

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**“EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA ACTIVACIÓN DE  
TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN FIBROBLASTOS GINGIVALES  
HUMANOS”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
CIRUJANA DENTISTA**

**PRESENTA:**

**ARROYO CRUZ SANTA RITA**

**TUTOR: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS**

**MÉXICO, D.F.**

**2006**



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.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas para formarme profesionalmente, por brindarme toda la grandeza de su institucionalidad y por ser parte de sus universitarias.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por compartir sus conocimientos conmigo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su valiosa amistad y por confiar en mí, todo ello para que esta tesis fuera una realidad. Por sus consejos para mi formación profesional y personal para asumir decisiones importantes en la vida.

Al Dr. Javier de la Fuente Hernández, por su tutoría desde el inicio de mi formación en la Facultad de Odontología.

A mis mamás (Socorro y Lorenza) por su amor incondicional, comprensión, apoyo, tiempo y por enseñarme a no rendirme nunca a pesar de todas las adversidades.

A mi hermano, hermanas y su familia por ser un respaldo fundamental en todo lo que decidí, por su ayuda, por su cariño y por ser cada uno de ellos ejemplos a seguir como seres humanos y profesionistas.

A la Dra. Leticia Rodríguez Gutiérrez y a su esposo Manuel Oliveros Reséndiz por la confianza que de manera incondicional me han brindado.

A todos mis profesores que compartieron conmigo sus conocimientos y sobre todo su experiencia. Al Dr. Gabriel Loranca Fragoso, por permitirme reconocer que en la Odontología el esfuerzo máximo siempre nos va a proveer de satisfacción, necesaria para seguir creyendo en el compromiso y responsabilidad con esta profesión. Por sus consejos y por confiar en mí.

A mis amigos del laboratorio de Bioquímica: Silvia, Miguel, Perla por su tiempo, su experiencia y sus consejos, porque hemos aprendido a reconocernos como amigos en todo el tiempo que compartimos el mismo espacio, y por darme la confianza de que estarán siempre, cuando se requiera compartir más cosas que solo el trabajo.

A todos mis amigos: Mireya, Gloria, Irma, Liber, Ana, Emir, Miguel, Cristian... por su compañía, por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas, por brindarme sus palabras de aliento cuando han sido necesarias, a todos los que integramos el grupo 02 por haber hecho de esta grandiosa etapa parte fundamental de mi vida.

A las personas que se han cruzado en esta etapa de formación profesional y de mi vida por su confianza y su apoyo.

## DEDICATORIA

A ustedes (Socorro y Lorenza) que son fundamentales en mi vida, por ser incondicionales, por enseñarme que en la vida cuando todo lo das por la otra persona solo demuestras el eterno amor que se puede brindar, por su ejemplo para afrontar los momentos difíciles, por permitirme reconocerme orgullosa, como su hija... por ser todo eso y más GRACIAS infinitas.

A ti, Papá por permitirme reconocer a tiempo que las acciones se deciden oportunamente y que se afrontan con responsabilidad, para darle el valor real a las cosas. Gracias por tu amor.

A ti hermanito (Mario), a mis hermanitas ( Paty, Gaby, Chayo) por ser ejemplos de vida y por creer y dejarme creer que los sueños que tenemos con esfuerzo se pueden lograr, por su cariño, por su paciencia y por su fortaleza, para continuar formando a esos "pequeños" seres humanos (Montse, Ceci, Sebas, Frida, Tona y Emma) que me hacen tan feliz.

## ÍNDICE

<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1. Abreviaturas	3
2. Resumen	4
3. Antecedentes	5
4. Introducción	
4.1. Periodonto	9
4.2. Agentes blanqueadores de uso dental	19
4.3. Especies reactivas de oxígeno en los sistemas biológicos	23
4.4. Señales celulares y vías de transducción	26
5. Planteamiento del problema	35
6. Justificación del estudio	36
7. Hipótesis	37
8. Objetivos	
Objetivo general	38
Objetivo específico	38
9. Tipo de estudio	38
10. Material y Métodos	39
11. Análisis de resultados y métodos estadísticos	45
12. Resultados	46
13. Discusión	61
14. Conclusiones	65
15. Bibliografía	66

## 2. RESUMEN

Sin duda alguna, en los últimos años las terapias utilizadas en la odontología estética han sido parte fundamental para la atención integral de los pacientes que acuden al dentista no sólo para fines curativos o preventivos sino también para una mejor apreciación visual de su cavidad bucal. En esta perspectiva es importante considerar como una terapia comúnmente utilizada en la odontología estética, el sistema de blanqueamiento dental aplicado tanto en presencia de vitalidad pulpar como en ausencia de la misma. El agente utilizado para el logro de estos fines ha sido desde muchos años atrás el peróxido de hidrógeno, siendo éste no sólo el fin único de su uso en odontología, sino también como un agente hemostático y antibacterial en cirugía bucal y periodontal, de ahí la importancia de sus características y de sus efectos adversos como promotor de inflamación producida por stress oxidativo.

El stress oxidativo es capaz de estimular una variedad de señales de transducción celular en respuesta a un evento inflamatorio. Uno de los sistemas de transducción más estudiados en los últimos años es el de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) que esta integrada por ERK, JNK y p38; su importancia radica en su intervención en una variedad de respuestas celulares como expresión de genes, movimientos celulares, mitosis, metabolismo y apoptosis. Estudios previos con peróxido de hidrógeno han demostrado su capacidad para estimular la fosforilación en ERK1/2 en fibroblastos gingivales humanos.<sup>11,12</sup>

En este trabajo se estudió la fosforilación y activación de la proteína PKC $\alpha$ , ERK1/2, p38 y JNK así como la degradación de I $\kappa$ -B y la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fibroblastos gingivales humanos. Se realizaron estudios dosis respuesta y curso temporal, para caracterizar la fosforilación de estas cinasas mediante ensayos de Western-Blot. Se estudió el efecto de los inhibidores específicos de estas cinasas (PD98059, SB 203580, SP600125, Bisindolymaleimide, Estaurosporina, Calfostin C) para caracterizar la participación de PKC $\alpha$ , así como la participación de las mismas en la inducción en la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). Se observó la translocación al núcleo de ERK1/2 y PKC $\alpha$  por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante ensayos de inmunohistoquímica y microscopía confocal. Mediante aislamiento de fracciones citoplásmicas y nucleares se observó la degradación de I $\kappa$ -B en el citoplasma y la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Por ensayos de RT-PCR se observó la expresión del oncogene *c-fos*.

Los experimentos realizados 5 ocasiones por separado fueron analizados de acuerdo a su densidad óptica por el sistema Labworks.

Nuestros resultados muestran que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la fosforilación de PKC $\alpha$ , ERK1/2, p38 y JNK desde una dosis de 10  $\mu$ M y a partir de los 10 minutos de tratamiento. Se encontró además que es mediante la vía MAPK y en mayor medida JNK, que se induce la expresión de COX-2, al ser estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desde una dosis de 200 $\mu$ M y partir de un tiempo de 4 horas.

Por otra parte encontramos que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la degradación de I $\kappa$ -B, promoviendo de esta manera la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Así mismo se observó que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un agente promotor para la expresión del oncogene *c-fos*.

En conclusión se caracterizó la participación en primera instancia de PKC $\alpha$  para promover la fosforilación de proteínas pertenecientes a la familia de la vía de las MAPK (ERK 1/2), y la participación de otras proteínas pertenecientes a esta misma familia (p38 y JNK) para inducir la expresión de COX-2, por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en FGH. Además de reconocer la expresión del oncogene *c-fos* previa traslación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B al núcleo, por estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fibroblastos gingivales humanos.

### 3. ANTECEDENTES

Los primeros intentos para llevar a cabo el blanqueamiento de dientes datan de finales del siglo XIX y evolucionaron con dos enfoques básicos: el uso de ácido clorhídrico en microabrasión y el uso de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que pasó a constituir la base de la mayoría de las técnicas de blanqueamiento que se utilizan actualmente.

Abbot, en 1918, y Prinz, en 1924, consiguieron el éxito mediante la utilización del peróxido de hidrógeno estabilizándolo en agua (superoxol al 30%). Ames, en 1937, informó de la primera alternativa al ácido clorhídrico para eliminar las manchas de fluorosis: 5 partes de peróxido de hidrógeno al 100% y 1 parte de éter. Younger, en 1939, elaboró su propia solución blanqueante, constituida por 5 partes de peróxido de hidrógeno al 30% y 1 parte de éter anestésico, solución que se aplicaba sobre los dientes y se calentaba. En 1970, Cohen y Parkins informaron sobre el uso del superoxol al 30% con aplicación controlada de calor con reóstatos en el blanqueamiento de dientes de pacientes con fibrosis quística o manchados a consecuencia del uso de tetraciclinas. En 1972, Arens presentó los resultados de su trabajo sobre dientes manchados por tetraciclina con una modificación de la técnica de Cohen y Parking, Arens redujo el uso del superoxol en menos semanas de 30 a 35% y aplicó calor controlado con un aparato desarrollado por la Union Broach Company. Westlake, en 1985, empleó parazona (peróxido de hidrógeno y éter) con corriente eléctrica para blanquear dientes. En 1987, Feinman, Golstein y Garber ampliaron las indicaciones y desarrollaron técnicas de blanqueamiento con peróxido de hidrógeno para distintas manchas dentales, adicionando la utilización de un pregrabado con ácido fosfórico al 37% durante 20 segundos y el empleo de una luz de calor a temperaturas de 115-140° F (40-60°C) con peróxido de hidrógeno al 35%.

En 1988, Haynie y Emmett introdujeron una técnica con peróxido de hidrógeno sin uso de calor. La mezcla de peróxido de hidrógeno al 35% con dióxido de silicio, polvo inerte, da como resultado un gel, siendo mayor su permanencia sobre los dientes por su viscosidad, lo que además, a decir de sus

creadores, permitía reducir al mínimo la utilización del aislamiento absoluto con dique de hule o emplear geles gingivales protectores, ambos procedimientos no aseguraban que se evitará totalmente el contacto directo como encía además de que estudios posteriores demostraron que por túbulos dentinarios era la vía de acceso indirecta de este agente hacia los tejidos periodontales y con ello ocasionar respuestas inflamatorias en la composición celular de los mismos.

Se ha estudiado de manera importante los efectos que este agente tiene en la abrasión y micro fracturas del esmalte, pudiendo llegar a ocasionar daños pulpares cuando no se sigue una terapéutica adecuada o cuando se hace uso indistinto del mismo, pero no existen estudios que se hayan enfocado a tratar de entender y caracterizar los efectos que puede ocasionar a nivel intracelular en el componente celular de la encía, los fibroblastos gingivales <sup>42</sup>. Al respecto existen diversos estudios que demuestran el papel de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y dentro de éstas el peróxido de hidrógeno como agente que promueve la activación de vías de transducción intracelulares.

Se ha demostrado que la exposición a dosis relativamente bajas de ROS, tales como peróxido de hidrógeno, induce muerte celular en algunos tipos celulares y puede además inducir la activación de centenares de cascadas de señales intracelulares incluyendo la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la vía de fosfoinosítido 3-cinasa/ proteína cinasa B (PI3-K/AKT), la translocación del factor nuclear kappa-B (NFκ-B) y la activación de fosfolipasa C-γ.<sup>10</sup>

Los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo activa estas señales intracelulares no han sido caracterizados. Estudios recientes has demostrado que centenares de receptores de factores de crecimiento se activan por ROS y subsecuentemente la activación de cascadas abajo de señalización, contribuyendo significativamente a la supervivencia celular. En respuesta específica al peróxido de hidrógeno, se ha encontrado que el receptor para el factor de crecimiento epidermal, el factor para el crecimiento derivado de



plaquetas o el de insulina pueden ser activados, así mismo las proteínas ERK1/2 y AKT en algunos tipos celulares.<sup>11,12</sup>

Estudios anteriores, han demostrado que como estímulo directo, las especies reactivas del oxígeno, pueden causar cada una de ellas, apoptosis o necrosis dependiendo de las concentraciones utilizadas y el tipo celular. Niveles elevados de ROS han sido detectados en algunas condiciones apoptóticas y se cree que la mitocondria es la principal fuente de producción de ROS intracelular.

Algunos reportes<sup>12,16,20,21,22</sup>, a menudo sugieren resultados contradictorios respecto a los efectos de ROS, como el hecho de que son la llave para que las moléculas reguladoras, tales como caspasas, factores de transcripción nuclear como NF- $\kappa$ B y otras cinasas activadas por estrés celular, estén involucradas en la ruta de señalización que media la muerte celular. Sin embargo, esto permanece para futuras investigaciones. También se ha demostrado la participación de otra proteína, miembro de la familia MAP cinasas, JNK como una de las principales cinasas reguladoras en el evento de la cascada que induce muerte celular por peróxido de hidrógeno.<sup>(12)</sup>

El peróxido de hidrógeno como agente importante en el estrés oxidativo, es un mediador fisiológico de varias respuestas celulares, diversas tirosinas-cinasas incluidas p56 y p59 son activadas transitoriamente por este agente, en términos de regulación en las actividades de factores de transcripción, el peróxido de hidrógeno se ha encontrado que estimula a translocación de STAT3 al núcleo y esto está ligado a un aumento en la actividad transcritora en linfocitos humanos.

La activación y translocación nuclear de STAT3 está acompañada por la fosforilación de moléculas en residuos de tirosina. En adición al peróxido de hidrógeno, puede inducir la expresión de interleucina-6 (IL-6) y del interferón-gamma (IFN $\gamma$ ), por la estimulación de la actividad de STAT3, resultando en la modulación de varias respuestas fisiopatológicas.<sup>13</sup>

Una de las proteínas que ha sido caracterizada en tratamientos de células con peróxido de hidrógeno, es la proteína cinasa C (PKC), todas las isoformas examinadas incluidas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de cPKC,  $\delta$  y  $\epsilon$  de nPKC y  $\xi$  de aPKC, son fosforiladas en residuos de tirosina y activadas catalíticamente en sus dominios

correspondientes siendo esto crucial para su actividad enzimática. Hasta ahora han sido identificados como sitios de fosforilación para PKC, las regiones amino terminal Tyr<sup>52</sup> y Tyr<sup>187</sup>.<sup>14</sup>

El estrés oxidativo puede romper un número de rutas celulares y disparar la apoptosis celular a través de la activación de proteínas cinasas por estrés y de la ruta del factor nuclear-kB. Igualmente la adición de ROS en cultivos celulares humanos puede estimular la ruta de p21 Ras-MAPK, siendo esta actividad un eslabón importante del receptor de membrana con respecto al núcleo.<sup>15</sup>

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1 PERIODONTO

El periodonto, llamado también aparato de inserción o tejido de sostén del diente esta formado por **encía**, **ligamento periodontal**, **cemento radicular** y **hueso alveolar**.

Su principal función es unir el diente al tejido óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. <sup>1, 2,3</sup>

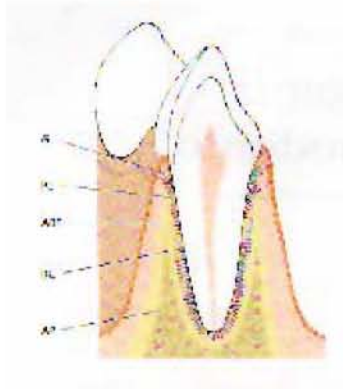


Fig. 1 Esquema de las estructuras del periodonto: encía (G), ligamento periodontal (PL), cemento radicular (CR), hueso alveolar propio (ABP) y apófisis alveolar (AP)  
Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe. Thorkild Karting.

### ENCÍA.

Es la parte de la mucosa masticatoria que cubre los procesos alveolares y rodea las porciones cervicales de los dientes. Se divide anatómicamente en **encía marginal** y **encía insertada**.



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

La **encía marginal**, también denominada libre es el borde de la encía que rodea los dientes a modo de collar, es de color rosa coral, tiene una superficie opaca, consistencia firme y comprende el tejido gingival de las zonas vestibulares, lingual y palatino de los dientes, así como la encía interdental o papilas interdentarias. En el lado vestibular y lingual de los dientes, la encía libre va en sentido coronal del margen gingival libre, en sentido apical hasta el surco gingival que está ubicado en un nivel que corresponde con el límite cementoadamantino, cuya profundidad es de 3 mm. El surco gingival es el espacio 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 encía interdental corresponde a las papilas interdentales, su forma está dada por las relaciones de contacto entre los dientes, la anchura de las superficies dentales proximales y el curso de la unión cementoadamantina.

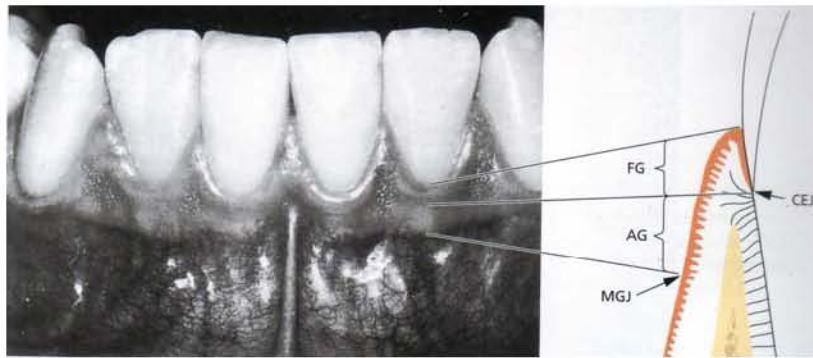


Fig. 3 Disposición clínica y gráfica de la encía  
Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe. Thorkild Karting.

La **encía insertada**, también llamada adherida, se encuentra limitada en sentido coronario por el surco gingival libre y se extiende en dirección apical hacia la unión mucogingival, donde se continúa con la mucosa alveolar. Su textura es firme, es color rosa coral y se caracteriza por un puntilleo parecido a cáscara de naranja. Está adherida firmemente al hueso alveolar y cemento subyacente, por fibras conectivas y es por tanto casi inmóvil en relación con la encía libre.

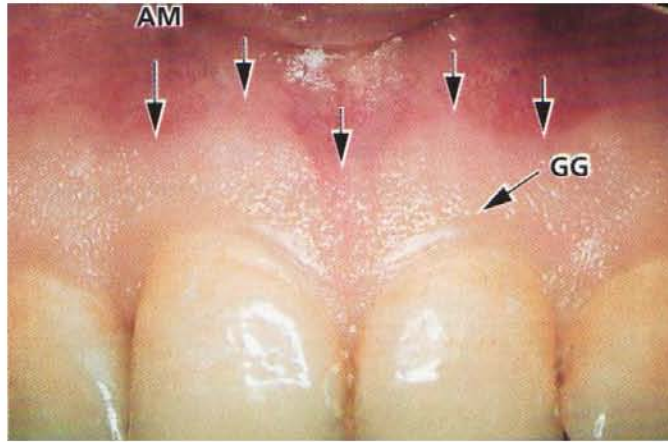


Fig. 4 Encía marginal (GG) y encía insertada (AM)

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

La 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, lingual y 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.<sup>3</sup>

El fluido gingival o crevicular es el encargado de hidratar el surco gingival y la unión epitelio-diente, proviene del tejido conectivo y tiene una doble función:

- El arrastre mecánico de partículas titulares o externas introducidas.
- La defensa inmunitaria, por la presencia de anticuerpos.

Contiene además proteínas plasmáticas que aumentan la adherencia del epitelio al diente. Microscópicamente, la encía esta formada por tejido epitelial y tejido conjuntivo.<sup>1</sup>

### **Tejido epitelial.**

La encía libre esta formada por un epitelio que se encuentra diferenciado de la siguiente forma: epitelio bucal que da hacia la cavidad bucal, epitelio sulcular bucal que va hacia el diente sin ponerse en contacto con el mismo, y un epitelio de unión que establece el contacto entre encía y diente.

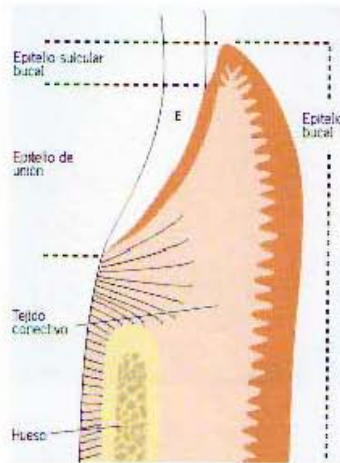


Fig. 5 Esquema de un corte histológico que describe la composición de la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte.

Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe. Thorkild Karting

Epitelio bucal : histológicamente corresponde a un epitelio escamoso estratificado queratinizado que se diferencia de acuerdo a su grado de queratinización de la siguiente manera:

- Capa basal
- Capa de células espinosas
- Capa granular
- Capa cornificada

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

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

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

Tejido conjuntivo: es el tejido predominante de la encía y del ligamento periodontal, esta formado por fibras colágenas en un 60%, fibroblastos en un 5%, vasos, nervios y matriz en 35%.

Las células que predominan son los fibroblastos (65%), después de ellos, en menor porcentaje se encuentran macrófagos, mastocitos, neutrófilos, linfocitos y plasmocitos.

### *Fibroblasto*

El fibroblasto se caracteriza por ser una célula grande, plana y ramificada, fusiforme o estrellada. Su núcleo es de forma ovalada y tiene una membrana nuclear, uno o dos nucleolos notables y una pequeña cantidad de cromatina en gránulos finos. En su citoplasma se encuentra un retículo endoplasmático granuloso bien desarrollado con ribosomas, su aparato de Golgi que es de tamaño considerable, mitocondrias son grandes y tonofilamentos delgados. En la periferia de la membrana celular se encuentran vesículas, cuya función es la producción de los diversos tipos de fibras de colágena, reticulina y elásticas, se puede encontrar además componentes de la matriz extracelular como los glucosaminoglucanos y glucoproteínas. La función principal del fibroblasto es involucrarse en la reparación de los tejidos periodontales cuando existe una lesión en los mismos.

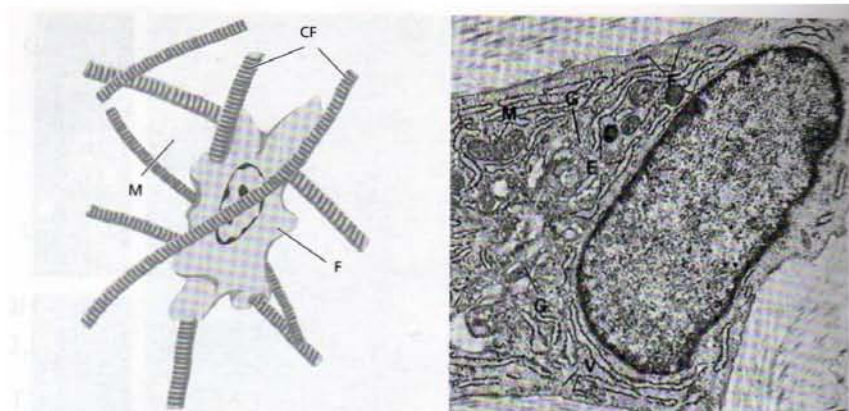


Fig. 6 Esquema de un fibroblasto: red de tejido conectivo (F), espacio intermedio (CF) y matriz (M).  
Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe. Thorkild Karting

### *Mastocito.*

La función del mastocito es la de producir ciertos componentes de la matriz celular, sustancias vasoactivas que pueden afectar el sistema microvascular y controlar con ello el flujo sanguíneo a través del tejido, dichas sustancias son la histamina y la heparina, acumuladas en las vesículas del citoplasma celular.

### *Macrófago*

La función del macrófago es fagocítica, por lo que en su citoplasma se observan vesículas lisosómicas con material fagocitado conocido como fagosomas. Este tipo celular se encuentra en mayor proporción en los tejidos inflamados y derivan de los monolitos sanguíneos dentro de los tejidos. <sup>1,2, 3</sup>

### *Fibras*

Las fibras que se encuentran en el tejido conectivo se dividen en fibras colágenas, fibras elásticas, fibras de reticulina y fibras oxitalánicas.

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

- Fibras circulares: siguen un curso dentro de la encía libre y rodean al diente.
- Fibras dentogingivales: están incluidas en el cemento de la porción supra-alveolar de la raíz y siguen un trayecto en abanico hacia la encía libre.
- Fibras dentoperiósticas: siguen un trayecto en abanico igual que las anteriores pero van hacia el cemento de la porción intra-alveolar de la raíz.
- Fibras transeptales: se extienden del cemento supra-alveolar de dientes vecinos.



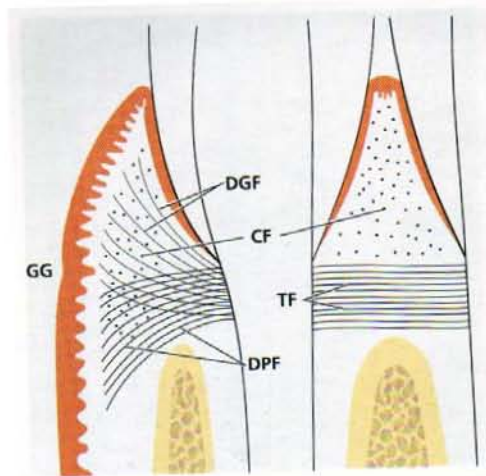


Fig. 7 Disposición de las fibras de la encía  
 Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe. Thorkild Karting.

Las fibras de reticulina se encuentran adyacentes a la membrana basal y en el tejido conjuntivo laxo que rodea a los vasos sanguíneos.

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

### *Matriz Extracelular*

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

### *Vasos sanguíneos*

La vascularización del tejido periodontal proviene de las ramas de las arterias alveolares superior e inferior. <sup>2</sup>

## *Nervios*

La innervación de la encía proviene de las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino.

## **LIGAMENTO PERIODONTAL**

Es el tejido conectivo blando, muy vascularizado y celular que rodea las raíces dentales y se une al hueso, une al cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar propio.<sup>2</sup> En sentido coronario, se continua con la lámina propia de la encía y se encuentra separado de ésta por los haces de fibras de colágena que conectan la cresta del hueso alveolar con la raíz.

Interviene facilitando 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 el movimiento dental inducido.

Sus funciones más importantes corresponden a la disposición de sus fibras:

1. Físicas: Dan soporte al diente y permiten movimientos de éste dentro de los alvéolos y amortiguan la presión ejercida al hueso durante la masticación.
2. 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.
3. Nutritiva y sensorial: proveen nutrición e inervación al cemento, hueso y pulpa.

Las fibras que lo conforman son:

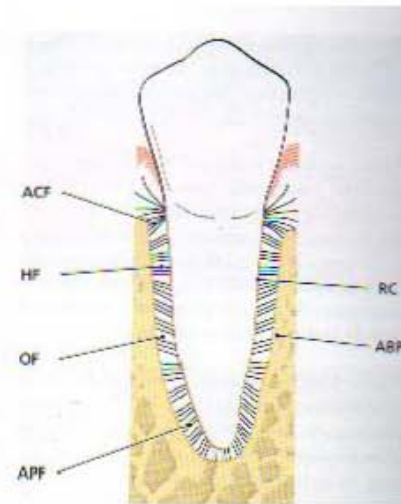


Fig.8 Esquema de las fibras del Ligamento Periodontal con respecto al hueso (ABP) y el cemento radicular (RC). Fibras de la cresta alveolar (ACF), Fibras horizontales (HF), Fibras oblicuas (OF) y Fibras apicales (APF).

Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Jan Lindhe. Thorkild Karting

- Grupo de la cresta alveolar, se extiende desde el área cervical de la raíz hasta la cresta alveolar.
- Grupo horizontal, dispuestas de manera perpendicular desde el diente hasta el hueso.
- Grupo oblicuo, están orientadas de forma oblicua con inserciones en el cemento y se extienden más oclusalmente en el alveolo.
- Grupo apical, se diseminan desde el ápice dental hasta el hueso.

La disposición de éstas fibras, les permite sustentar las fuerzas recibidas por el diente.

El ligamento periodontal ésta compuesto de fibrillas colágenas principalmente, dispuestas en haces. La colágena representa el 50% del peso seco de todo el ligamento periodontal, se suma a esto las fibras elásticas y oxitalánicas. Cerca de la parte media del ligamento, cruzan canales de tejido conectivo laxo, que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas.

## **CEMENTO RADICULAR**

Es un tejido mineralizado especializado que recubre las superficies radiculares de los dientes, no posee vasos sanguíneos, ni linfáticos, no posee inervación, reabsorción, pero se deposita continuamente toda la vida. <sup>(1)</sup>

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

Existen dos tipos de cemento: cemento acelular y cemento celular.

Cemento acelular : también es llamado primario y se forma a medida que se va formando la raíz. Cubre siempre la parte cervical del diente.

Cemento celular : también es llamado secundario y se forma después de la erupción dentaria y en respuesta a las exigencias funcionales. Cubre la porción apical de la raíz del diente.

Los dos tipos de cemento son producidos por el cementoblasto que al quedar contenidos dentro del cemento, reciben el nombre de cementocitos.

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

## **HUESO ALVEOLAR**

Es la parte de los maxilares superior e inferior, también es llamada apófisis alveolar, va a formar y a sostener los alvéolos de los dientes.

Su función principal es la de distribuir y reabsorber las fuerzas generadas, 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 sustancia nutritivas a las

células. Las dos terceras partes de la estructura ósea están formadas por minerales (calcio, fosfato, carbonatos) en forma de cristales de hidroxapatita.

Se distinguen dos tipos de hueso:

- Hueso cortical, en ocasiones es llamado lámina dura y se refiere a la porción de hueso alveolar que cubre el alveolo.
- Hueso esponjoso, es la porción de la apófisis alveolar y tiene aspecto de red.

El hueso alveolar, junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal constituyen el aparato de inserción de los dientes.

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

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

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

## **4.2 AGENTES BLANQUEADORES DE USO DENTAL**

Para realizar tratamientos blanqueadores estéticos en dientes vitales se utilizan agentes que permitan este propósito, entre ellos se encuentra el peróxido de hidrógeno en una concentración de 30 o 35 % en forma de líquido o gel.

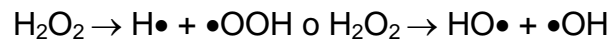
El peróxido de hidrógeno es un agente que tiene capacidad como agente blanqueador debido a la liberación de oxígeno, mediante un efecto de limpieza

mecánica y de reacciones de oxidación y reducción. Pigmentaciones como las ocasionadas por el uso de medicamentos como las tetraciclinas deben su eliminación por peróxido a la degradación oxidativa del anillo quinónico. Los mecanismos varían dependiendo del tipo de manchas existentes y de las condiciones fisicoquímicas presentes en el momento de la limpieza que están determinadas por factores como: pH, temperatura, cocatalizadores, iluminación y otras condiciones.

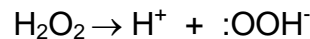


Fig. 9 Blanqueamiento dental en zonas de dientes anteriores superiores. Odontología Estética. Principios de comunicación métodos terapéuticos. Goldstein Ronald E.

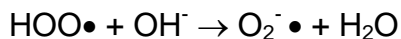
El peróxido de hidrógeno puede liberar radicales libres



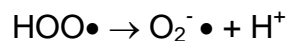
aniones prohidroxilo



o una combinación de radicales libres y aniones

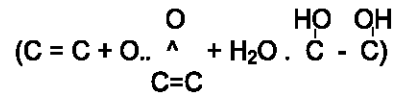


en una solución básica y



en una solución ácida.

Estos compuestos tienen afinidad por enlaces alquenos (dobles) ricos en electrones y forman epóxidos que son inestables y pueden formar alcoholes.



Los enlaces dobles pueden producir manchas y la ruptura de estos enlaces elimina a menudo las manchas. Se forman compuestos más hidrosolubles, que se pueden eliminar más fácilmente. El peróxido de hidrógeno aumenta la permeabilidad del diente, favoreciendo así el movimiento de los iones a través del diente, debido al bajo peso molecular del peróxido de hidrógeno y a su capacidad para desnaturalizar las proteínas.

### **Efectos adversos del blanqueamiento dental con peróxido de hidrógeno.**

- El peróxido de hidrógeno al 35 % puede desnaturalizar la dentina, induciendo una respuesta a cuerpo extraño frente a elementos del tejido gingival circundante, lo que puede producir una resorción cervical.
- Aplicado internamente puede contactar directamente con la membrana periodontal a través de los túbulos dentinarios permeables o de conductos radiculares laterales o accesorios, esto puede provocar una reacción inflamatoria que en un momento determinado puede llegar a ocasionar resorción cervical.
- Puede infiltrarse entre la gutapercha y las paredes de conducto radicular y llegar hasta la membrana periodontal produciendo resorción radicular a nivel apical.
- Cuando se utiliza mezclado con perborato sódico puede reducir el pH en la zona de la membrana periodontal incrementando el riesgo de resorción cervical.

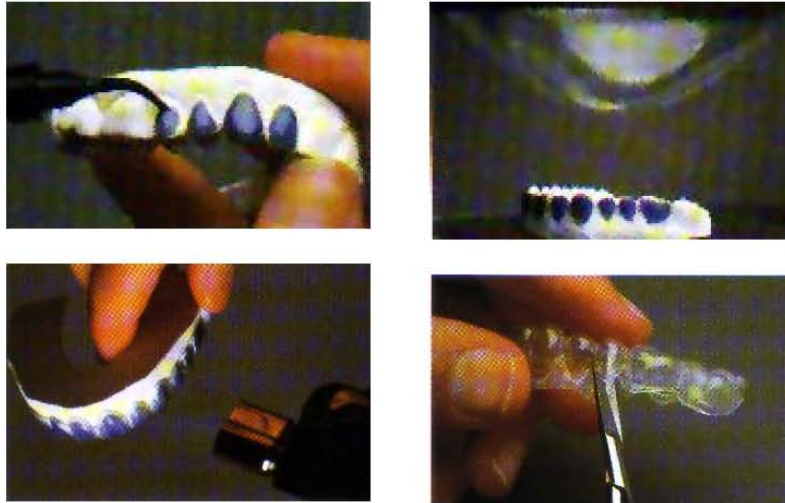


Fig.10 Procedimiento de elaboración de guarda para aplicar el sistema de blanqueamiento en donde se observa que no existe un elemento protector para el espacio que esta en contacto con encía marginal.  
Odontología Estética. Principios de comunicación métodos terapéuticos. Goldstein Ronald E.

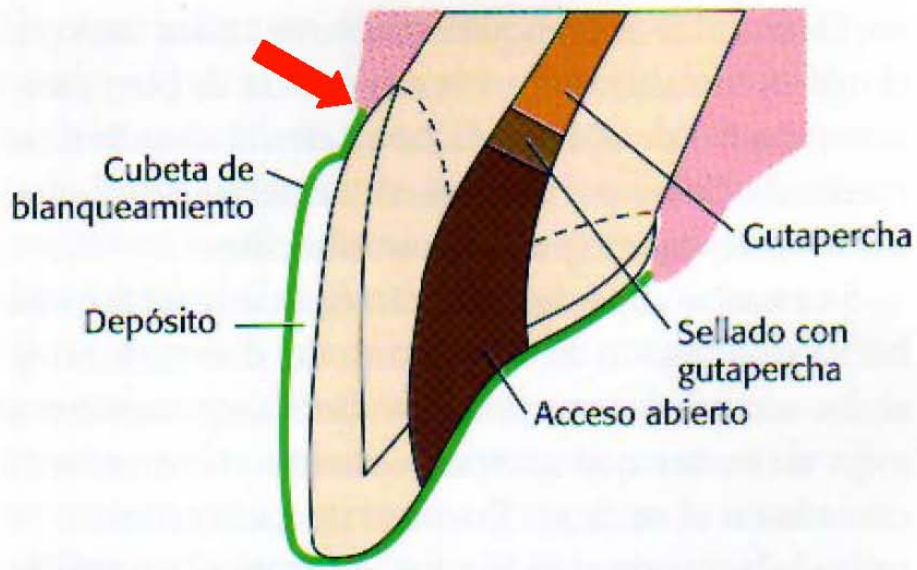


Fig.11 Disposición de la guarda o cubeta de blanqueamiento en contacto con la superficie del esmalte y un límite poco preventivo de aislamiento con la encía marginal (flecha) y el agente blanqueador (peróxido de hidrógeno).  
Odontología Estética. Principios de comunicación métodos terapéuticos. Goldstein Ronald E.



### 4.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.

ROS, significa especies reactivas del oxígeno de acuerdo a sus siglas en inglés, incluye un grupo de moléculas tales como peróxido de hidrógeno, anión superóxido, oxígeno simple y radicales hidroxilo.<sup>10</sup>

Niveles bajos de especies reactivas del oxígeno son regularmente producidas durante el metabolismo fisiológico. Intervienen en el daño celular y están implicadas en la patogénesis de una variedad de enfermedades como diabetes, cáncer, aterosclerosis y enfermedad de Alzheimer.<sup>10, 11,12</sup>

La molécula de oxígeno ( $O_2$ ) es esencial para el mantenimiento de la vida en los organismos aerobios microaerófilos, sin embargo para las células el oxígeno en altas concentraciones puede ser altamente tóxico debido a su capacidad de ser xenobiótico, es decir, produce especies reactivas como el peróxido de hidrógeno y radicales superóxido e hidroxilo.

La molécula de oxígeno puede ser considerada como un biradical debido a los dos electrones que se encuentran desapareados en sus últimos orbitales.<sup>8</sup>

La disposición paralela que presentan los electrones confiere al oxígeno una baja habilidad por aceptar un par de electrones de otra molécula que presenta los electrones antiparalelos. Así la reducción del oxígeno se retarda por la aceptación de electrones de uno en uno y genera especies reactivas.

El oxígeno puede aumentar su reactividad si uno de los electrones solitarios absorbe energía e invierte su rotación generando una especie conocida como singulete.

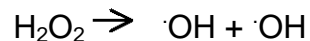
El radical superóxido ( $O_2^-$ ) no es muy reactivo, pero es potencialmente dañino debido a la capacidad que tiene de originar especies como el radical hidroxilo (OH). El  $O_2$  al ser dismutado produce  $H_2O_2$  y este puede generar HO.

El  $H_2O_2$  no es un radical libre, es una especie reactiva con capacidad oxidante débil. Difunde y cruza membranas fácilmente y tiene la capacidad de

reaccionar con metales como  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  para formar radicales hidroxilo de acuerdo con la siguiente reacción descrita por Fenton en 1894:



El peróxido de hidrógeno también puede generar radicales hidroxilo al sufrir fisión homolítica por acción de algunos tipos de energía como radiaciones ionizantes o calor.



Durante el transporte de algunos elementos de la cadena respiratoria principalmente en los complejos nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) coenzima Q reductasa y en las dos formas reducidas de la coenzima Q, se produce una fuga de electrones (autooxidación de semiquinonas), que se reducen en dióxígeno y originan superóxido.

Además de la cadena respiratoria existen otros mecanismos metabólicos generadores de radicales libres, en los que actúan enzimas que degradan radicales superóxido y producen peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ).

La fuente principal de producción de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es la dismutación del radical superóxido, reacción intracelular catalizada por el superóxido dismutasa (SOD). La descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ocurre en los peroxisomas, organelos celulares especializados que contienen enzimas del tipo de las peroxidasas, como la catalasa. El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) también se forma por acción de enzimas como glicolato oxidasa, D-L amino oxidasa y urato oxidasa, durante la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadenas largas en la síntesis de colesterol de las purinas en el catabolismo de los aminoácidos, fotosíntesis y por acción metabólica de la células del sistema inmune.

Las células fagocíticas cuando son estimuladas en la superficie membranal, incrementan su consumo de oxígeno por el fenómeno llamado estallido o “burst” respiratorio; que resulta en la producción de radicales superóxido vía NADPH

oxidasa y a partir del cual pueden formarse otras especies reactivas del oxígeno como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>9</sup>

Un aspecto importante de los efectos biológicos de ROS, es su papel regulador en la muerte celular, pueden actuar como activadores directos o como segundos mensajeros al activar algunos otros estímulos, tales como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF $\alpha$ ).<sup>11</sup>

### **Mecanismos de transformación de radicales libres en los sistemas biológicos.**

Las células presentan mecanismos que permiten contrarrestar los daños producidos por las especies reactivas de oxígeno. Los principales mecanismos de defensa antioxidante son:

Barreras fisiológicas que impiden el paso del oxígeno ambiental al interior celular.

Defensas antioxidantes no enzimáticas como la vitamina E ( $\alpha$  y  $\beta$  tocoferoles), vitamina C (ácido ascórbico), los carotenos, el glutatión, la bilirrubina y el ácido úrico entre otros.

Defensas antioxidantes enzimáticas. La protección enzimática celular puede dividirse en tres categorías, la primera línea de defensa la componen la catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD), que actúan destruyendo a los radicales libres antes de que actúen sobre moléculas blanco. Las enzimas dependientes de glutatión (peroxidasas y transferasas) componen la segunda línea de defensa, así como el citocromo P<sub>450</sub>. La última categoría actúa directamente contra los grupos carbonilos.<sup>10</sup>

### **Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio en la producción aumentada de ROS y a la función deteriorada del sistema antioxidante.<sup>11</sup>

Los estados fisiológicos estables se mantienen el evitar que aumente la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno. Para ello la célula debe mantener un equilibrio entre el poder reductor y la concentración intracelular

de dioxígeno. El estado hiperoxidante se genera cuando se rompe este equilibrio debido a factores como:

1. Aumento súbito en la entrada de oxígeno ambiental.
2. Una disminución brusca en la entrada de dioxígeno.
3. La inhibición de la cadena respiratoria.
4. Un incremento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno provenientes del metabolismo celular por efecto de radiaciones.
5. Falta de mecanismos antioxidantes eficientes.
6. La disminución del poder reductor por falta de nutrientes o por la presencia de sustancias oxidantes.
7. Un incremento de las especies reactivas de oxígeno provenientes del exterior.

El estado hiperoxidante aunque se genera en condiciones fisiológicas, puede producirse experimentalmente y así estudiar la respuesta celular ante un estrés oxidativo. La célula tiene que ajustar su capacidad de reducir dioxígeno y sus especies reactivas modificando sus mecanismos antioxidantes.

Los organismos presentan sistemas que se adaptan y contrarrestan los cambios drásticos producidos en el ambiente, por ejemplo cuando se da un estrés oxidativo, se induce la expresión de algunos genes que codifican para enzimas antioxidantes y mecanismos de reparación de DNA.

La respuesta celular al estrés oxidativo puede ser diferente, como: muerte celular, interrupción del crecimiento, proliferación o transformación, los cuales son dependientes del estímulo estresante en tiempo y dosis, tipo celular y el medio ambiente circundante encontrado. <sup>10</sup>

#### **4.4 SEÑALES CELULARES Y VÍAS DE TRANSDUCCIÓN**

La membrana plasmática separa a la célula del medio que la rodea. Sólo es permeable a pequeñas moléculas solubles en lípidos, como las hormonas esteroideas que pueden difundir a través de ella para adentrarse en el citoplasma.

Es impermeable a los materiales solubles en agua, incluyendo los iones, pequeñas moléculas inorgánicas y polipéptidos o proteínas. La respuesta al material hidrofílico depende de la interacción sobre la cara extracelular de la célula con un componente proteínico de la membrana plasmática. La molécula extracelular es llamada ligando la proteína de la membrana plasmática que la une es llamada receptor.

Un receptor de membrana se define como una estructura química capaz de recibir al mensajero y de transmitir el mensaje para que se produzca la respuesta de la célula. El receptor es una proteína grande de peso molecular elevado y sus funciones principales son reconocer al mensajero y activar la secuencia de eventos que conducen a la respuesta celular. La información para sus síntesis está almacenada en el material genético de cada célula, su superficie presenta un sitio de reconocimiento al que se le une el mensajero. El mensajero y el receptor se unen con un alto grado de afinidad y especificidad.

La afinidad es la facilidad de interacción entre 2 sustancias. Por su localización los receptores se pueden dividir entre dos grandes funciones los que localizan en la membrana plasmática y los intracelulares.

La transmisión de una señal implica la interacción de un ligando extracelular con una proteína transmembranal que tiene como dominio a ambos lados de la membrana. La unión del ligando convierte al receptor de su forma inactiva a la activa.

El principio básico de esta interacción es que la unión del ligando en la cara extracelular influye en la activación del dominio del receptor que se encuentra en la cara citoplásmica. Este proceso recibe el nombre de transducción de una señal.

La transducción de una señal proporciona un medio de amplificación de la señal original.

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

## **Vías de Transducción.**

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

Se conocen diferentes vías de transducción en donde intervienen distintos segundos mensajeros como pueden ser la fosforilación de proteínas a través de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) o GMPc (guanosina 3',5'-cíclico monofosfato) o la de fosfolípidos y calcio, en este caso nos interesa la vía de las MAP cinasas.

### **Vía MAP Cinasa (Proteínas activadas por mitógeno)**

La respuesta inmune involucra un número de tipos celulares que funcionan como iniciadores, reguladores y efectores. Estas células interactúan y se regulan entrecruzadamente con otras y son blanco de la respuesta celular usando cascadas de transducción de señales para mediar la expresión de genes y la función inmune. La cascada de las MAP cinasas es una de las rutas de señalización más antiguas y conservadas evolucionalmente, lo cual es muy importante para muchos procesos en la respuesta inmune.

La vía de las MAP cinasas la conforman una cascada de proteínas que se han conservado evolutivamente y su papel en la transducción de señales es crucial en las células eucariontes. La familia de proteínas cinasas treonina-serina llamadas proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) son el principal elemento de esta vía y son activadas cuando factores de crecimiento, estrés intracelular y otras moléculas son estimuladas para producir una respuesta.

En levaduras, esta vía controla la expresión de una gran variedad de factores de crecimiento así como otras respuestas celulares, como su reproducción, forma y esporulación. En los mamíferos regula el crecimiento celular

y la diferenciación por este motivo se le denominó proteínas cinasas activadas por mitógeno.<sup>4</sup>

En las células eucariontes existen varias rutas de las MAP cinasas, cada cascada consiste en tres proteínas cinasas: una cinasa terminal y dos cinasas intermedias que regulan distintas respuestas celulares.

Existen tres grupos mayores de MAP cinasas en células de mamíferos: la proteína cinasa regulada extracelularmente (ERK), la MAP cinasas p38 y la cinasa terminal c-Jun NH<sub>2</sub> (JNK). Estas MAP cinasas son activadas por fosforilación dual en el tripéptido Thr-Xaa-Tyr. La secuencia de este tripéptido es diferente para cada grupo de MAP cinasas: para ERK (Thr-Glu-Tyr); para p38 (Thr-Gly-Tyr) y JNK (Thr-Pro-Tyr). La fosforilación en residuos de treonina (Thr) y tirosina (Tyr) es mediada por una cascada de proteínas cinasas.

ERK es activada por la MAP cinasa cinasa (MKK), MKK1 y MKK2; p38 es activada por MKK3, MKK4 y MKK6 y JNK es activada por MKK4 y MKK7. Las MAP cinasas cinasas (MKK) son activadas en su momento por diferentes MAP cinasas cinasas cinasas (MKKK)

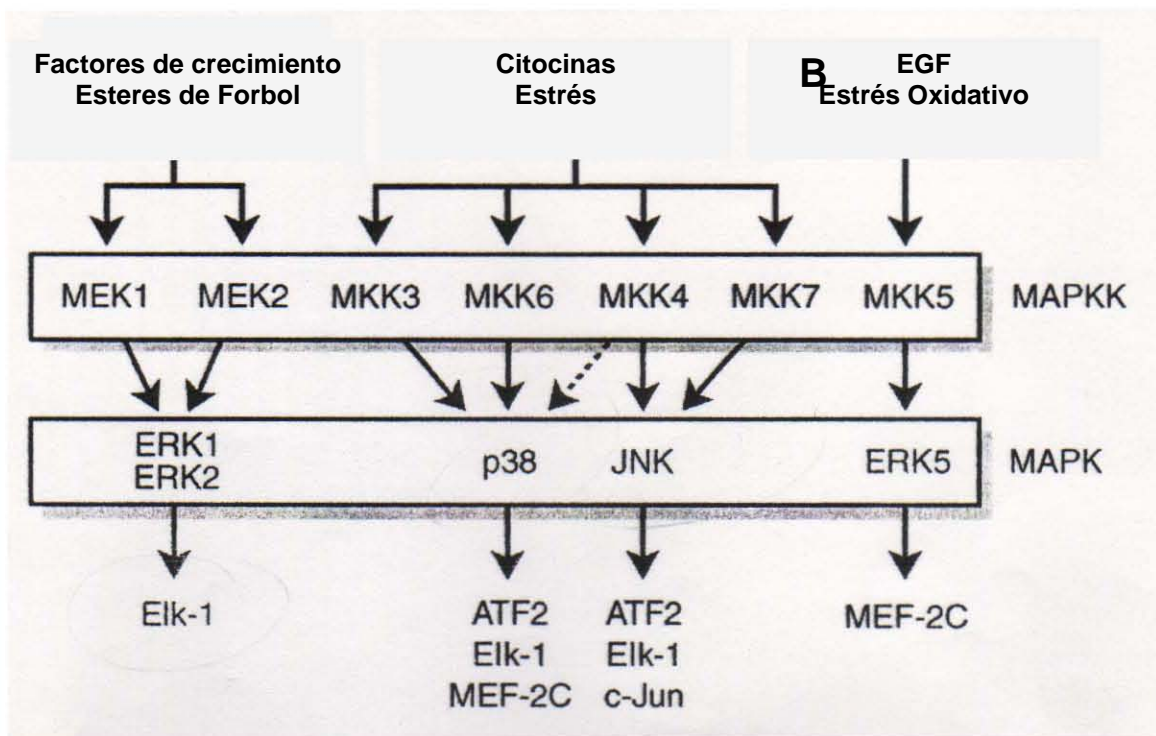


Fig.12 Familia de las MAPK en mamíferos  
Protein Kinase Protocols. Methods in Molecular Biology. Alastair D. Reith.

### **ERK (Proteína cinasa de regulación extracelular)**

La ruta de ERK fue primero identificada en la cascada que se sitúa debajo de RAS y se le asoció a la regulación del crecimiento y diferenciación celular. Existen 2 isoformas de ERK, ERK1 y 2, las cuales algunas veces son referidas como MAP cinasas p44/p42. Ellas pueden ser activadas por MEK1 y MEK2, cinasas situadas arriba de ERK. La activación de ERK es un evento importante de la activación de las células T. <sup>4</sup>

### **JNK (Cinasa amino-terminal reguladora del factor de transcripción c-Jun)**

La actividad de JNK puede ser inducida en diversos tipos celulares por lipopolisacáridos (LPS) o por citocinas inflamatorias tales como TNF y IL-3. En las células de *Drosophila* la actividad de JNK en respuesta a LPS sugiere que esta vía de señalización ha evolucionado conservando su respuesta de inmunidad innata. Sin embargo el papel funcional de JNK no ha sido claramente establecido en ese sistema. En fibroblastos, JNK puede ser activado por citocinas inflamatorias y RNA viral. JNK es activado por TRAF en la ruta de señalización de TNF y por TRAF6 seguida de la activación de IL-1. MKK4 es una cinasa que se ha señalado como esencial para activar la función de JNK por TNF o IL-1. <sup>4,5,6</sup> En mamíferos se han identificado tres tipos específicos de la cinasa JNK: JNK1, JNK2 y JNK3. <sup>4</sup>

### **p38**

Es miembro de la familia MAPK, también se le conoce como SAPK2/RK o cinasa activada por estrés. Originalmente se identificó por la estimulación de macrófagos de ratón con LPS. Es una proteína de peso molecular de 38 kDa, que está presente en el citoplasma celular de células involucradas en la respuesta inflamatoria como macrófagos y neutrófilos, en células T, CD4, CD8 y neutrófilos. Existen isoformas de p38:  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta$ . La isoforma más estudiada en distintas líneas celulares ha sido  $\alpha$ . La sensibilidad a inhibidores específicos es una de las diferencias fundamentales entre las isoformas de p38.



Puede ser estimulada por distintas citocinas inflamatorias como IL-1, TNF, LPS, trombina, colágena y estrés celular.

La importancia de p38 radica en su capacidad para la expresión de genes de muchas citocinas y su rol en la respuesta inmune.

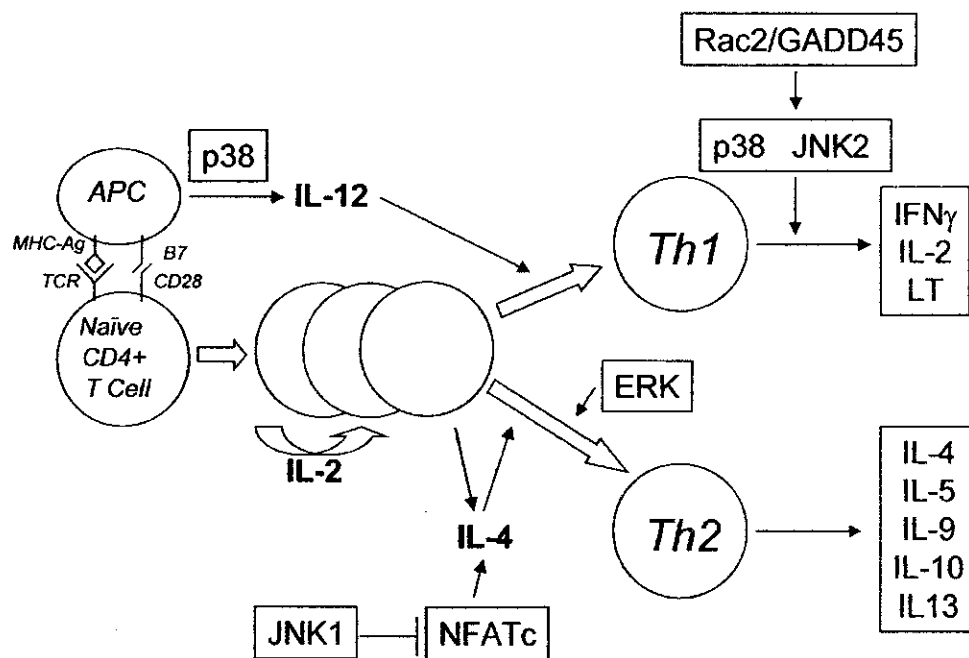


Fig.13 Papel de las MAPK en la diferenciación celular y producción de citocinas en mamíferos  
Protein Kinase Protocols. Methods in Molecular Biology. Alastair D. Reith.

## **Ciclooxigenasa-2 (COX-2)**

Las prostaglandinas son reguladores críticos de la respuesta inmune, la fiebre y el dolor, también actúan como moduladores autócrinos y parácrinos de la respuesta celular que juega un papel importante en la mitogénesis y apoptosis. Las prostaglandinas se forman a partir del metabolismo del ácido araquidónico, por medio de dos enzimas la ciclooxigenasa-1 y la ciclooxigenasa-2.

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

Las ciclooxigenasas catalizan la conversión de ácido araquidónico y  $O_2$  a prostaglandinas, especialmente prostaglandina- $H_2$  (PGH $_2$ ). La ciclooxigenasa-1 (COX-1) es una enzima constitutiva cuya expresión es regulada. COX-1 cataliza la síntesis de prostaglandinas en el retículo endoplásmico, es la única ciclooxigenasa presente en las plaquetas y también se ha asociado con la producción de tromboxano A $_2$ . En contraste la enzima COX-2 es una enzima inducida, normalmente no se encuentra en las células, algunas líneas celulares la expresan, su inducción es rápida, transitoria y entre los estímulos que la inducen están los factores de crecimiento y citocinas. Los productos finales asociados a prostaglandina E $_2$  (PGE $_2$ ) y las prostacilinas.

## **I $\kappa$ -B y NF- $\kappa$ B**

La inflamación y la inmunidad innata involucran rutas de señalización principalmente para la producción de mediadores inflamatorios. El complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK) contiene 2 subunidades catalíticas IKK $\alpha$  y IKK $\beta$ , que controlan la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual juega un papel dependiente en la inflamación. Existen evidencias de que IKK $\beta$ , es un mediador en la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a citocinas proinflamatorias y productos microbianos ,

mientras que  $IKK\alpha$  regula la ruta alternativa importante para la organogénesis linfoide, y se le ha asociado una actividad como regulador negativo de la actividad de macrófagos, contribuyendo además a suprimir la actividad de NF- $\kappa$ B por aceleramiento igualitario de los cambios en las subunidades de NF- $\kappa$ B (Rel A y c-Rel) y su traslado desde genes promotores proinflamatorios.

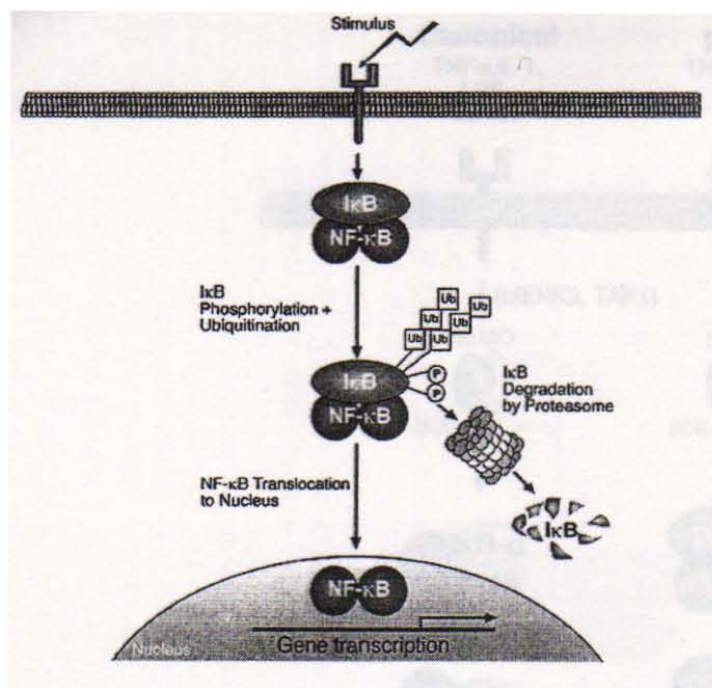


Fig.14 Modelo de la activación de NF- $\kappa$ B  
Sören Beinke y Steven C. Ley .Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology.

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es un regulador de la inflamación que controla la expresión de importantes genes inmunoreguladores. La activación y actividad de NF- $\kappa$ B es controlada por mecanismos endógenos que limitan la producción excesiva y prolongada de mediadores proinflamatorios, los cuales pueden causar daño tisular durante la respuesta inflamatoria. Con la excepción de la autorregulación de la expresión de I $\kappa$ -B $\alpha$  (un inhibidor de NF- $\kappa$ B) y la inducción de la D-ubiquitinación de a enzima A20, los mecanismos que limitan la duración y la magnitud de la señalización de NF- $\kappa$ B ha sido poco entendida. Se ha

señalado que I $\kappa$ B- $\alpha$  y A20 no son solamente fisiológicamente relevantes reguladores negativos de la modulación central de señalización.<sup>36</sup>

La activación de NF- $\kappa$ B por estímulos proinflamatorios dependen del complejo clásico de IKK (IKK $\alpha$  y IKK $\beta$ ) señalado anteriormente, así como de una subunidad reguladora denominada IKK $\gamma$ /NEMO. La activación de IKK es iniciado por el ajuste de los receptores de citocinas o también por el modelo de receptores reconocidos. Los estudios de disrupción de genes revelan que, en adición a IKK $\gamma$ /NEMO, el cual es necesaria para la activación del complejo clásico IKK e IKK $\beta$  antes que IKK $\alpha$ , juega un papel más crítico en la activación. Se ha sugerido por lo tanto que IKK $\alpha$  en una forma alternativa en el complejo (fuera de IKK $\beta$  y de IKK $\gamma$ ), para la cual es requerida en el desarrollo de órganos linfoides.<sup>7, 33, 36,43</sup>

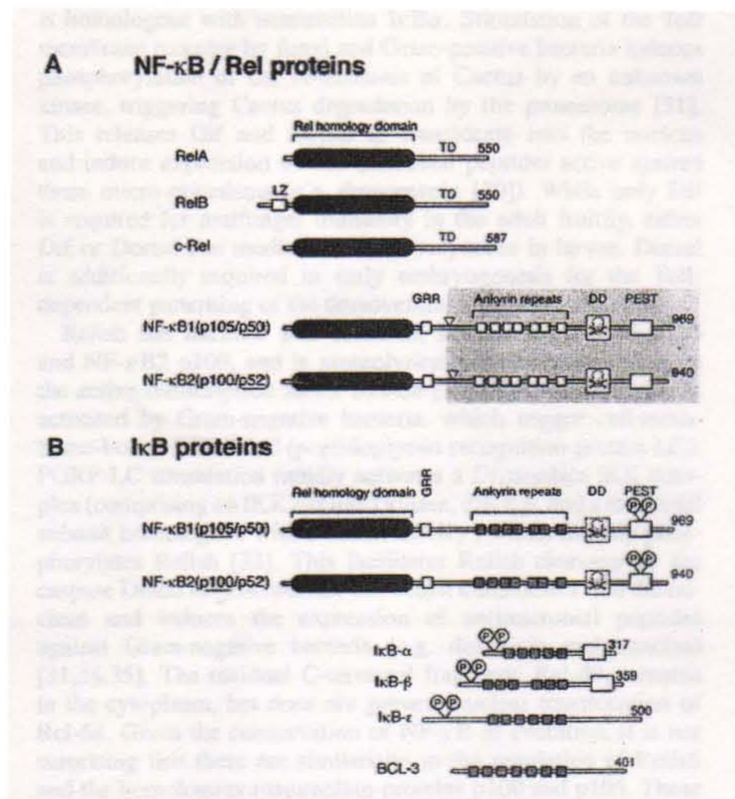


Fig.15 Representación esquemática de los miembros de Rel/NF- $\kappa$ B y de I $\kappa$ B (B) Sören Beinke y Steven C. Ley .Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La estética es sin duda una de las principales características que actualmente debe distinguir la aplicación de la odontología, existen diversas formas en las que ésta se ve manifestada en cada uno de los tratamientos seleccionados, entre ellos el blanqueamiento dental.

El blanqueamiento dental aplicado a dientes vitales y no vitales, utiliza agentes oxidantes que han sido clasificados dentro del grupo de especies reactivas del oxígeno (ROS). Específicamente el peróxido de hidrógeno y el peróxido de carbamida han sido estudiados ampliamente y se han descrito sus mecanismos de acción, así como sus efectos adversos en la superficie del esmalte.

Por todo lo anterior resulta de interés particular abordar los mecanismos inflamatorios intracelulares que éste agente puede provocar, para lo cual es imprescindible estudiar si existe o no activación de vías de transducción en la población celular mayoritaria del tejido gingival: los fibroblastos.

Específicamente ocuparnos de la activación de  $PCK\alpha$ , así como de ERK1/2, JNK y p38, todas proteínas pertenecientes a la familia de MAP cinasas, de la expresión de COX-2 y del factor de transcripción NF-kB y su posible translocación nuclear para observar si es estimulada la expresión del oncogene *c-fos*, por peróxido de hidrógeno.

## **6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.**

Al observar la fosforilación en diferentes tiempos y dosis de PKC $\alpha$ , ERK1/2, p38 y JNK, así como la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos, se podrá caracterizar una de las vías de transducción celular llamada MAP cinasas y su papel en la fosforilación y ubiquitinación de I $\kappa$ -B y de esta forma se libera a NF- $\kappa$ B y se transloca al núcleo para promover la expresión del oncogene *c-fos* y con ello mediar la respuesta de sobrevivencia celular.

Con la descripción de lo anterior se pretenderá bloquear éstos efectos con inhibidores específicos para ERK1/2, p38 y JNK así como para la isoforma  $\alpha$  de PKC y observar si ésta última proteína participa como iniciadora para la activación de la vía MAP cinasa. De esta manera y con el conocimiento de la importancia que representa el peróxido de hidrógeno como agente hemostático, estético y bactericida en odontología, se pretende disminuir los efectos inflamatorios adversos que su uso ocasiona en los fibroblastos gingivales humanos, de tal manera que la regulación de esta situación no conduzca a la célula hacia una apoptosis por estrés oxidativo y nos da alternativas para continuar con su aplicación clínica en odontología.

## **7. HIPÓTESIS**

### **Hipótesis verdadera.**

Si el peróxido de hidrógeno activa transducción de señales en fibroblastos gingivales humanos, entonces provocará la fosforilación de proteínas y las consecuencias fisiológicas que esto conlleva.

### **Hipótesis falsa.**

Si el peróxido de hidrógeno no activa transducción de señales en fibroblastos gingivales humanos, entonces no provocará la fosforilación de proteínas ni las consecuencias fisiológicas que esto conlleva.

## **8. OBJETIVOS.**

### **8.1 Objetivo general**

Caracterizar la fosforilación de proteínas pertenecientes a la familia de MAP cinasas en fibroblastos gingivales humanos por peróxido de hidrógeno en distintas dosis y a diferentes tiempos.

### **8.2 Objetivo específico**

Caracterizar la participación de las proteínas PKC $\alpha$ , ERK 1/2, p38, JNK y COX-2 para observar la translocación del factor de transcripción NF-kB al núcleo y permitir la expresión del oncogene *c-fos* en la regulación de eventos fisiológicos por peróxido de hidrógeno.



## **9. TIPO DE ESTUDIO**

Experimental, Comparativo y prospectivo.

## **10. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Materiales**

#### **Equipo (marca)**

Agitador magnético (Nuova)

Balanza GA 200 (Ohaus)

Baño de agitación ( Precision Scientific)

Baño seco (Fisher)

Cajas de cultivo de 6 pozos (Costar)

Cámara de electroforesis vertical (Hoefer)

Cámara de transferencia semiseca (GIBCO-Life Technologies)

Campana de flujo laminar (Nuaire)

Celdas de cuarzo

Centrífuga (Sorvall)

Digi-Doc

Espectrofotómetro (Perkin Elmer)

Gendarme (Costar)

Gradillas (Nalgene)

Incubadora ( Nuaire)

Negatoscopio

Microscopio de objetivos invertidos C22 (Olympus)

Orbit Shaker (Labline)

Pipetas de 10 y 5 ml (Finnipipette)

Potenciómetro (Equipar)

Probetas graduadas

Propipeta (Pepet-aid)

Sonicador (Lab-Line instrumets)

Timer

Tubos clínicos 25 y 50 ml (COSTAR)

Tubos de ensayo

Tubos Eppendorf

Vasos de precipitados

Vortex

### **Reactivos**

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

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

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

Anticuerpos: anti-mouse monoclonal pERK1/2 (sc-7383 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA ), anti-rabbit polyclonal ERK ( sc-9350 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA), anti-mouse monoclonal pPKC $\alpha$  (sc-12356 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA), anti-rabbit polyclonal cPKC $\alpha$  (sc-2089 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA ) anti-mouse monoclonal pp-38 (sc-7973 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA), anti-rabbit polyclonal p38 (sc-7149 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA), anti-mouse monoclonal pJNK (sc-2398 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA), anti-mouse monoclonal JNK (sc-2345 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA), anti-goat polyclonal COX-2 (sc-2367 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA), anti-goat polyclonal NF-kB p50 (sc-114-G), anti-goat polyclonal p65 (sc-372-G), anti-rabbit polyclonal I $\kappa$ -B $\alpha$  (sc-203), anti-mouse monoclonal (sc-2980 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA), anti-rabbit polyclonal (sc2572- Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA) y anti-goat polyclonal (sc5678- Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA).

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

Bisindolymide I (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)

Calfostin C (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)

Cloruro de sodio (DIFCO)

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

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

Estaurosporina

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

Glicerol (J.T.BAKER. NJ. USA)  
Kit de Quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology. Ca. USA)  
Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)  
Solución de Hanks (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA)  
Membrana de nitrocelulosa (Bio-rad Laboratorios, Inc. Ca. USA.)  
Oligos de *c-fos* sense, anti-sense  
Ortovanadato de sodio (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)  
PD 98059 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)  
Peróxido de hidrógeno (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)  
SB203580 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)  
SP600125 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)  
Suero bovino fetal (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA)  
Trisma (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)  
Tripsina (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)  
Triton 100X (J.T. BAKER. NJ. USA)  
Tween (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)

## **MÉTODOS.**

### **Cultivo de fibroblastos gingivales humanos (FGH).**

Los FGH se obtuvieron a partir de muestras de tejido de encía de pacientes clínicamente sanos, que acudieron a las clínicas de la Facultad de Odontología. El tejido se colocó en solución de Hanks, se procesó la muestra para la obtener las células y se colocó en medio de Eagle Modificado por Dulbecco adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal y 1% de antibiótico antimicótico y se incubaron bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C.

### **Detección de la fosforilación de las fosfoproteínas PKC $\alpha$ , ERK 1/2, p38, JNK y la expresión de COX-2 por medio de ensayos de Western Blot.**

Para caracterizar la fosforilación de PKC $\alpha$ , ERK 1/2, p38 y JNK, así como la expresión de COX-2 por peróxido de hidrógeno se realizaron experimentos tipo dosis respuesta y curso temporal. Se sembraron los fibroblastos gingivales humanos en cajas de 6 pozos hasta la semiconfluencia.

Se dejaron 1 hora en ayuno con DMEM libre de suero bovino fetal con 1% de antibiótico-antimicótico. Posteriormente se trataron con Peróxido de hidrógeno en DMEM adicionado con 2% de SBF según se indicaba en el protocolo para cada ensayo. Posterior a la incubación con peróxido de hidrógeno se colocó buffer de fosfato salino (NaCl; KCl; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) adicionado con 1mM de ortovanadato de sodio y se obtuvieron las células mediante raspado con gendarme. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm a 4°C y se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl 20mM, Tritón 1%, NaCl 137mM, EDTA 2mM, Vanadato de sodio 1mM, Glicina 10%). Posteriormente se sonicaron a 30w por 30 segundos. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Las muestras se desnaturalizaron y se sometieron a tratamiento térmico. Se realizó la electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% a 60 V. La proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la posterior incubación del anticuerpo específico de la fosfoproteína PKC $\alpha$ , ERK 1/2, p38 y JNK así como de COX-2, según lo indicaba el protocolo de cada ensayo. Después de la incubación con anticuerpos se procedió a realizar el procedimiento de revelado mediante el Kit de quimioluminiscencia.

### **Aislamiento de proteínas citoplasmáticas y nucleares para observar por Western Blot la degradación de I $\kappa$ -B $\alpha$ y la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo**

Para observar la degradación de I $\kappa$ -B $\alpha$  y la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo se aislaron proteínas citoplasmáticas y nucleares, se realizaron experimentos tipo

dosis respuesta y curso temporal. Se sembraron los fibroblastos gingivales humanos en cajas de 6 pozos hasta la semiconfluencia.

Se dejaron 1 hora en ayuno con DMEM libre de suero bovino fetal con 1% de antibiótico-antimicótico. Posteriormente se trataron con Peróxido de hidrógeno en DMEM adicionado con 2% de SBF según sea indicaba en el protocolo para cada ensayo. Posterior a la incubación con peróxido de hidrógeno se lisaron las células por congelamiento rápido. Se lavaron las células con buffer de fosfato salino en frío (en baño de hielo a 4°C), se rasparon las células con un gendarme y se transfirieron a un tubo de cónico de 1.5 ml, se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante, la pastilla obtenida se congeló en baño de hielo seco y etanol. Se resuspendieron los núcleos en buffer hipotónico, se evaluó el estado de los núcleos utilizando tinción de azul tripano y se observaron al microscopio. Se centrifugaron a 3 500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante que corresponde a la fracción citoplasmática y la pastilla, que corresponde a la fracción nuclear se resuspendió en buffer hipertónico, se mantuvo en agitación a 4°C. Se centrifugó a 14 000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se paso a otro tubo y se mezcló con buffer D modificado, se congeló en baño seco y etanol. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Las muestras se desnaturalizaron y se sometieron a tratamiento térmico. Se realizó electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% a 60 V. La proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la posterior incubación del anticuerpo específico Iκ-Bα, NF-kB p50 y NF-kB p65. Después de la incubación con anticuerpos se procedió a realizar el procedimiento de revelado mediante el Kit de quimioluminiscencia.

### **Microscopia Confocal de p-ERK 1/2 y PCKα mediante ensayo de inmunohistoquímica.**

Para observar la localización de p-ERK 1/2 y p-PKCα en Fibroblastos Gingivales Humanos por el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para observar las muestras en el microscopio confocal Nikkon.

Se cultivaron las células en cajas de 48 pozos con lentes de vidrio estériles. Las células se cultivaron en DMEM adicionado con 10% de SBF y 1% de antibiótico-antimicótico, hasta la semiconfluencia. Se ayunaron durante 30 minutos en DMEM libre de SBF. Se realizó el tratamiento de las células según el protocolo del ensayo, en DMEM adicionado con 2% de SBF y 1% de antibiótico -antimicótico. Se retiró el medio y se colocaron 100µl de paraformaldehído al 2% por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer de fosfato salino estéril y se colocaron 50µg de tritón 100X al 0.1% por 5 minutos a 4°C. Se realizaron 3 lavados de buffer de fosfato salino y se colocó el primer anticuerpo de acuerdo al protocolo del ensayo y se dejó incubando a una temperatura de 4°C. Se realizaron nuevamente lavados con buffer de fosfato salino y se colocó el segundo anticuerpo de acuerdo al protocolo del ensayo, este estaba acoplado a fluoresceína y/o rodamina, se incubó 30 minutos a 4°C. Se realizaron 5 lavados con buffer de fosfato salino y se retiró la lenteja con el medio de cultivo. Se colocó una gota de resina en un portaobjetos y se colocó la lenteja. Se cubrieron las muestras con papel y se mantuvieron bajo una temperatura de 4°C. Se observaron las muestras en el microscopio confocal.

### **Aislamiento de RNA y reacción de RT-PCR para observar la expresión del oncogene c-fos**

Para observar la expresión del oncogene c-fos se realizó extracción de RNA y reacción de RT-PCR. Se cultivaron las células hasta la semiconfluencia, se ayunaron por 1 hora en DMEM sin SBF adicionado con 1% antibiótico-antimicótico, al término se incubaron en DMEM al 2% de SBF adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico y se trataron las células de acuerdo al protocolo del ensayo. Se realizó la extracción del mRNA según el método de Chomczynski y Sacchi,<sup>(28)</sup> la muestra se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato 1%, posteriormente se trató la muestra con una mezcla de cloroformo isoamílico a temperatura ambiente, se centrifugó a 10 000 rpm, se recuperó la fase acuosa y se le adicionaron 500µl de isopropanol, se centrifugaron las muestras y la pastilla obtenida se resuspendió en etanol al 75%, se centrifugaron nuevamente y se retiró el remanente del sobrenadante mediante evaporación, las muestras se cuantificaron a 260 y 280 nm, se obtuvo la relación 260/280. Se separaron las muestras en gel de agarosa 1% en presencia de formaldehído y se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización en luz UV, para corroborar la integridad

del mRNA. Se preparó la reacción para RT-PCR de acuerdo a la especificación del kit one-step para el oligodesoxinucleótido *c-fos*. Los productos obtenidos de la reacción, se separaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización en luz UV.



## **11. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

Los experimentos se realizaron por 5 ocasiones por separado. Se realizaron ensayos de Western Blot, aislamiento de RNA, reacción de RT-PCR y ensayos de Inmunohistoquímica con microscopia confocal.

Los resultados obtenidos se analizaron por medio del software Labworks del cual se obtuvo la densidad óptica. Se obtuvo el promedio de los cinco experimentos y se comparó con el control de cada caso, el cual se tomó como el 100% del basal, sobre estos datos se obtuvo el análisis gráfico.

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

## 12. RESULTADOS

### 12.1 CURSO TEMPORAL DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

La fosforilación de proteínas se puede llevar a cabo en diversos residuos de aminoácidos, los sitios mejor estudiados que regulan este evento son en tirosina, treonina y serina. Para caracterizar la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se realizaron experimentos de tipo curso-temporal con una dosis de peróxido de hidrógeno de 200  $\mu\text{M}$ , utilizando tiempos desde 5 minutos hasta 45 minutos. Observándose la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina correspondientes a los siguientes pesos moleculares 18 kDa, 26 kDa, 38 kDa, 42 kDa, 41 kDa, 45 kDa, 98 kDa y 117 kDa respectivamente desde los 5 minutos de tratamiento. (Fig. 1). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir la fosforilación en un gran número de proteínas en residuos de tirosina desde tiempos cortos (5 minutos), por lo tanto el siguiente paso era caracterizar el patrón de fosforilación específico de las MAPK inducido por peróxido de hidrógeno.

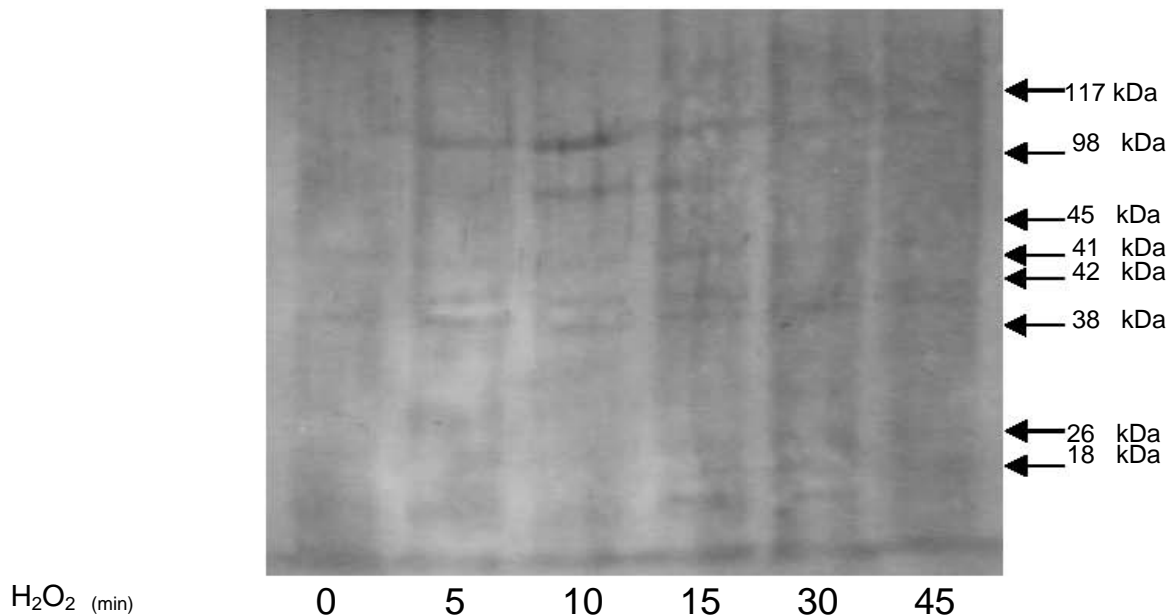
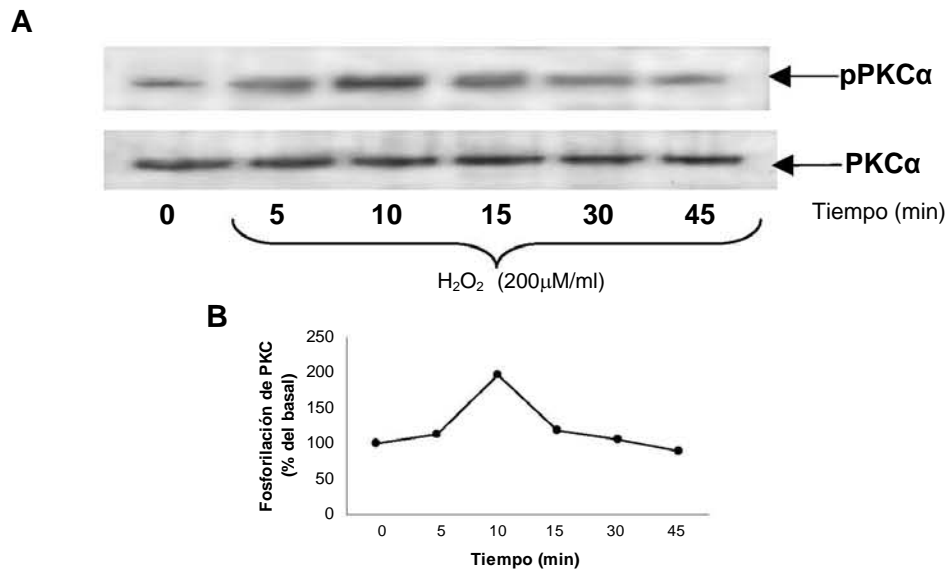


Figura 1. Curso Temporal de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en fibroblastos gingivales humanos tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ )

## 12.2 CURSO TEMPORAL DE LA FOSFORILACIÓN DE PKC $\alpha$ POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

La Proteína Kinasa C esta formada por distintas isoformas, mismas que pueden ser fosforiladas en respuestas a diversos agentes, entre ellos el estrés oxidativo. Para caracterizar la fosforilación de PKC $\alpha$  se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de peróxido de hidrógeno de 200  $\mu$ M, utilizando tiempos desde 5 minutos hasta 45 minutos. Observándose la fosforilación de PKC $\alpha$  con un peso molecular de 95 kDa, desde los 5 minutos de tratamiento (Fig. 2A), la mayor inducción se produce a los 10 minutos de tratamiento y la fosforilación comienza a disminuir a los 15 minutos (Fig. 2B). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir la fosforilación de manera dependiente del tiempo de la isoforma  $\alpha$  de PKC, por lo que se procedió a estudiar el patrón de fosforilación específico para cada uno de los miembros de las MAPK (ERK1/2, p38 y JNK)



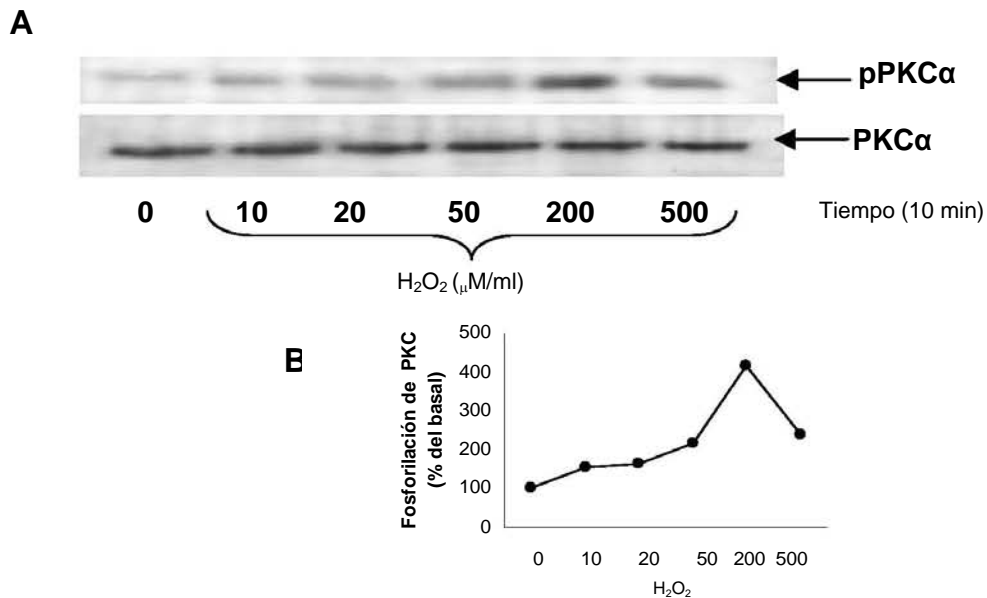
**Figura 2. Curso Temporal de la fosforilación de PKC $\alpha$  en fibroblastos gingivales humanos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A. Las células se trataron con 200  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 45 minutos respectivamente).

B. Análisis gráfico del experimento curso temporal del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en FGH sobre la fosforilación de PKC $\alpha$ . EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

### 12.3 DOSIS RESPUESTA DE LA FOSFORILACIÓN DE PKC $\alpha$ POR LA ACCIÓN DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

La Proteína Kinasa C esta formada por distintas isoformas, mismas que pueden ser fosforiladas en respuestas a diversos agentes, entre ellos el estrés oxidativo. Para caracterizar la fosforilación de PKC $\alpha$  a diferentes dosis con un tiempo de 10 minutos de tratamiento, se utilizaron diferentes dosis de peróxido de hidrógeno, desde 10  $\mu$ M hasta 500  $\mu$ M. Observándose la fosforilación de PKC $\alpha$  desde una dosis de 10  $\mu$ M (Fig. 3A) y una mayor fosforilación con una dosis de 200  $\mu$ M que continua hasta los 500  $\mu$ M (Fig. 3B). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir la fosforilación de manera dependiente de la dosis de la isoforma  $\alpha$  de PKC, por lo que se procedió a estudiar el patrón de fosforilación específico para cada uno de los miembros de las MAPK (ERK1/2, p38 y JNK)



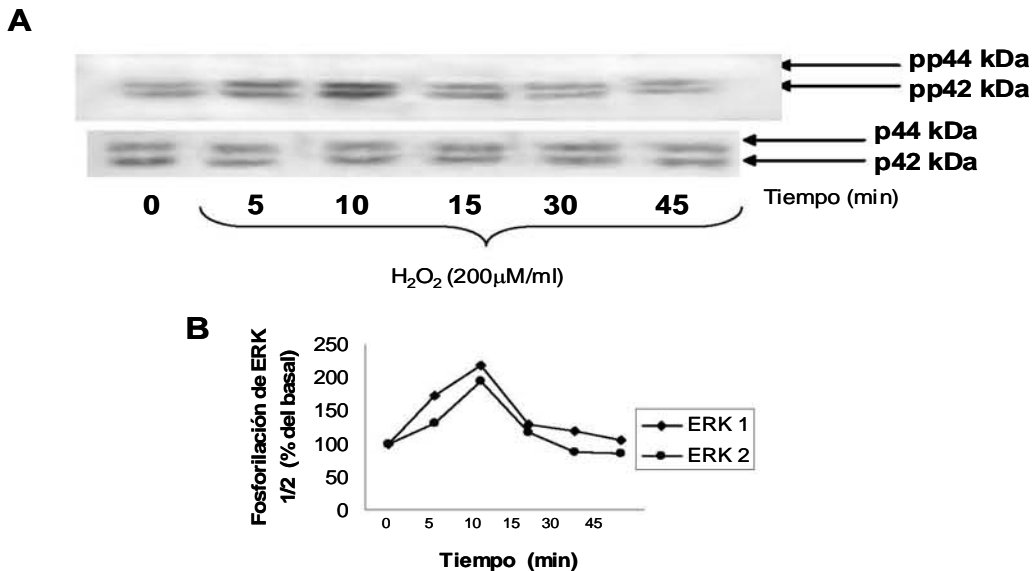
**Figura 3. Dosis Respuesta de la fosforilación de PKC $\alpha$  en fibroblastos gingivales humanos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A. Las células se trataron con dosis desde 10 $\mu$ M hasta 500 $\mu$ M durante 10 minutos.

B. Análisis gráfico de experimento dosis respuesta del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en FGH sobre la fosforilación de PKC $\alpha$ . EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.4 CURSO TEMPORAL DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

La cascada de las MAP cinasas es una de las rutas de señalización más antiguas, lo cual es muy importante para muchos procesos en la respuesta inmune. La fosforilación de las proteínas pertenecientes a esta familia se da en respuesta al estrés oxidativo entre otros muchos agentes más. Para caracterizar la fosforilación de ERK1/2 se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de peróxido de hidrógeno de 200  $\mu$ M, utilizando tiempos desde 5 minutos hasta 45 minutos. Observándose la fosforilación de ERK1/2 con un peso molecular de 41 y 42 kDa respectivamente, desde los 5 minutos de tratamiento (Fig. 4A), la mayor inducción se produce a los 10 minutos de tratamiento y la fosforilación comienza a disminuir a los 15 minutos (Fig. 4B). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2 de manera dependiente del tiempo. Por lo que se pretende caracterizar el patrón de fosforilación de otra proteína perteneciente a la misma familia de MAPK (p38).



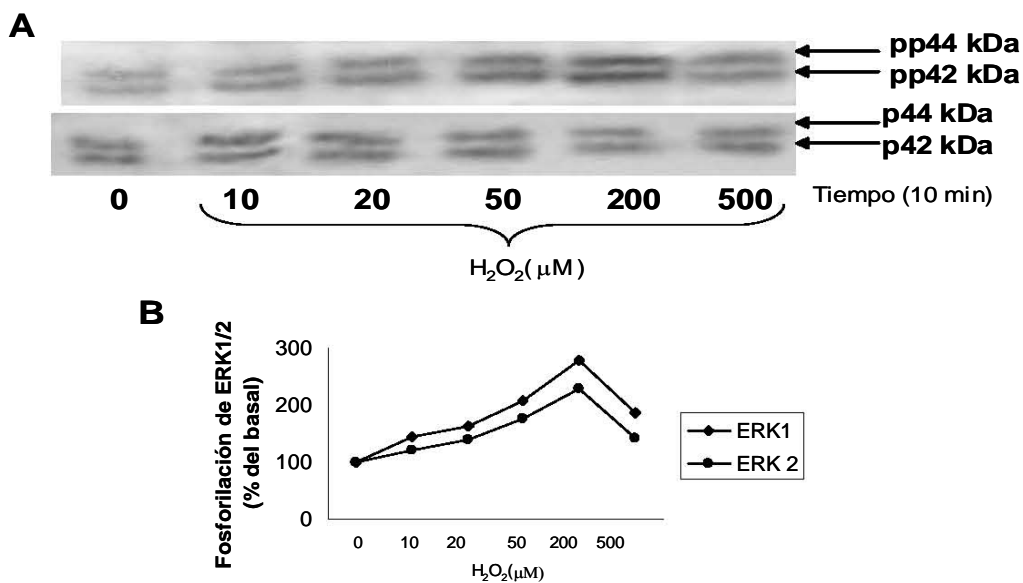
**Figura 4. Curso Temporal de la fosforilación de ERK1/2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A. Las células se trataron con 200  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 45 minutos respectivamente).

B. Análisis gráfico del experimento curso temporal del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en FGH sobre la fosforilación de ERK1/2. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.5 DOSIS RESPUESTA DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

La familia de las MAP cinasas es una de las rutas que son activadas por factores de crecimiento, estrés intracelular y otras moléculas para producir una respuesta. Para caracterizar la fosforilación de ERK1/2 a diferentes dosis con un tiempo de 10 minutos de tratamiento, se utilizaron dosis de peróxido de hidrógeno, desde 10  $\mu\text{M}$  hasta 500  $\mu\text{M}$ . Observándose la fosforilación de ERK1/2 desde una dosis de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 5A) y una mayor fosforilación con una dosis de 200  $\mu\text{M}$  que continua hasta los 500  $\mu\text{M}$  (Fig. 5B). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2 de manera dependiente de la dosis. Por lo que se pretende caracterizar el patrón de fosforilación de otra proteína perteneciente a la misma familia de MAPK (p38).



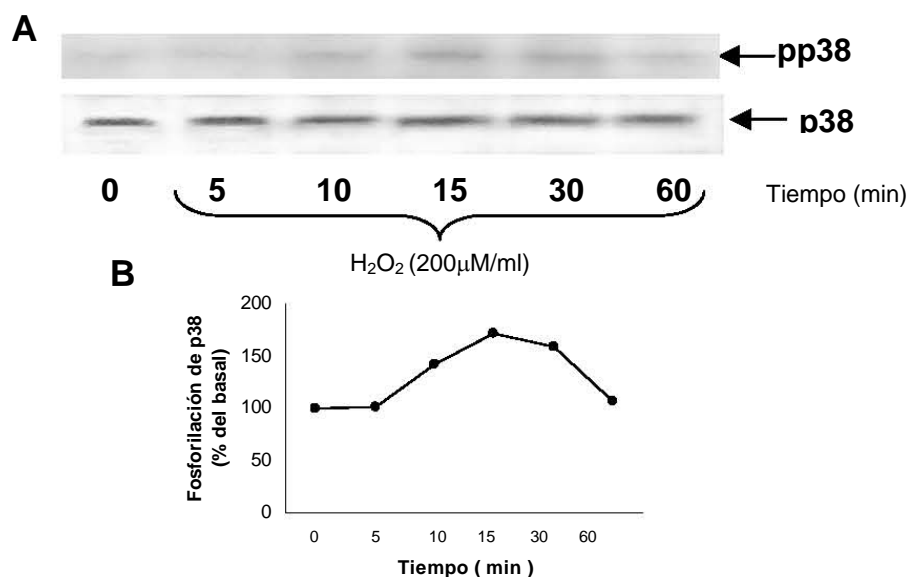
**Figura 5. Dosis Respuesta de la fosforilación de ERK1/2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

A. Las células se trataron con dosis desde 10  $\mu\text{M}$  hasta 500  $\mu\text{M}$  durante 10 minutos.

B. Análisis gráfico de experimento dosis respuesta del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en FGH sobre la fosforilación de ERK1/2. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.6 CURSO TEMPORAL DE LA FOSFORILACIÓN DE p38 POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

La proteína p38, es miembro de la familia MAPK, también se le conoce como SAPK2/RK o cinasa activada por estrés. Para caracterizar la fosforilación de p38 se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de dosis de peróxido de hidrógeno de 200  $\mu$ M, utilizando tiempos desde 5 minutos hasta 60 minutos. Observándose la fosforilación de p38 con un peso molecular de 40 kDa, desde los 10 minutos de tratamiento (Fig. 6A), la mayor inducción se produce a los 15 minutos de tratamiento y la fosforilación comienza a disminuir a los 30 minutos (Fig. 6B). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir la fosforilación de p38 de manera dependiente del tiempo. Por lo que se pretende caracterizar el patrón de fosforilación de la última proteína perteneciente a la misma familia de MAPK (JNK).



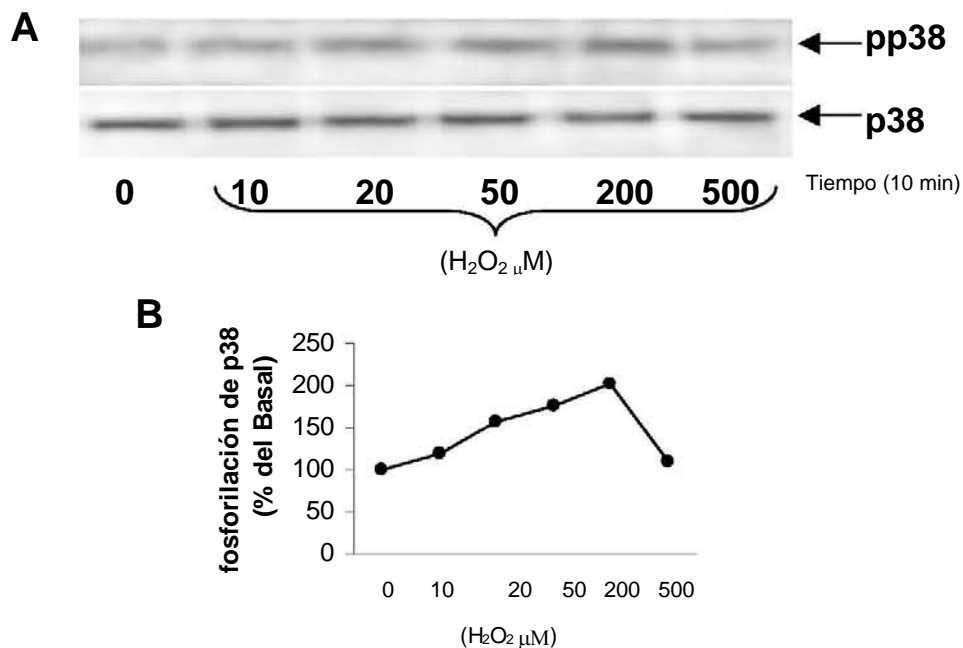
**Figura 6. Curso Temporal de la fosforilación de p38 en fibroblastos gingivales humanos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A. Las células se trataron con 200 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos respectivamente).

B. Análisis gráfico del experimento curso temporal del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en FGH sobre la fosforilación de p38. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.7 DOSIS RESPUESTA DE LA FOSFORILACIÓN DE p38 POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Se ha identificado que p38 puede ser estimulada por distintas citocinas inflamatorias como IL-1, TNF, LPS, trombina, colágena y estrés celular (estrés oxidativo). Para caracterizar la fosforilación de p38 a diferentes dosis con un tiempo de 15 minutos de tratamiento, se utilizaron dosis de peróxido de hidrógeno, desde 10  $\mu\text{M}$  hasta 500  $\mu\text{M}$ . Observándose la fosforilación de p38 desde una dosis de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 7A) y una mayor fosforilación con una dosis de 200  $\mu\text{M}$  que continua hasta los 500  $\mu\text{M}$  (Fig. 7B). Estos datos sugieren que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir la fosforilación de p38 de manera dependiente de la dosis. Por lo que se pretende caracterizar el patrón de fosforilación de la última proteína perteneciente a la misma familia de MAPK (JNK).



**Figura 7. Dosis Respuesta de la fosforilación de p38 en fibroblastos gingivales humanos tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

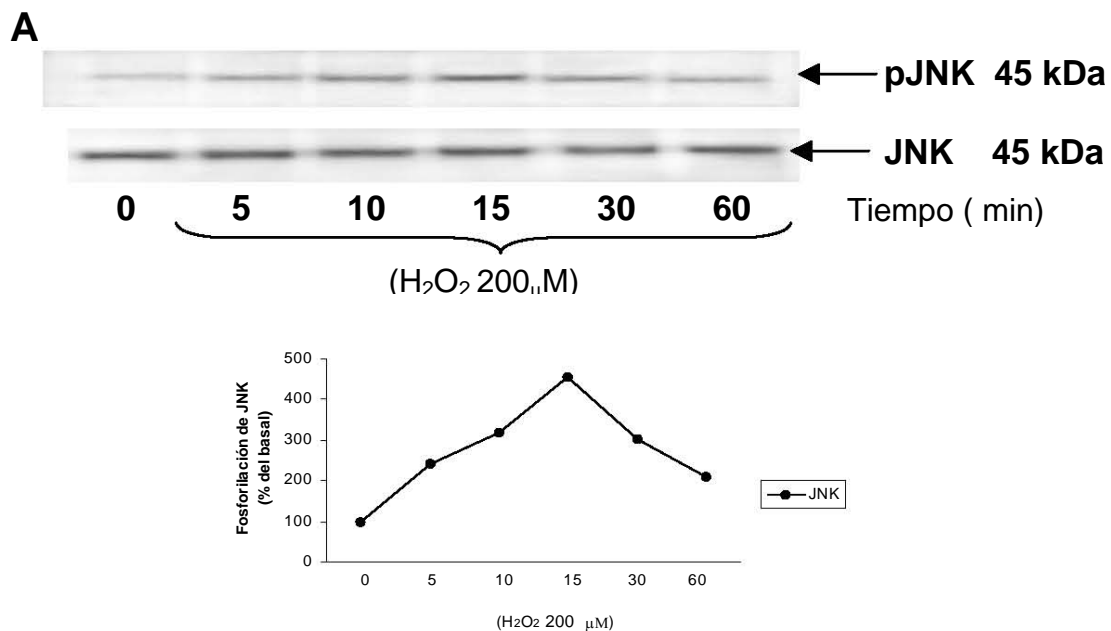
A. Las células se trataron con dosis desde 10 $\mu\text{M}$  hasta 500 $\mu\text{M}$  durante 15 minutos.

B. Análisis gráfico de experimento dosis respuesta del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en FGH sobre la fosforilación de p38. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.



## 12.8 CURSO TEMPORAL DE LA FOSFORILACIÓN DE JNK POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

La última proteína, miembro de las MAPK es JNK, cuya fosforilación en fibroblastos se ha identificado como respuesta a lipopolisacáridos (LPS) o por citocinas inflamatorias tales como TNF y IL-3, sin embargo su respuesta al estrés oxidativo no se ha caracterizado claramente. Para caracterizar la fosforilación de JNK se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de peróxido de hidrógeno de 200  $\mu$ M, utilizando tiempos desde 5 minutos hasta 45 minutos. Observándose la fosforilación de JNK con un peso molecular de 45 kDa, desde los 10 minutos de tratamiento (Fig. 8A), la mayor inducción se produce a los 15 minutos de tratamiento y la fosforilación comienza a disminuir a los 30 minutos (Fig. 8B). Estos datos sugieren que el peróxido de hidrógeno juega un papel importante como agente para promover la fosforilación de las proteínas perteneciente a las MAPK, como JNK.



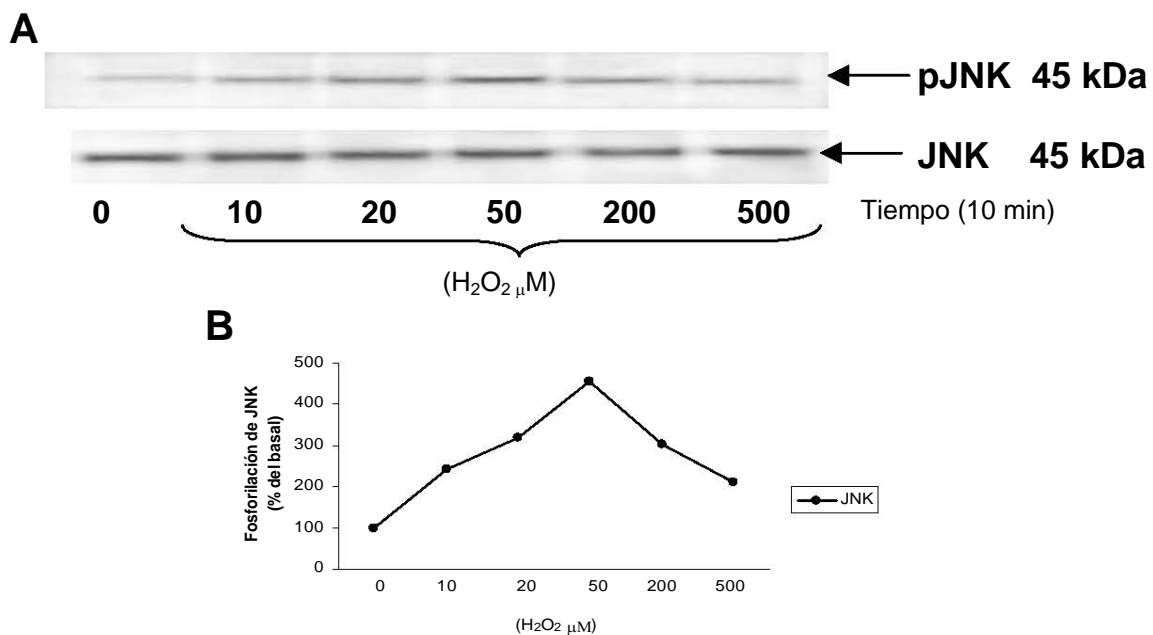
**Figura 8. Curso Temporal de la fosforilación de JNK en fibroblastos gingivales humanos tratados con  $H_2O_2$ .**

A. Las células se trataron con 200 $\mu$ M de  $H_2O_2$  a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 45 minutos respectivamente).

B. Análisis gráfico del experimento curso temporal del tratamiento con  $H_2O_2$  en FGH sobre la fosforilación de JNK. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.9 DOSIS RESPUESTA DE LA FOSFORILACIÓN DE JNK POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Se ha asociado un papel regulador a la cinasa terminal c-Jun NH<sub>2</sub> (JNK) como parte de la familia de las MAPK en respuesta al daño oxidativo. Para caracterizar la fosforilación de JNK a diferentes dosis con un tiempo de 10 minutos de tratamiento, se utilizaron dosis de peróxido de hidrógeno desde 10 μM hasta 500 μM. Observándose la fosforilación de JNK desde una dosis de 10 μM (Fig. 9A) y una mayor fosforilación con una dosis de 50 μM que continua hasta los 500 μM (Fig. 9B). Estos datos sugieren que el peróxido de hidrógeno juega un papel importante como agente para promover la fosforilación de las proteínas perteneciente a las MAPK, como JNK, de una manera dependiente de la dosis, en respuesta al estrés oxidativo.



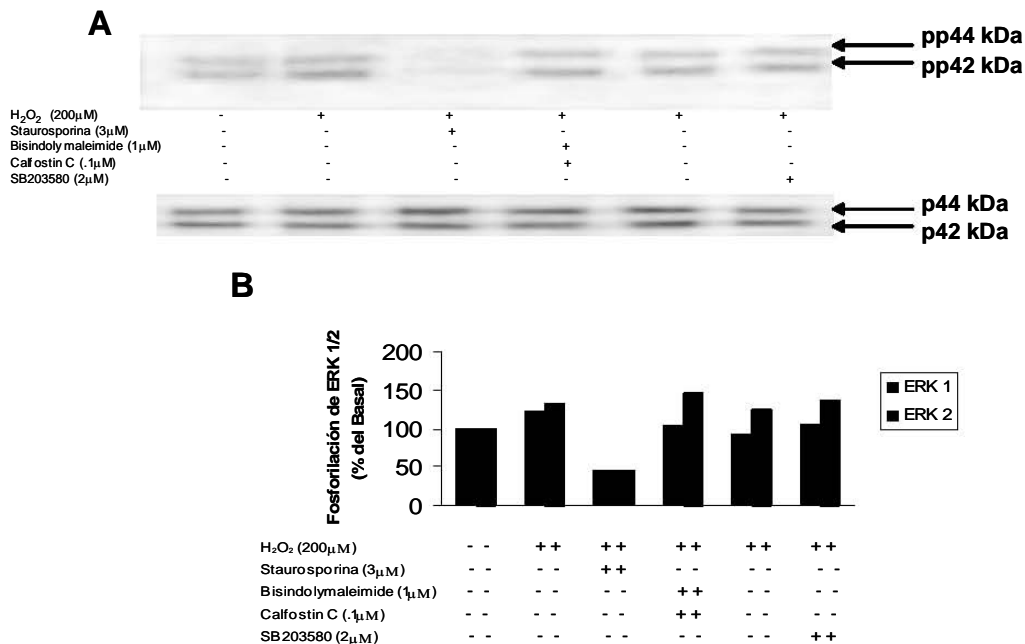
**Figura 9. Dosis Respuesta de la fosforilación de JNK en fibroblastos gingivales humanos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A. Las células se trataron con dosis desde 10μM hasta 500μM durante 10 minutos.

B. Análisis gráfico de experimento dosis respuesta del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en FGH sobre la fosforilación de JNK. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.10 INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 MEDIANTE INHIBIDORES ESPECÍFICOS PARA PKC EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS ESTIMULADOS POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

Una de las isoformas de la Proteína Cinasa C caracterizada en la regulación para la actividad de la vía de las MAPK es PKC  $\alpha$ . Para conocer a que nivel se activaba PKC $\alpha$  y de que manera se regulaba este evento, se realizó este ensayo. Se preincubaron los inhibidores específicos para PKC (Staurosporina 3 $\mu$ M, Ro 1 $\mu$ M, Calfostin C .1 $\mu$ M) y el inhibidor específico para p38 (SB203580 2 $\mu$ M) por un tiempo de 1 hora. Posteriormente se colocó peróxido de hidrógeno a una dosis de 200  $\mu$ M por un tiempo de 10 minutos (Fig. 10A). La fosforilación de ERK1/2 es inhibida por Staurosporina (3 $\mu$ M). Estos datos sugieren que PKC $\alpha$  regula la activación de la ruta de ERK 1/2, siendo por lo tanto PKC $\alpha$  el primer eslabón fosforilado, previo a la actividad de la familia de las MAPK.



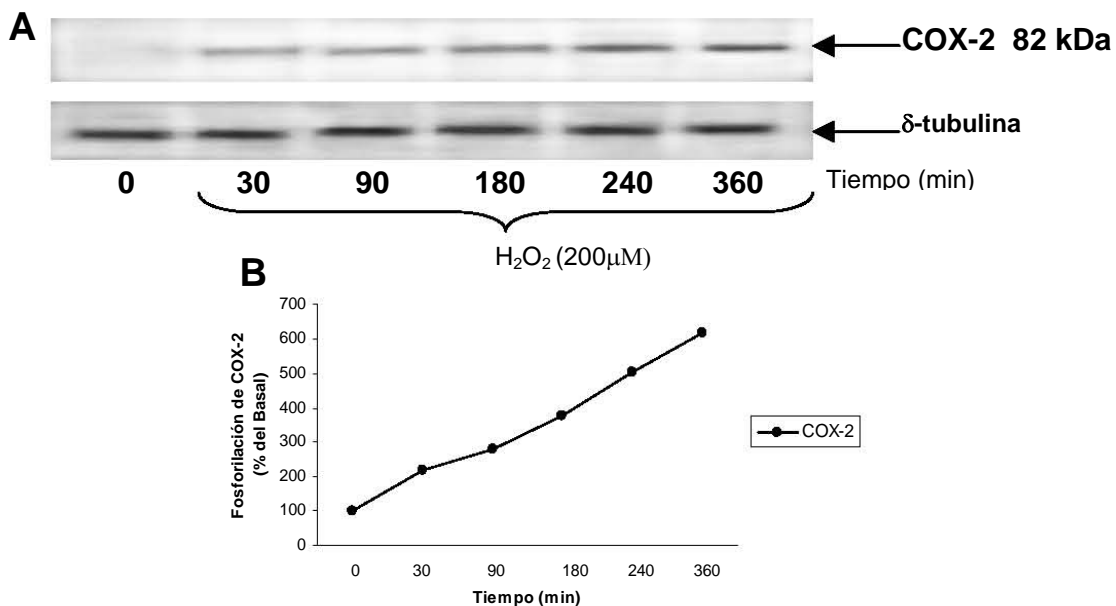
**Figura 10. Efecto del pretratamiento con inhibidores específicos de PKC y p38 sobre ERK1/2.**

A. Las células se trataron con diferentes inhibidores a distintas dosis por 1 hora y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 $\mu$ M por 10 minutos.

B. Análisis gráfico del pretratamiento con inhibidores específicos de PKC y p38 sobre ERK1/2. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.11 CURSO TEMPORAL DE LA INDUCCIÓN DE COX-2 POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Una vez que se determinó que el peróxido de hidrógeno es un agente capaz de inducir la fosforilación de PKC $\alpha$  y que esta cinasa a su vez regula la actividad de la familia de las MAPK, sobre todo de ERK1/2, el interés inmediato fue determinar que citosina se expresaba en condiciones de tratamiento similares en FGH. Para caracterizar la inducción de COX-2 se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de peróxido de hidrógeno de 200  $\mu$ M, utilizando tiempos desde 30 minutos hasta 6 horas. Observándose la inducción de COX-2 con un peso molecular de 82 kDa, desde los 30 minutos de tratamiento (Fig. 11A), la mayor inducción se produce a las 4 horas de tratamiento y se mantiene hasta las 6 horas (Fig. 11B). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir la expresión de COX-2 de manera dependiente de la dosis y del tiempo. Por lo que el siguiente objetivo fue tratar de identificar específicamente dentro de las MAPK, que proteína regulaba directamente la expresión de COX-2.



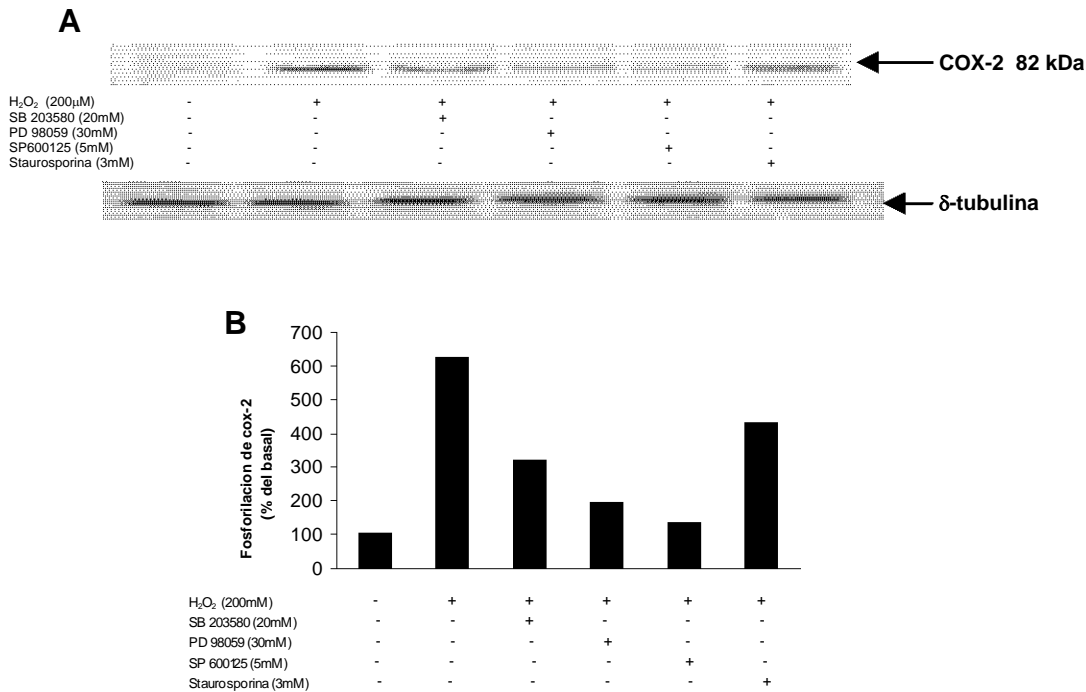
**Figura 11. Curso Temporal de la inducción de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A. Las células se trataron con 200 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos (0, 30, 90, 180, 240 y 360 minutos respectivamente).

B. Análisis gráfico del experimento curso temporal del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en FGH sobre la inducción de COX-2. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.12 INHIBICIÓN DE INDUCCIÓN DE COX-2 MEDIANTE INHIBIDORES ESPECÍFICOS PARA MAPK Y PKC EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS ESTIMULADOS POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

Para caracterizar si las MAPK (ERK1/2, p38, JNK) y PKC $\alpha$  regulaban la inducción de COX-2, se realizó este ensayo. Se preincubaron los inhibidores específicos para p38 (SB203580 20mM), ERK 1/2 (PD 98059 30mM), JNK (SP600125 15mM) y de PKC (Staurosporina 3 $\mu$ M) por un tiempo de 1 hora. Posteriormente se colocó peróxido de hidrógeno a una dosis de 200  $\mu$ M por un tiempo de 10 minutos (Fig. 12A). La inducción de COX-2 es inhibida por PD98959 y en mayor medida por SP600125. Estos datos sugieren que JNK y ERK1/2 regulan de manera directa la expresión de COX-2 inducida por peróxido de hidrógeno.



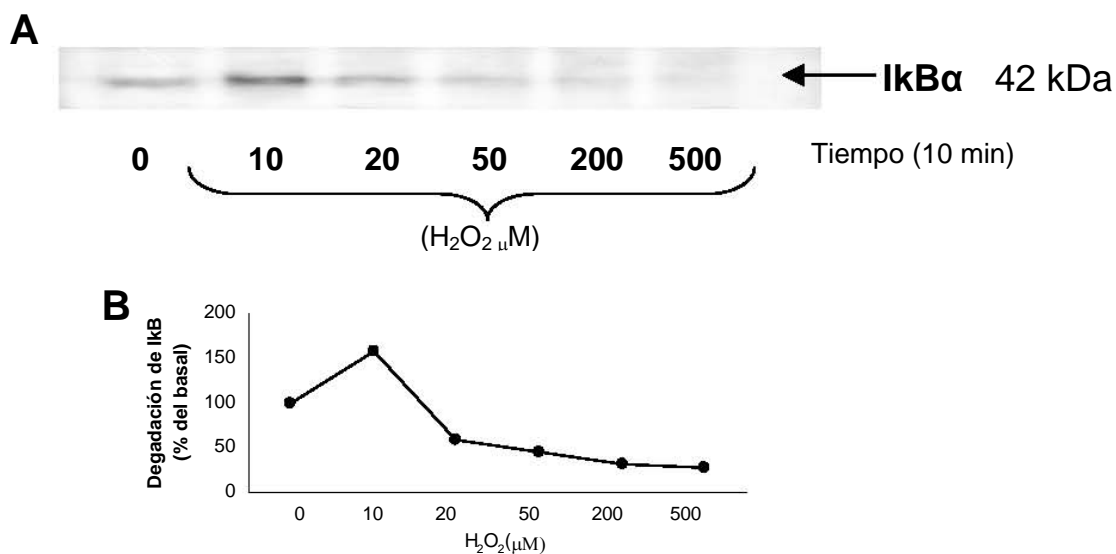
**Figura 12. Efecto del pretratamiento con inhibidores específicos de MAPK y PKC sobre COX-2.**

A. Las células se trataron con diferentes inhibidores a distintas dosis por 1 hora y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 $\mu$ M por 10 minutos.

B. Análisis gráfico del pretratamiento con inhibidores específicos de MAPK y PKC sobre COX-2. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

### 12.13 DEGRADACIÓN DE I $\kappa$ -B $\alpha$ POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

Con el propósito de estudiar los efectos posteriores a la activación de las MAPK y de la enzima COX-2 se estudio el efecto que tiene el peróxido de hidrógeno como promotor de la degradación de I $\kappa$ -B $\alpha$  (proteína inhibitoria del factor de transcripción NF- $\kappa$ B) mediante el siguiente ensayo. Para caracterizar la degradación de I $\kappa$ -B $\alpha$  a diferentes dosis con un tiempo de 10 minutos de tratamiento, se utilizaron dosis de peróxido de hidrógeno, desde 10  $\mu$ M hasta 500  $\mu$ M. Observándose la degradación de I $\kappa$ -B $\alpha$  desde una dosis de 40  $\mu$ M (Fig. 13) y manteniéndose hasta los 500  $\mu$ M. La degradación de I $\kappa$ -B se detectó aislando la fracción citoplásmica de FGH. Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno promueve la degradación en el citoplasma de I $\kappa$ -B $\alpha$  permitiendo la traslocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B al núcleo en fibroblastos gingivales humanos.



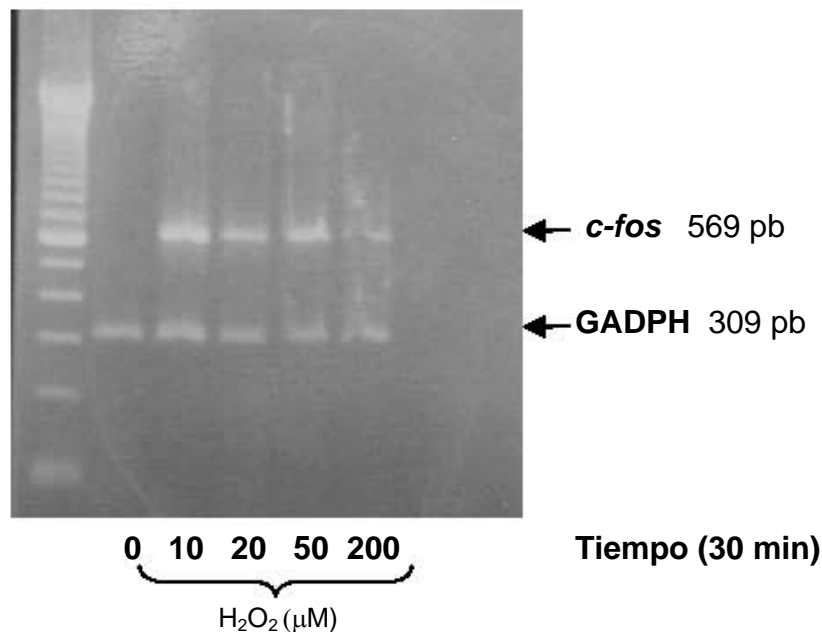
**Figura 13. Dosis Respuesta de la degradación de I $\kappa$ B en fibroblastos gingivales humanos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A. Las células se trataron con dosis desde 10 $\mu$ M hasta 500 $\mu$ M durante 10 minutos.

B. Análisis gráfico de experimento dosis respuesta del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en FGH sobre la degradación de I $\kappa$ -B. EL control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software Labworks.

## 12.14 DOSIS-RESPUESTA DE LA INDUCCIÓN PARA LA EXPRESIÓN DE *c-fos* POR LA ACCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS MEDIANTE AISLAMIENTO DE mRNA Y RT-PCR.

Después de reconocer que en FGH el peróxido de hidrógeno induce la fosforilación de MAPK, que esto es inicialmente regulado por PKC $\alpha$ , y que JNK y ERK 1/2 están involucrados en la expresión de COX-2, además de la degradación de I $\kappa$ -B también inducida por este agente, se pretende reconocer la expresión génica ligada a este modelo. Para caracterizar la inducción de la expresión del oncogene *c-fos* se realizaron ensayos de tipo dosis respuesta en un tiempo de 30 minutos de tratamiento. Se utilizaron dosis de peróxido de hidrógeno, desde 20  $\mu$ M hasta 200  $\mu$ M. Observándose la inducción de la expresión de *c-fos* (569pb) desde 20  $\mu$ M en un tiempo de 30 minutos de tratamiento. Se utilizó como control GADPH de 309 pb (Fig. 14). Estos datos sugieren que el peróxido de hidrógeno en FGH es promotor de la expresión de *c-fos* y que para que se de tal evento tiene que ser regulado por la fosforilación, expresión y degradación de otras proteínas ligadas a esta respuesta celular



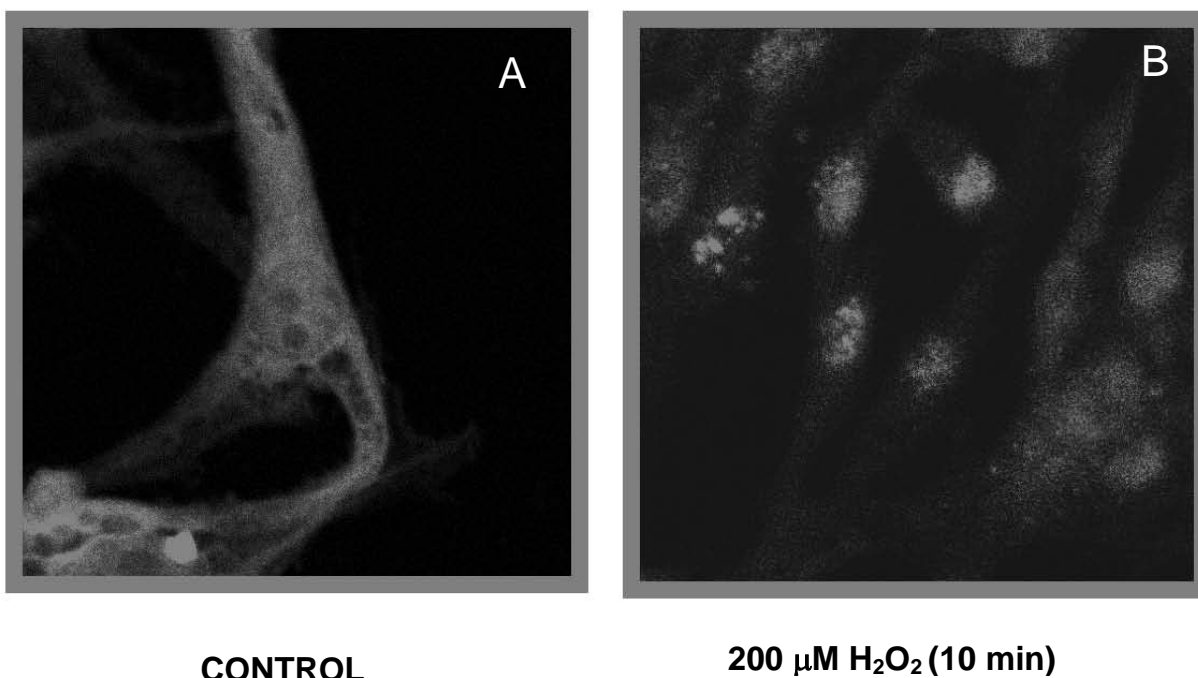
**Figura14.** Dosis Respuesta de la inducción de la expresión de *c-fos* en fibroblastos gingivales humanos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A. Las células se trataron con dosis desde 20 $\mu$ M hasta 200 $\mu$ M durante 10 minutos, se realizó aislamiento de mRNA y se obtuvo cDNA mediante la reacción de la transcriptasa reversa de la reacción de la polimerasa en cadena. (RT-PCR)

## 12.15 EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA INMUNOLocalIZACIÓN DE pERK 1/2 POR MICROSCOPIA CONFOCAL.

Para observar si ERK1/2 una vez que se ha fosforilado por el tratamiento con peróxido de hidrógeno se translocaba al núcleo o permanecía en el citoplasma de fibroblastos gingivales humanos (FGH), se realizaron ensayos de inmunohistoquímica. La observación se realizó mediante microscopia confocal.

Se observa que p-ERK 1/2 se localiza en el citoplasma celular en ausencia del tratamiento con peróxido de hidrógeno (Fig.15A). Se trataron las células con 200  $\mu$ M de peróxido de hidrógeno por 10 minutos y se observa la translocación de p-ERK 1/2 al núcleo celular de FGH (Fig.15B).



**Figura 15. Inmunolocalización de pERK1/2 en Fibroblastos Gingivales Humanos.**

A. Se realizó el cultivo de FGH hasta la semiconfluencia y se procesaron las células para ensayo de inmunohistoquímica en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se incubó el anticuerpo anti p-ERK (5 $\mu$ l) y fluoresceína (5 $\mu$ l). Se observa pERK1/2 en el citoplasma .

B. Se realizó el cultivo de FGH hasta la semiconfluencia y se procesaron las células para ensayo de inmunohistoquímica adicionando 200 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos. Se incubó el anticuerpo anti p-ERK 1/2 (5 $\mu$ l) y fluoresceína (5 $\mu$ l). Se observa la translocación al núcleo de pERK1/2.



### 13. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha pretendido por una parte, reconocer la importancia que para la Odontología actual representa la estética dental, específicamente este método tan ampliamente utilizado que es el blanqueamiento dental sin dejar de lado las otras especificaciones de su uso para terapéuticas quirúrgicas y por otra parte estudiar la posibilidad de daño celular causado a nivel de tejidos blandos.

El blanqueamiento dental, más allá de la breve revisión a la aplicación clínica y su apreciación visual, se estudio como “peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )”, especie reactiva del oxígeno y el daño que le ocasiona a la célula más abundante en la encía de los seres humanos :los fibroblastos gingivales.

En odontología, el peróxido de hidrógeno al 3% ha sido ampliamente utilizado primeramente como agente hemostático en cirugía periodontal y como agente reductor de placa porque disminuye los niveles de microorganismos involucrados en la enfermedad periodontal. Sin embargo el peróxido de hidrogeno se ha utilizado con propósitos estéticos, generalmente en el blanqueamiento dental, en un porcentaje mayor a 3.<sup>42</sup>

El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio celular causado por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el mal funcionamiento de su sistema antioxidante. Normalmente las ROS incluyen: aniones superoxidos, radicales hidroxilos y peróxido de hidrógeno, que tienen la capacidad de crear daño en varios niveles moleculares incluyendo el DNA, proteínas y lípidos. Algunos autores refieren que el daño producido por ROS o estrés oxidativo juega un papel importante en varios procesos fisiológicos y patológicos, tales como inflamación, carcinogénesis, enfermedades neurodegenerativas y cáncer.<sup>4, 5,7.13, 14, 16, 29,30</sup>

Un aspecto importante de los efectos biológicos de las ROS, es su papel como regulador en la muerte celular, debido a que puede actuar como activador directo de la muerte celular o como segundo mensajero en el proceso de muerte celular activado por algunos otros estímulos como agentes quimioterapeúticos anticancerígenos, UV, radiación ionizante y factor de necrosis tumoral (TNF).<sup>13, 30</sup>

Sin embargo existen algunos otros reportes que sugieren que las ROS, tienen algunas propiedades que permiten tener efectos reguladores en algunas moléculas tales como caspasas, factores de transcripción (NF- $\kappa$ B y AP-1) y algunas cinasas activadas por estrés celular.<sup>13</sup>

Más recientemente, se ha reconocido a ROS como agentes que pueden regular de manera importante la señalización, crecimiento, proliferación y muerte celular.<sup>14</sup>

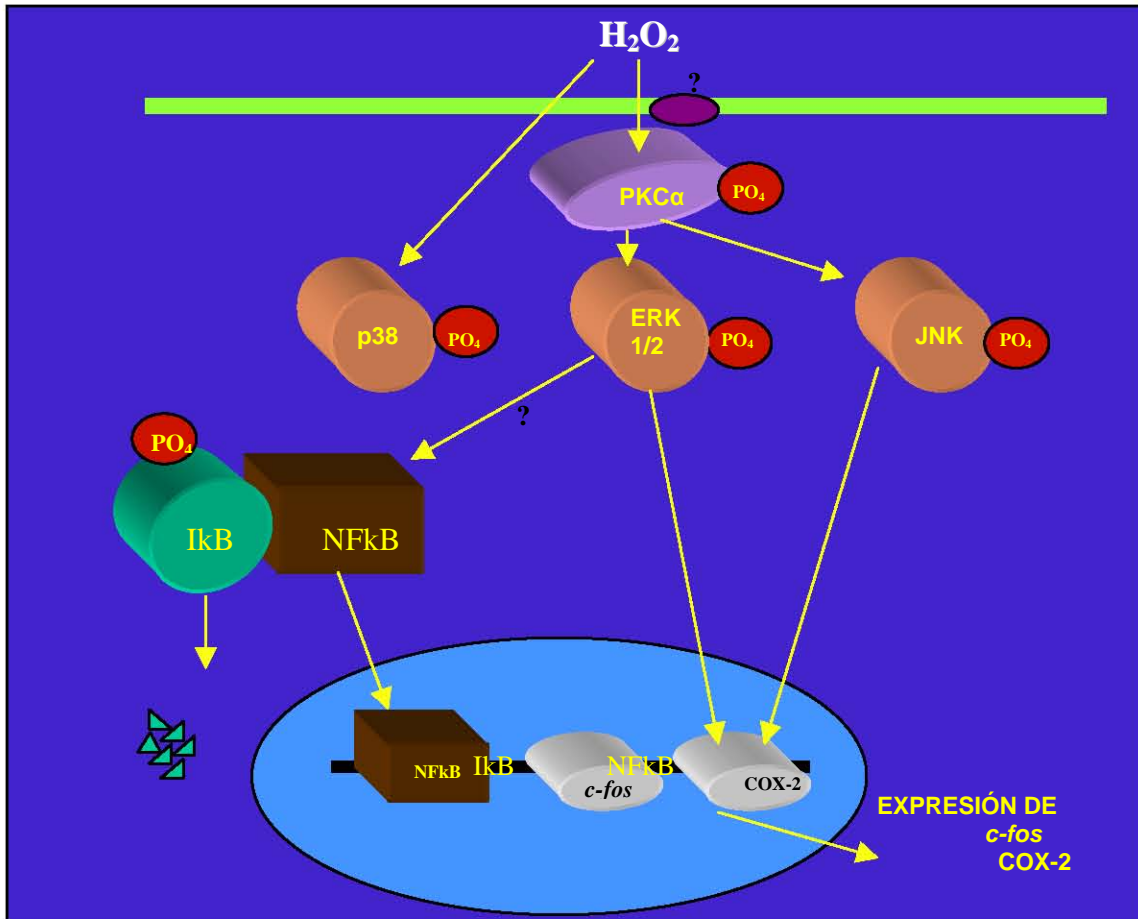
El mecanismo por el cual el peróxido de hidrógeno como parte de las ROS, actúa ha sido poco entendido. Existen algunas evidencias que indican que la actividad es a partir del receptor de tirosina cinasa, sin embargo se conoce un proceso llamado "transactivación", en donde se involucra a un ligando independiente de la estimulación del receptor, para la actividad de la tirosina cinasa. En este orden, la transactivación inducida por peróxido de hidrógeno para el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) y para el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) requieren una revisión considerable. Para la transactivación del receptor para EGF por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se requiere de la inducción de la fosforilación de JNK y fosfolipasa C.<sup>14</sup>

Existen reportes que indican la importancia de la ruta de señalización intracelular en donde están involucradas las cinasas ERK y AKT para permitir la supervivencia celular en respuesta al estrés oxidativo.<sup>16</sup>

Algunos investigadores señalan que los radicales liberados del oxígeno inducen la activación de ERK 1/2 y una segunda MAPK, p38 en miocitos cardiacos y otras células. Señalan además que la inducción de la activación de ERK1/2 es mediado directamente por la ruta de señalización de Ras/Raf/Mek. Existen reportes además de señalar el papel del peróxido de hidrógeno en la actividad de ERK 1/2, lo asocian a la expresión de la isoforma de COX-2 y la formación de prostaglandinas en cardiomiocitos neonatos. Sin embargo todavía no han se tiene bien claro cuál es el factor de transcripción intermediario entre la activación de ERK1/2 y la expresión de COX-2 en el daño celular de cardiomiocitos y el receptor asociado a este evento.

Los resultados presentados en este trabajo caracterizan la participación por un lado de las cinasas, el factor de transcripción y la citosina que regulan los efectos del estrés oxidativo en fibroblastos gingivales humanos. La familia de las MAPK con sus tres importantes subfamilias (ERK1/2, p38 y JNK) se fosforilan en respuesta al estrés oxidativo, sin embargo previo a este evento la Proteína Cinasa C en su isoforma  $\alpha$  tiene que ser fosforilada para que inmediatamente después active la cascada de señalización de MAPK, siendo específicamente ERK1/2 y JNK las que dependen directamente de esta regulación. Una vez descrito como era el evento inicial en fibroblastos gingivales humanos en respuesta a peróxido de hidrógeno, era importante reconocer que factor de transcripción estaba asociado a esta respuesta, así como la citosina y el oncogene que se expresaban. El factor de transcripción NF-kB depende para su traslocación al núcleo celular de la degradación de I $\kappa$ -B, los resultados de este trabajo muestran que I $\kappa$ -B $\alpha$  en respuesta a peróxido de hidrógeno se degrada en el citoplasma lo que permitiría que NF-kB se trasloque al núcleo. La citosina involucrada en este mecanismo de transducción es COX-2 misma que es regulada para su expresión en FGH por las 3 cinasas de la familia MAPK, siendo JNK la proteína que tiene mayor participación en este evento. Finalmente se caracterizó a nivel transcripcional la expresión del oncogene *c-fos* inducido por peróxido de hidrógeno en FGH. Lo anterior nos invita a que futuras investigaciones estén encaminadas a identificar el receptor asociado al peróxido de hidrógeno en FGH así como a reconocer vías alternas de transducción de señales en este tipo celular.

El contenido del presente trabajo nos permitiría en un determinado momento contribuir a que los efectos adversos a nivel de inflamación de tejidos blandos bucales, propiamente la encía, asociados al uso terapéutico y estético poco preventivo del peróxido de hidrógeno, pudieran ser disminuidos por adición a los diversos materiales que se utilizan para estos fines de fármacos que inhiben esta respuesta.



Modelo esquemático de la transducción de señales por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en Fibroblastos Gingivales Humanos.

## 14. CONCLUSIONES

A partir de nuestros resultados podemos concluir que:

1. El  $H_2O_2$  promueve la fosforilación de proteínas en residuos de Tirosina en fibroblastos gingivales humanos.
2. El  $H_2O_2$  promueve la actividad de los tres miembros importantes de la familia de las MAPK (ERK1/2, p38 y JNK) en fibroblastos gingivales humanos, desde 5 y 10 minutos de tratamiento.
3. La regulación antes de la fosforilación de las MAPK (ERK1/2 y JNK) por  $H_2O_2$  se lleva a cabo por la isoforma  $\alpha$  de PKC.
4. El  $H_2O_2$  induce la expresión en fibroblastos gingivales humanos de la enzima COX-2 desde las 4 horas de tratamiento y dicho evento es regulado principalmente por la cinasa JNK.
5. La degradación de I $\kappa$ B y la expresión del oncogene c-fos esta asociada a estrés oxidativo por  $H_2O_2$  en fibroblastos gingivales humanos.
6. El  $H_2O_2$  promueve la traslocación nuclear de ERK1/2 después de haber sido fosforilado.
7. La inflamación gingival y el incremento a la susceptibilidad para presentar enfermedad periodontal esta asociada a especies reactivas del oxígeno como el  $H_2O_2$ , sin embargo su capacidad y efectividad antibacterial así como su efectividad en tratamientos dentales estéticos nos invita a buscar alternativas en la inhibición de los efectos celulares inflamatorios del mismo utilizando fármacos que pudieran ser parte de la composición de productos utilizados en odontología para estos fines.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. Lindhe Jan. Periodontología clínica e implantología odontológica. Editorial Médica Panamericana. España. 2000.
2. Genco J. Robert. Periodoncia. Editorial Interamericana. Mc-Graw-Hill. México. 2004.
3. Carranza Fermín A. Newman Michael G. Periodontología Clínica. Editorial Interamericana. 9ª.ed. Mc-Graw-Hill. México. 2002.
4. Ch. Dong, R. J. Davis and R. A. Flavell. MAP Kinase in the immune response. Annu. Rev. Immunol. 2002; 20: 55-72.
5. K. Murali and K. Rao. MAP Kinase activation in macrophages. J Leuk. Biol. 2001; 69: 3-10.
6. J. M. English and M. H. Cobb. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. TRENDS in Pharmacological Sciences. 2002; 23 (1): 40-44.
7. S. Beinke and S. C. Ley. Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. Biochem. Soc. 2004; 382: 393-409.
8. Faar S.B. and Kogoma, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiol. Rev. Dec. 1991 561-585.
9. Smith J. M., Mkoji, G. M and Prichard, R.K. Depression of hydrogen peroxide dependent killing of schistosomula in vitro by peritoneal exudate cells from *Schistosoma mansoni* infected mice. Am. J. Trop. Med. 1989. 40 (2): 186-194.
10. Brophy, P.M. and Barrett, J. Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminths. Mol. Biochem. Parasitol. 1990. 42:205-212
11. J. F. Wang, X. Zhang, J. E. Groopman. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 and its Downstream Signaling Promote Cell Survival under Oxidative Stress. J. Biol. Chem. 2004; 279 (26): 27088-27097.
12. H. M. Shen, Y. Lin, S. Choksi, J. Tran, T. Jin, L. Chang, M. Karin, J. Zhang and Z. Liu. Essential Roles of Receptor-Interacting Protein and TRAF2 in Oxidative Stress-Induced Cell Death. Mol. Cell. Biol. 2004; 24 (13): 5914-5922.

13. E. J. Jo, H. Y. Lee, J. I. Kim, H. K. Kang, Y. N. Lee, J. Y. K. , Y. S. Bae. Activation of formyl peptido receptor-like 1 by WKYMVm induce serine phosphorylation of STAT3, wich inhibits its tyrosine phosphotylation and nuclear translocation induced by hydrogen peroxide. L. Sci. 2004; 75 (2004) : 2217-2232.
14. H. Konishi, M. Tanaka, Y. Takemura, H. Matsuzaki, Y. Ono, U. Kikkawa and Y. Nishizuka. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94: 11233-11237.
15. T. P. Kenny, C. L. Keen, P. Jones, H. J. Kung, H. H. Schmitz and M. E. Gershwin. Cocoa Procyanidins Inhibit Proliferation an Angiogenic Signals in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Following Stimulation by Low-Level H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Exp. Biol. Med. 2004; 765-771.
16. J. H. Jang and Y. J. Surch. Bcl-2 Attenuation of Oxidative Cell Death is Associated with Up-regulation of  $\gamma$ -Glutamylcysteine Ligase via Constitutive NF- $\kappa$ B Activation. J. Biol. Chem. 2004; 279 (37): 38779-38786.
17. Y. Wang, A. Meng and D. Zhou. Inhibition of phosphatidylinostol 3-kinase uncouples H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent phenotype and cell cycle arrest in normal human diploid fibroblast. Exp. Cell Resech. 2004; 298 (2004): 188-196.
18. S. Purdom and Q. M. Chen. Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent and independent Pathways in Hydrogen Peroxide-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Cardiomyocytes and Heart Fibroblasts. J. Pharm. Exp. Therap. 2004; 312 (3): 1179-1186.
19. F. Viela, E. Herrero, J. Torres and M. A. T. Ruiz. Pkc1 and the Upstream Elements of the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevistae*, Rom2 and Mtl1, are Required for Cellular Responses to Oxidative Stress. J. Biol. Chem. 2005.
20. H. M. Shen, Y. Lin, S. Choksi, J. Tran, T. Jin, L. Chang, M. Karin, J. Zhang and Z. Liu. Essential Roles of Receptor-Interacting Protein and TRAF2 in Oxidative Stress-Induced Cell Death. Mol. Cell. Biol. 2003; 24 (13): 5914-5922.
21. K. Chen, S.R. Thomas, A. Albano, M. P. Murphy and J. F. Keaney. Mitochondrial Function Is Required for Hydrogen Peroxide-induced growth Factor Receptor Transactivation and Downstream Signaling. J. Biol. Chem. 2004; 279 (33): 35079-35086.
22. Y. Kida, M. Kobayashi, T. Susuki, A. Takeshita, Y. Okamatsu, S. Hanazawa, T. Yasui and K. Hasegawa. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E<sub>2</sub> and matrix metalloproteinase-1 production via activation of

- MAPK/AP-1 and NF- $\kappa$ B in human gingival fibroblast. *Cytok.* 2005; 29 : 159-168.
23. S. Zhougang and R. G. Schnellmann. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced transactivation of EGF receptor requires Src and mediates ERK1/2, but not Akt, activation in renal cells. *Am. J. Physiol. Renal.* 2004; 286: 858-865.
  24. I. B. Afanasev. On mechanism of superoxide signaling under physiological and pathophysiological conditions. *Med. Hypoth.* 2005; 64: 127-129.
  25. L. Ravanti, L. Häkkinen, H. Larjava, U. S. Kere, M. Foschi, J. Han and V. M. Kähäri. Transforming Growth Factor- $\beta$  Induces Collagenase-3 Expression by Human Gingival Fibroblasts via p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (52): 37292-37300.
  26. S. K. Leivonen, A. Chantry, L. Häkkinen, J. Han and V. M. Kähäri. Smad3 mediates Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced Collagenase-3 (Matrix Metalloproteinase-13) Expression in Human Gingival Fibroblast. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (48): 46338-46346.
  27. H. Domeij, T. Modéer, T. Y. Lindberg. Matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in human gingival fibroblast: the role of protein kinase C. *J. Periodontol. Reseach.* 2004; 39 : 308-314.
  28. K. R. Eriemann, J. Rokach and W. S. Powell. Oxidative Stress Stimulates the Synthesis of the Eosinophil Chemoattractant 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic Acid by Inflammatory Cells. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (39): 40376-40384.
  29. X. C. Bai, D L. A. L. Liu, Z. Zhang, X. Li, Z. Zou, W. Zeng, B. Cheng and S. Luo. Reactive Oxygen Species Stimulates Receptor Activator of NF- $\kappa$ B ligand Expression in Osteoblast. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (17): 17497-17506.
  30. S. R. Adderley and D. J. Fitzgerald. Oxidative Damage of Cardiomyocytes is Limited by Extracellular Regulated Kinases 1/2-mediated Induction of Cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(8): 5038-5046.
  31. S. Nagano, X. Huang, R. D. Moir, S. M. Payton, R. E. Tanzi and A. I. Bush. *J. Biol. Chem.* 2004, 279 (15) : 14673-14678.
  32. L. Feng, Y. Xia, G. E. García, D. Hwang and C. B. Wilson. Involvement of Reactive Oxygen Intermediates in Cyclooxygenase-2 Expression induced by Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1699-1675.



33. Y. Lu and L. M. Wahl. Oxidative Stress Augments the Production of Matrix Metalloproteinase-1, Cyclooxygenase-2, and Prostaglandin E<sub>2</sub> through Enhancement of NF-κB Activity in Lipopolysaccharide-Activated Human Primary Monocytes. *J. Immunol.* 2005; 175: 5423-5429.
34. Y. Li, Y. Chen, J. John, J. Moylan, B. Jin, D. L. Mann and M. B. Reid. TNF-α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin 1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 2005; 19: 362-370.
35. N. Hiramatsu, A. Kasai, J. Yao, Y. Meng, M. Takeda, S. Maeda and M. Kitamura. AP-1-independent sensitization to oxidative stress-induced apoptosis by proteasome inhibitors. *BBRC.* 2004; 316: 545-552.
36. M. Jaramillo and M. Olivier. Hydrogen Peroxide Induces Murine Macrophage Chemokine Gene Transcription Via Extracellular Signal-Regulated Kinase- and Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate (cAMP)-Dependent Pathways: involvement of NF-κB, Activator Protein 1, and cAMP Response Element Binding Protein. *J. Immunol.* 2002; 169: 7026-7038.
37. Ch. Liao, Ch. Ho and J. Lin. Effects of garcinol on free radical generation and NO production in embryonic rat cortical neurons and astrocytes. *BBRC.* 2005; 329: 1306-1314.
38. J. Jiang, G. G. Borisenko, A. Osipov, I. Martin, R. Chen, A. A. Shvedova, A. Sorokin, Y. Y. Tyurina, A. Potapovich, V. A. Tyurin, S. H. Graham and V. E. I Kagan. Arachidonic acid-induced carbon-centered radicals and phospholipid peroxidation in cyclo-oxygenase-2-transfected PC12 cells. *J. Neurochem.* 2004; 90: 1036-1049.
39. V.S. Lara, F. Figueiredo, T.A. da Silva and F.Q. Cunha. Dentin-induced in vivo Inflammatory Response and in vitro Activation of Murine Macrophages. *J. Dent. Res.* 2003; 82 (6): 460-465.
40. D. Kumari, R. M. Moore, M. Elkhward, R. J. Silvery and J. J. Moore. Vitamin C Exacerbates Hydrogen Peroxide Induced Apoptosis and Concomitant PGE<sub>2</sub> Release in Amnion Epithelial and Mesechymal Cells and in Intact Amnion. Placenta. 2004; 25: 573-579.
41. W. C. Lee, C. H. Choi, S. H. Cha, H. L. Oha and Y. K. Kim. Role of ERK in Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death of Human Glioma Cells. *Neurochem. Research.* 2005; 30 (2): 263-270.
42. M. V. Marshall, L. P. Cancro and S. L. Fischman. Hydrogen Peroxide: A Review of Its Use in Dentistry. *J. Periodontol.* 1995; 66: 786-796.
43. Crispin J. Bruce. *Bases Prácticas de la Odontología Estética.* Masson.Barcelona.1998.293 págs.

44. Goldstein Ronald E. Odontología Estética. Principios de comunicación métodos terapéuticos. Ars Medica. Barcelona. 2002. 490 págs.
45. Ascheim W. Kenneth. et.al. Odontología Estética. Una aproximación clínica a las técnicas y los materiales. 2ª.ed. Mosby-Harrourt. Madrid. 2002. 600 págs.
46. Mathews K. Christopher. et.al. Bioquímica. 3ª.ed. Pearson Educacion. Madrid. 2002. 1333 págs.
47. Nelson L. David. et.al. Lehninger. Principios de Bioquímica. 3ª.ed. Ediciones Omega. Barcelona.2001. 1152 págs.
48. Cutler R.G. et.al. Critical Reviews of Oxidative Stress. Vol. 1. World Scientific. New York. 2003. 822 págs.
49. Lewin Benjamin. Genes VI. Oxford. 2000.
50. Chomczynski y Sacchi. Anal. Biochem. 1987:162,156.
51. Marks Friedch. Protein Posporylation. VHC. New York. 1996.
52. Alastair D. Reith. Protein Kinase Protocols. Methods in Molecular Biology. Vol.124. Humana Press. 2001. 365 págs.