva o quinasa activada por estrés de peso molecular de 38 kDa 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. Ha sido caracterizada en fibroblastos, en células del sistema nervioso en células epiteliales, en plaquetas.

La asociación de LPS a CD14 induce una rápida fosforilación de proteínas de la ruta de señales de MAP cinasa, y en particular induce la fosforilación de una proteína de 38 kDa, designada p38 y representa a un miembro de la familia de las map Cinasa.⁴³

AKT

Es una serina/treonina cinasa que se fosforila en residuos de tirosina 308 y serina 473 para su activación. También se conoce por el nombre de proteína cinasa B y se activa en respuesta a varios estímulos por un mecanismo que involucra a la enzima fosfoinosítido 3-cinasa PI-3K.

Las fosforilación de estas cinasas regula una extensa variedad de procesos celulares involucrados en la respuesta mitogénica, incluyendo la síntesis de proteínas.⁴⁷

4.7.-FLAVONOIDES

Definición.-

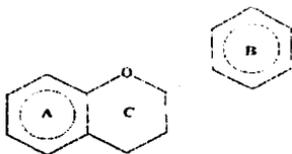
Pertencen a el grupo más amplio de los fenoles naturales se encuentran tanto en estado libre o glicosilado químicamente, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal , cuentan con una diversidad estructural, proporcionan el sabor y color de algunas frutas y plantas. Se han encontrado mas de 4000 diferentes miembros de los flavonoides y pueden ser clasificados dentro de 5 categorías (flavonas,flavanolas,flavanonas,flavanolonas y antoniacidinas).^{20,21}

Son considerados importantes elementos en la dieta humana, se estima que el consumo diario de flavonoides es de 1g diario en una dieta balanceada ²². Se pueden encontrar en frutas, vegetales y algunas bebidas tales como: vino tinto, café, cerveza, etc.²³

Estructura

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, derivado de la cadena policetídica, un anillo B, derivado del ácido shikimico, tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano. Por eso se les conoce como C6-C3-C6. (Fig 8)

La estructura puede conformar un heterociclo (y-pironas) que son los más abundantes, o puede formar una cadena . Las polimerizaciones son frecuentes, y ocurren principalmente por uniones carbono-carbono (C-C). El estado de oxidación del anillo central determina varios grupos estructurales, y esto les proporciona diferentes actividades biológicas.^{24,25,26}



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig 8.-Estructura general de un flavonoide. Tomada de The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. Ann. NY Acad. Sci.

Biosíntesis de Flavonoides

Los flavonoides son biosintetizados por una combinación de ambas vías biosintéticas, la vía del ácido shikímico y la del ácido malonil-CoA. El compuesto obtenido por la vía biosintética del ácido shikímico, por ejemplo el ácido cinámico, es luego utilizado como compuesto de partida para la vía del malonil-CoA, en la cual se le adicionan tres acetatos. Con la posterior ciclación se obtiene la estructura clásica de los flavonoides, en la cual el anillo A se formó por la vía del malonil-CoA, mientras que el anillo B se formó por la vía del ácido shikímico, y el puente de tres carbonos proviene de la adición de fosfoenolpiruvato. Con sucesivas hidroxilaciones y reducciones se forman los diferentes estructuras de flavonoides, con la opción de una glicosidación final.

El estudio de los compuestos fenólicos (flavonoides) , ha sido del interés de científicos durante décadas, debido a su importancia en la fisiología de plantas, especialmente porque les dan el color y el sabor que tienen, así como contribuyen a su crecimiento y reproducción, también les proporcionan resistencia y protección^{27,28}

Recientemente se ha incrementado el interés por aplicar los beneficios de los flavonoides como agentes antioxidantes, en la regulación de la actividad enzimática y eliminando radicales libres.³⁰ Por este motivo se ha explorado la posibilidad de utilizarlos como antibióticos o antiinflamatorios, en el tratamiento de varias enfermedades. Estos efectos se han atribuido a su influencia sobre el metabolismo del ácido araquidónico.³¹

Tienen un amplio rango de actividades terapéuticas como :antioxidantes, antialérgicas, antiangiogénicas, antihepatotóxicas, antiosteoporosis, proporcionan protección vascular y propiedades antivirales. Tienen actividades el tracto gastrointestinal como: antiúlceras, antiespasmos, actúan como agentes antidiarreicos. Tienen buena actividad antiinflamatoria, antitumoral.¹⁹

Entre otras actividades los flavonoides inhiben la vía de tirosina y algunas serina-cinasas^{32,33} esto lo realizan por competencia de asociación al sitio de hidrólisis del ATP.³³

Dos grupos han reportado la capacidad de algunos flavonoides como quercitina y el resveratrol en la disminución de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- α) , cuando las células son tratadas con lipopolisacáridos .^{35,34}

Entre otras funciones inhiben el crecimiento de células tumorales, inducen la diferenciación celular, y evitan la metastasis, estas funciones se han demostrado en experimentos *in vitro*.³⁷ Así como también inhiben a los lípidos y a algunas serina-treonina-cinasas como la fosfatidilinositol 3-cinasa y a la proteína cinasa C.³⁶

4.7.1.-LUTEOLINA

Es un flavonoide que se clasifica como una flavona que frecuentemente se encuentra en forma glucosilada en altas concentraciones en el pimiento verde, apio, manzanilla , y en algunas semillas.³⁸

Es uno de los más potentes y eficaces flavonoides para inhibir el incremento del factor de necrosis tumoral (TNF- α), Interleucina-6, y la acciones de los lipopolisacáridos así como la expresión de óxido nítrico. Tiene la capacidad de bloquear la activación de Nf- κ B , cuando esta es inducida por lipopolisacáridos.

Un grupo de investigadores ha reportado la capacidad de luteolina para inhibir la toxicidad y la expresión de moléculas proinflamatorias inducidas por lipopolisacáridos en ensayos realizados *in vivo* e *in vitro*.^{33,34}

Interviene en la disminución de la activación de las MAP en macrófagos tratados con lipopolisacáridos.³²

Actúa efectivamente inhibiendo un amplio rango de proteínas cinasas, también tiene en efecto como agente anticancerígeno, y antimetastasis, bloquea la actividad de PI3K y la fosforilación de Akt .^{31,35}

5.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-

El origen de la enfermedad periodontal está asociada a un grupo de infecciones que provocan la inflamación de la encía que en severos casos se acompaña de pérdida ósea alveolar y la pérdida de dientes.

La placa bacteriana es un factor etiológico determinante en el desarrollo de la enfermedad periodontal, ya que se compone de microorganismos que favorecen su desarrollo; por lo tanto es importante eliminar la existente y controlar su aparición.

Durante el proceso de infección los lipopolisacáridos bacterianos actúan sobre los fibroblastos gingivales humanos en donde realizan la activación de un gran número de vías de señales intracelulares, una de estas vías se produce por la activación de tirosina-cinasas y la promoción de procesos inflamatorios que de no ser controlados conducen a la destrucción del hueso alveolar.

Es por este motivo que es importante el diseño de fármacos que permitan el control de los eventos inflamatorios por lo tanto en esta investigación se estudiarán los efectos de la luteolina sobre la inhibición en la fosforilación de quinasas activadas por lipopolisacáridos.

6.-JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades periodontales afectan en gran medida el aparato de inserción dental, tomando en cuenta que estas enfermedades son causadas por agentes microbianos como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, entre otros.

En esta investigación se caracterizó si el flavonoide luteolina, tiene la capacidad de bloquear los mecanismos de acción de los lipopolisacáridos en los fibroblastos gingivales humanos estimulados con lipopolisacáridos, se ha demostrado en estudios recientes realizados en macrófagos que luteolina inhibe la expresión de moléculas proinflamatorias inducidas por lipopolisacáridos, así mismo induce la fosforilación de ERK1 y ERK2 miembros de la familia de las MAP cinasas. De igual modo determinar si luteolina puede inducir la fosforilación de ERK1 y ERK2, en los fibroblastos gingivales humanos.

El tratamiento de la enfermedad periodontal podrá mejorar en la medida en que se conozcan mas sustancias capaces de bloquear y disminuir las acciones de los lipopolisacáridos.

7. HIPOTESIS.-

Hipótesis verdadera :

Si los lipopolisacáridos son agentes promotores de procesos inflamatorios además si los fibroblastos gingivales son tratados con luteolina que presenta actividades antiinflamatorias, entonces se bloquearán las acciones de los lipopolisacáridos.

Hipótesis falsa:

Si los fibroblastos gingivales humanos se tratan con el lipopolisacárido y se preincuban con luteolina, este flavonoide no tendrá participación para bloquear los efectos de los lipopolisacáridos.

8.-OBJETIVOS

8.1.-OBJETIVO GENERAL

El propósito de este proyecto consiste en saber si el flavonoide luteolina es capaz de bloquear los efectos de los lipopolisacáridos, sobre la activación de cinasas mediadoras de señales de transducción en fibroblastos gingivales humanos.

8.2.-OBJETIVO ESPECIFICO

Bloquear los efectos de los lipopolisacáridos en los fibroblastos gingivales humanos.

9.-TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo, Prospectivo, Experimental

10.- MATERIAL Y METODOS

Equipo

- Balanza GA200 (OHAUS)
- Cajas de cultivo celular de 6 pozos (COSTAR)
- Cámara de Electroforesis vertical (HOEFFER)
- Cámara de transferencia (HOEFFER)
- Campana de flujo laminar (NUAIRE)
- Centrifuga MC12 (SORVALL)
- Gradilla para tubos de ensaye (NALGENE)
- Gradilla para tubos eppendorf (NALGENE)
- Incubadora (NUAIRE)
- Matraz (PYREX)
- Microscopio de objetivos invertidos CK2 (OLYMPUS)
- Orbit Shaker (LABLINE)
- Pipetas de 5-40µl, 20-200µl, 40-200µl, 200-1000µl (FINNPIPETTE)
- Potenciómetro Pinnacle 530 (CORNING)
- Tubos de ensaye (PYREX)
- Tubos Eppendorf (EPPENDORF)
- Vasos de precipitado (PYREX)
- Vortex Genie-2 (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

Reactivos.-

- Acrilamida (SIGMA)
- Antibiótico-Antimicótico (GIBCO BRL)
- Anticuerpo Mouse Monoclonal IgG. Phospho ERK(Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo Rabbit Polyclonal IgG. Phospho ERK(Santa Cruz Biotechnology)
- Glicina (BAKER)
- Kit de Quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology)
- Luteolina (SIGMA)
- Marcador de peso molecular (BIO-RAD)
- Medio de cultivo DMEM (GIBCO BRL)
- Membrana de Nitrocelulosa (BIORAD)
- Solución Salina Balanceada de Hanks (GIBCO BRL)
- Suero bovino fetal (GIBCO)
- Temed (BAKER)
- Tripsina (GIBCO)
- Trisma-base (SIGMA)
- Tween (SIGMA)

CULTIVO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES.-

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron a partir de muestras de encía de pacientes que acuden a la clínica de exodoncia de la facultad de odontología de la UNAM, para realizarles extracción de terceros molares y que al realizar la historia clínica no reportaron tener o haber padecido enfermedades crónicas y sistémicas.

Las células se obtuvieron de tejido gingival, durante la extracción quirúrgica de terceros molares. Se realizaron explantes de tejido se trataron con tripsina con los que se generó el cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos. Las células se aislaron y crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal, adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico en atmósfera húmeda y en presencia de una mezcla de 95% aire y 5% de CO₂ a 37°C.

Para los ensayos las células se utilizarán entre los pases 3-5 en un medio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) libre de antibiótico- antimicótico.

ANALISIS MEDIANTE LA TECNICA WESTERN BLOT

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^4 cel/ml) se crecieron, en cajas de 6 pozos durante 24 hr. Posteriormente se ayunaron las células durante 4 hr. Se trataron a diferentes dosis y tiempos con los lipopolisacáridos. Al término de la reacción las células se recuperaron mediante la técnica de raspado y se resuspendieron en buffer de fosfatos salino y 1 m M de ortovanadato de sodio. Las muestras se centrifugaron a 4°C y se resuspendieron en buffer de lisis (0.05 m M Tris-HCL, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet p-40, 0.5 PMSF, 10 µg/ml Leupeptina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 0.4 m M ortovanadato de sodio, 10 m M fluoruro de sodio) las muestras se sonicaron 1 segundo en 30 niveles de amplitud y se realizó la cuantificación de proteínas a través de la técnica de Lowry. Se tomaron 50µg de proteína y se separaron en un gel de acrilamida-SDS al 10 %. Las muestras se transfirieron 40 mA durante 4 hrs en membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó en buffer 100 mM Tris-150 mM NaCl pH 7.0 y 5 % de albúmina de suero bovino. Las muestras se incubaron con primer anticuerpo anti-fosfo ERK 1/2 (1:1000) a 4°C durante toda la noche. Las membranas se lavaron en tres ocasiones con 50 mM NaCl Tween, Tris 100 mM pH 7.5, y se incuban con el 2do anticuerpo monoclonal anti-ratón (1:1000) durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se desnudaron y trataron con anti-ERK total (10:1000) y con el segundo anticuerpo antri-rabbit (10:1000). La reacción se revela mediante el kit de quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnology.

11.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

(Registro y Procedimiento)

Los experimentos que se llevaron a cabo, se realizaron en cinco ocasiones por separado, se colocó un experimento representativo el análisis se realizó con el sistema Labs-work. Se obtuvo la media \pm error estándar.

12.-RESULTADOS

12.1 Curso Temporal de la acción de luteolina sobre la fosforilación de ERK inducida por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos.

Con la finalidad de determinar si la luteolina bloquea la acción de los lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos, se preincubaron los fibroblastos gingivales humanos con luteolina y posteriormente se trataron con el lipopolisacárido (1µg/ml) a diferentes tiempos. La fosforilación se detectó mediante ensayos Western blot. Encontramos en nuestros experimentos que el tratamiento con LPS por 15 minutos promueve un incremento en la fosforilación de ERK 1/2 al preincubar con luteolina a diferentes tiempos encontramos que a los 15 minutos de preincubación con luteolina se promueve una disminución en la fosforilación de ERK 1/2 y la disminución máxima se obtiene a los 60 minutos de tratamiento.

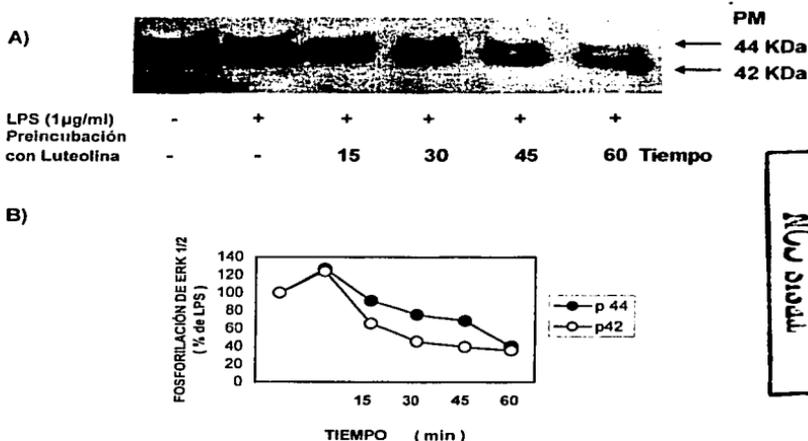


Figura 1. Curso temporal de la acción de luteolina sobre la fosforilación de ERK1/2 estimulada por LPS en fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron hasta la subconfluencia en cajas de 6 pozos y se ayunaron durante 24 horas en DMEM libre de SBF y se trataron con LPS (1µg/ml) durante 15 minutos: A) Control B) LPS; C-D Se preincubaron a diferentes tiempos con luteolina C) 15min D) 30min E) 60min F) 90min. Al término del tratamiento se cuantificó la proteína se separó en un gel de archilamida-SDS al 10% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa las muestras se procesaron mediante la técnica Western-blot. B) Análisis densitométrico de la acción de luteolina en fibroblastos gingivales humanos.

12.2 Efecto de luteolina sobre la dosis de LPS en fibroblastos gingivales humanos.

Con el propósito de determinar la dosis de LPS que bloquea la dosis del flavonoide luteolina, se realizó este experimento de tipo dosis-respuesta. Se trataron los fibroblastos gingivales a diferentes dosis del LPS durante 15 minutos y se preincubaron con luteolina (10 μ M) durante 150 minutos. Las muestras se analizaron mediante ensayos de Western-blot. Encontramos que el bloqueo de la acción de los lipopolisacáridos es evidente desde 0.1 μ g/ml y hasta 100 μ g/ml, después de 15 minutos de tratamiento.

Nuestros resultados muestran que la luteolina inhibe la fosforilación de ERK 1/2 en el rango de 0.01 a 1 μ g/ml de tratamiento con LPS.

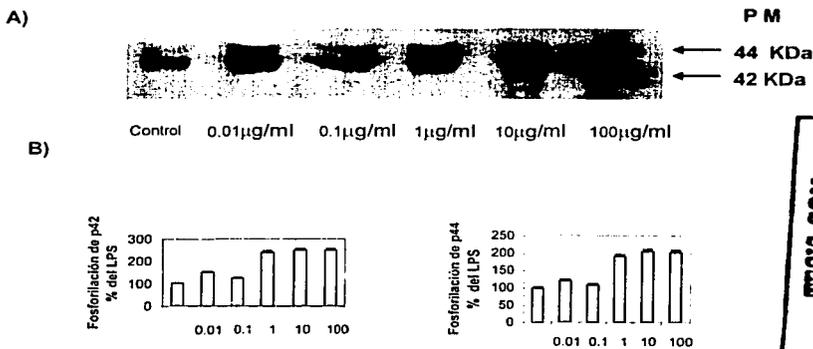


Figura 2. Dosis-Respuesta al efecto de luteolina sobre la dosis de LPS en fibroblastos gingivales humanos. Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron hasta la subconfluencia en cajas de 6 pozos y se ayunaron durante 24 horas en DMEM libre de SBF y se trataron a diferentes dosis del LPS: A) Control B) 0.01 μ g/ml C) 0.1 μ g/ml D) 1 μ g/ml E) 10 μ g/ml F) 100 μ g/ml. Las muestras se preincubaron con luteolina (10 μ g/ml) durante 15 minutos. Al término de esto se cuantificó la proteína se separó en un gel de archilamida-SDS al 10% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se procesaron mediante la técnica Western-blot. B) Análisis densitométrico de la actividad de luteolina sobre fibroblastos gingivales.

12.3.-Efecto de luteolina sobre la actividad de p-p38, estimulado por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos.

Este experimento se realizo para determinar a que dosis de luteolina tiene actividad sobre la proteína p-38, para realizar este experimento se preincubaron las células a diferentes dosis de luteolina por 30 minutos.

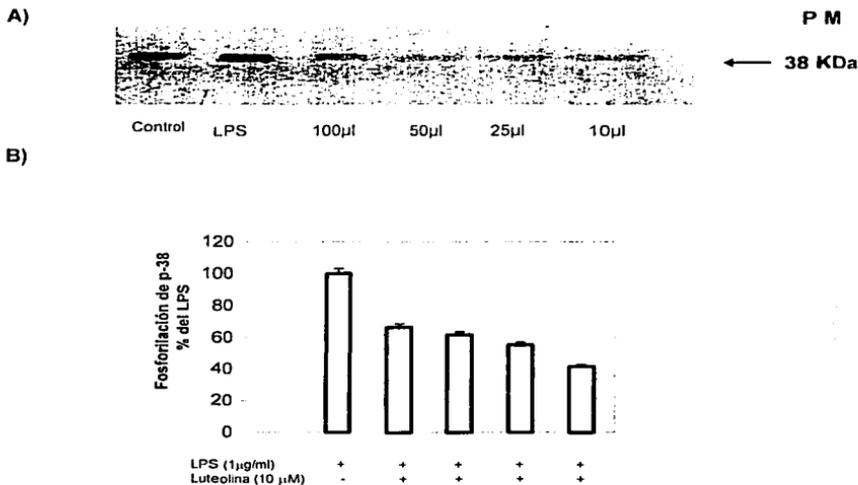


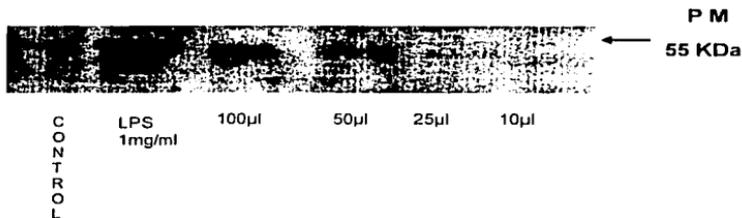
Fig3. Efecto de luteolina sobre la fosforilación de p38 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con LPS.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron hasta la subconfluencia en cajas de 6 pozos y se ayunaron durante 24 horas en DMEM libre de SBF y se trataron con diferentes dosis durante 30 minutos: 1) Control 2) LPS (1 µg/ml) 3) 100µl 4) 50 µl 5) 25 µl 6) 10 µl. Las muestras representan la media ± error estándar.

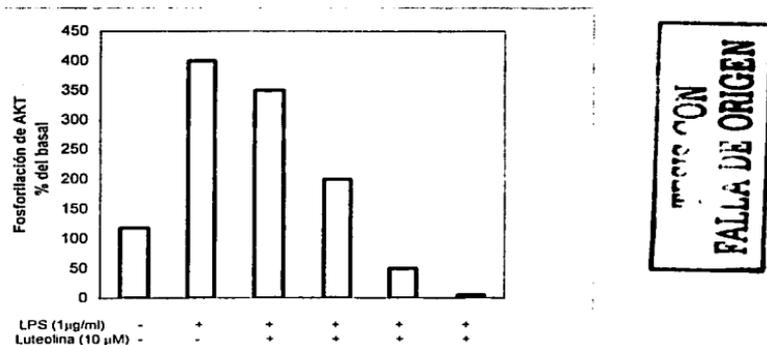
12.4.-Efecto de luteolina sobre la actividad de AKT, estimulado por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos.

Este experimento se realizo para determinar a que dosis de luteolina tiene actividad sobre la proteína AKT, para esto se preincubaron las células a diferentes dosis de luteolina por 30 minutos.

A)



B)



mas con FALLA DE ORIGEN

Fig4. Efecto de luteolina sobre la actividad de AKT, estimulado por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos. Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron hasta la subconfluencia en cajas de 6 pozos y se ayunaron durante 24 horas en DMEM libre de SBF y se trataron con diferentes dosis durante 30 minutos: 1) Control 2) LPS 3) 100µl 4) 50 µl 5) 25 µl 6) 10 µl y se procesaron mediante la técnica Western- blot.

13.-DISCUSION

Este estudio fue realizado en fibroblastos gingivales humanos. La enfermedad periodontal es la mayor causa de pérdida dental en los adultos, se caracteriza comúnmente por ser una enfermedad que presenta inflamación crónica causada por bacterias gram-negativas. Recientes estudios han demostrado la disminución de moléculas proinflamatorias inducidas por lipopolisacáridos en macrófagos por acción de los flavonoides.^{33,37} Seguido de esto se presentan reacciones inmunológicas e inflamatorias con la posterior pérdida dental.⁴⁰

Los fibroblastos gingivales humanos, los cuales son el mayor constituyente del tejido conectivo gingival, pueden interactuar directamente con los productos bacterianos en la enfermedad periodontal incluido el LPS. Esto nos sugiere que los fibroblastos gingivales juegan un papel importante en la respuesta del huésped a los lipopolisacáridos en la enfermedad periodontal, así como en la remodelación del tejido periodontal.

Los lipopolisacáridos se encuentran presentes en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Para identificar que los flavonoides pueden actuar sobre las acciones de los lipopolisacáridos, utilizamos la línea celular de fibroblastos gingivales humanos, hallazgos similares han sido obtenido en estudios realizados en macrófagos.⁴¹

Recientes estudios han demostrado que los flavonoides tienen distintas propiedades benéficas para el organismo, así como se ha demostrado que luteolina es el más potente de los flavonoides para: inhibir el incremento del factor de necrosis tumoral (TNF- α), Interleucina-6, y las acciones de los lipopolisacáridos así como la expresión de óxido nítrico.¹⁸

Con el propósito de establecer si el flavonoide, luteolina tiene la capacidad de disminuir y bloquear la acción de los lipopolisacáridos. Se trataron los fibroblastos gingivales humanos con el lipopolisacárido (1 μ g/ml) a diferentes tiempos y se preincubó los fibroblastos con luteolina (10mM). La fosforilación se detectó mediante ensayos Western blot. Encontramos en nuestros experimentos que al tratamiento con tiempos desde 15 minutos la disminución de la actividad de los lipopolisacáridos es evidente y disminuye a tiempos menores.(Fig1). Luteolina disminuye la actividad de los lipopolisacáridos desde tiempos cortos de 15 minutos y hasta 30 minutos se observa la actividad de luteolina y después empieza a declinar la respuesta a los 60 minutos. Así mismo se observan dos proteínas de peso molecular aproximado p-44-42 kDa.

Feng. Observa que a el tratamiento en otros tipos celulares con el LPS se activan vías de los miembros de las MAP cinasas.⁴¹ Para determinar a que dosis actúa luteolina, se realizó una dosis-respuesta. Se trataron los fibroblastos gingivales a diferentes dosis durante 15 minutos. Se detectó mediante ensayos Western-blot.(Fig2)

Encontramos que el bloqueo de la acción de los lipopolisacáridos es evidente desde 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y hasta 100 $\mu\text{g/ml}$, después de 15 minutos de tratamiento.

Para observar que efecto tenía luteolina sobre la fosforilación de Erk1 y Erk 2 se realizó un curso temporal midiendo el efecto de luteolina y herbimicina y se utilizaron a la concentración de 10 μl . Los fibroblastos se trataron con el lipopolisacárido 10 $\mu\text{g/ml}$. (Fig3)

El pretratamiento de células con luteolina disminuye la actividad de los lipopolisacáridos, y se induce la fosforilación de los miembros de las MAP cinasas ERK1 y Erk 2.

Para determinar a que dosis de luteolina tiene actividad sobre la proteína p-38, para realizar este experimento se preincubaron las células a diferentes dosis de luteolina por 30 minutos. Y en los resultados observados, mostraron que luteolina actúa mas efectivamente desde 10 $\mu\text{g/ml}$.(Fig4)

En otro experimento se observó que luteolina tiene actividad sobre la proteína Akt, se preincubaron las células a diferentes dosis de luteolina por 30 minutos. Y en los resultados observados, mostraron que luteolina actúa mas efectivamente desde 10 $\mu\text{g/ml}$.(Fig4)

14.-CONCLUSIONES

La exposición de los fibroblastos gingivales a los lipopolisacáridos , incrementa la fosforilación de Erk 1 y Erk 2 en un curso temporal y una dosis respuesta.

Nosotros sugerimos que luteolina interfiere con la señal de LPS, por reducción de la activación de Erk.

El pretratamiento de las células con luteolina disminuye la activación de los lipopolisacáridos e induce la estimulación de Erk 1 y Erk 2, p-38.

Al tratamiento de los fibroblastos con el LPS, estimula la cascada de señalización MAPK, la activación de Erk 1 y Erk 2 es un evento temprano que sucede a los pocos minutos de tratar con el LPS

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

15.-BIBLIOGRAFÍA

1. Carranza Fermín A, Newman Michael G. Periodontología Clínica 9ª Edición Editorial McGraw-Hill Interamerica 2002.
2. Lindhe Jan. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana 2000.
3. Genco, J. Robert Peridoncía Editorial Interamericana Mc-Graw-Hill. Vol. 1 num México 1993.
4. Mark Bartold, Laurence J. Walsh & A. Sampath Narayanan. Molecular and cell biology of the gingival Periodontology 2000, Vol. 24, 2000, 28-55.
5. Moon-II Cho & Phllias R. Garant. Development and general structure of the periodontium. Periodontology 2000, Vol. 24, 2000, 9-27.
6. Liébana Urefia J. Microbiología Oral. Edit. Mc. Graw- Hill Interamericana. México 1997.
7. Gary C. Armitage . Classifying periodontal diseases a long standing dilemma. Periodontology 2000, Vol. 30, 2002, 9-23
8. Agustín Zerón . Nueva clasificación de las enfermedades periodontales. Vol. LVIII, No.1 Revista Asociación Dental Mexicana. Ene-Feb 2001 pp 16-20.
9. The American Academy of Periodontology. Annals Vol. 4, International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions. Vol. 4 No.1, 1999.
10. Carolina Higashida-Guero, Gloria Gutiérrez-Venegas. Lipopolisacáridos: Extraordinarias moléculas activadoras de señales de transducción celular. BEB 18(1); 1998:28-35.
11. Moore W y Moore L The bacteria of periodontal diseases. Periodontology 2000. 1994;(5):66-77.
12. 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.
13. Fujikawa T, Ogawa T, Sobue S, y Hamada S. Chemical immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from bacteroides gingivalis strains. J. Gen. Microbiol. 1990;(136): 319-326.

14. Gemmel E, Walsh L y Savage N . Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J. Periodontal Res.* 1994;(29): 46-53
15. Talan DA. Recent development in our understanding of sepsis, evaluation of anti-endotoxin antibodies and biological response modifiers. *Ann Emerg Med* 1993; 22(12): 1871-1890.
16. Wyckoff TJO, Raetz CRH, Jackman JE. Antibacterial and antiinflammatory agents that target endotoxin. *Trends in Microbiology.* 1998; 6(4): 154-159.
17. Jackson JJ, Kropp H. Differences in mode of action of beta-lactam antibiotics influence morphology, LPS release and in vivo antibiotic efficacy. *J Endotoxin Res* 1996; 3(3): 201-218.
18. Mercer-Jones MA. Continuous antibiotic treatment for experimental abdominal. Sepsis: Effects on organ inflammatory cytokine expression and neutrophil sequestration. *British Journal of Surgery* 1998; 85(3): 385-389.
19. Mausumee Guha, Nigel Mackman* LPS induction of gene expression in human monocytes Review Article *Cellular Signalling* (13);2001 85:9.
20. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. NY Acad. Sci.* . 1998; (854):435-42
21. Pelzer LE, Guardia T, Osvaldo Juarez A, Guerreiro E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco* 1998; (53) 421-424.
22. Cunningham BD, Thredgrill MD, Groundwater PW, Dale IL and Hickman JA . Synthesis and biological evaluation of a series of flavones designed as inhibitors of protein tyrosine kinases. *Anticancer Drug Des ;* 1992 (7)365-384
23. Graziani Y, Erickson E and Erickson RL . The effect of quercitin on the phosphorylation of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo. *Eur J Biochem* 1983;(135):583-589.
24. Ferriola PC, Cody V and Middleton EJ Protein kinase C inhibition by plant flavonoids, Kinetics mechanism and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1989;(38):1617-1624
25. Kawada N, Seki S, Innoue M and Kuroki T . Effect of antioxidants, reversatol, quercitin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cell and Kupffer cells. *Hepatology* 1998; (27):1265-1274.

26. Wadsworth TL and Koop DR. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol* 1999;(57):941-949.
27. Pelzer LE, Guardia T, Osvaldo Juarez A, Guerreiro E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco* 1998; (53) 421-424.
28. Bravo LB. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998;(56):317-33
29. Julie A. Ross^{1,2} and Christine M. Kasum. Dietary flavonoids : Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety *Annu. Rev. Nutr.* 2002;(22):19-34
30. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. NY Acad. Sci.* . 1998; (854):435-42
31. Giuseppina Mattace Raso, Rosaria Meli, Giulia Di Carlo, Maria Pacilio, Raffaele Di Carlo . Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J77A1. *Life Sciences* 2001;(68): 921-931.
32. Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economidou, M., Fotsis, T. & Roussos, C. . Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and pro-inflammatory cytokine production in macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001;(296):181-187.
33. Kotanidou, A., Xagorari, A., Bagli, E., Kitsanta, P., Fotsis, T., Papapetropoulos, A. & Roussos, C. . Luteolin reduces LPS-induced lethal toxicity and expression of pro-inflammatory molecules in mice. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2002;(165):818-823.
34. T. Huang, J.J. J. Hwang, P. Lee, F. C. Fe. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *British Pharmacology* 1999 128:999-1010.
35. Angeliki Xagorari, Charis Roussos, Andreas Papapetropoulos. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by flavonoid luteolin. *British Journal of Pharmacology* 2002;(136):1058-1064 .
36. Gamet-Payrastrre, L. Manenti, S. Gratacap. M.P. Tulluiez. Inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen. Pharmacol.* 2000 ; 32, 279 ; 286.

37. Anastasia Kotanidou, Angeliki Xagorari, Eleni Bagli. Luteolin Reduces Lipopolysaccharide-induced Lethal Toxicity and Expression of Proinflammatory Molecules in Mice. *American Journal Respiratory Critical Care Medical* 2002;(165):818-823.
38. Marelle G. Boesrma, Hester van der Woude, Jan Bogaards. Regioselectivity of Phase II Metabolism of Luteolin and Quercetin by UDP-Glucuronosyl Transferases. *Chemical Research Toxicology* 2002;(15): 662-670 .
39. Joichiro Hayashi, Tamami Masaka, Ichiro Saito, and Isao Ishikawa. Soluble CD14 Mediates Lipopolysaccharide-Induced Intercellular Adhesion Molecule 1 Expression in Cultured Human Gingival Fibroblasts. *Infection and Immunity*. Dec. 1996, p. 4946-4951 Vol. 64, No. 12
40. Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Waehaelae K, Montesano R and Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Research* 1997 57:2916-2921.
41. Feng, G.J. Goodridge, H.S., Hamett, M.M. , Wei, X.Q. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase. 1999:Vol 45. 78-85
42. R. Marais, C.J. Marshall. Control of the ERK MAP Kinase Cascade by Ras and Raf. *Cell Signalling*. Volume 27 101-127. 1996
43. Hans J. Schaeffer And Michael J. Weber *Molecular and Cellular Biology Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers*. Apr. 1999, p. 2435-2444 Vol. 19, No. 4
44. Monick M. Martha, Carter Brent A. Robeff K. Pamela, Flaherty M. Dawn . Lipopolysaccharide Activates Akt in human alveolar macrophages Resulting in Nuclear Accumulation and Transcriptional Activity. *The Journal of Immunology*, 2001 166: 4713-4720.