



Universidad Nacional Autónoma de
México



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

***Activación De La Vía De Transducción De Akt Por Acción De
Los Lipopolisacáridos De A.a. En Fibroblastos Gingivales
Humanos***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

PERLA KAWASAKI CÁRDENAS

TUTOR
DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ
ASESOR
DR. 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.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo que me ha otorgado durante mi estancia como estudiante.

Al Dr. Rolando y la Dra.Gloria, que me guiaron, apoyaron y enseñaron las bases para emprender el camino.

A mis mamás, Flor y Veva, por darme siempre el ejemplo de perseverancia y honradez que forjo mi ser e impulsa mi espíritu cada día.

A mis papás y Veva, por el apoyo y amor incondicional que día a día me dieron para que cumpliera con mi objetivo.

A Carlitos, por ayudarme aún cuando no se lo pidiera y por ser mi mejor amigo.

A mis amigos, por los consejos dados y estar presentes en los momentos requeridos. Como el de ahora.

ÍNDICE

1. ABREVIATURA.....	2
2. RESUMEN	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL LPS	6
4.2 FIBROBLASTOS GINGIVALES.....	7
4.3 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	8
4.4 MECANISMOS DE ACCIÓN.....	8
4.5 PDK-1	11
4.6 AKT/PKB.....	12
4.7 PI-3K	14
4.8 GSK-3	15
4.9 β -catenina	15
4.10 CONEXINAS	17
4.11 CICLINAS	17
5. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	20
6. JUSTIFICACIÓN.....	20
7. OBJETIVO GENERAL	20
8. HIPÓTESIS.....	20
9. TIPO DE ESTUDIO.....	21
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
11. RESULTADOS.....	26

Abreviaturas
Resumen
Introducción
Antecedentes
Definición del Problema
Justificación
Objetivos
Hipótesis
Tipo de Estudio
Material y Métodos
Resultados
Discusión
Conclusiones
Literatura Citada
Anexos

Palabras clave: fibroblastos gingivales humanos, lipopolisacárido, proteína cinasa B, b-catenina, transducción de señales, cinasa-1 dependiente de fosfoinositidos, fosfatidilinositol-3 cinasa.

2. RESUMEN

El periodonto está formado por muchos tipos celulares incluyendo las células epiteliales y fibroblastos. Se cree que ambos tipos celulares reclutan células del sistema inmune por medio de mediadores solubles que contribuyen a la inflamación que están asociados con el progreso de la enfermedad periodontal, iniciado el evento por bacterias que colonizan el surco gingival, como: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, entre otros.

Los lipopolisacáridos (LPS), denominados también como endotoxinas, se encuentran en la membrana externa de las bacterias gram-negativas, siendo un componente patógeno de estos microorganismos, cuyas moléculas participan en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Estas moléculas son capaces de inducir la expresión de citocinas proinflamatorias, así como del factor de TNF- α , IL-6 y IL-10, entre otros. Sin embargo no se sabe bien el papel que juegan los fibroblastos gingivales humanos (HGF) en la enfermedad periodontal.

Con el propósito de establecer si en los HGF se activa la vía de transducción de Akt por efecto del LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, en este estudio se hicieron ensayos de Western Blot e Inmuncitoquímica. Además las células se preincubaron con wortmanina y LY294002 para determinar si PI-3K está involucrada en la activación del factor de transcripción β -catenina y si de alguna manera regula esta cascada de activación.

Encontramos que, por efecto del LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en una concentración de 1 μ g/mL, se produce la fosforilación de Akt (serina 473) desde los 5 minutos de tratamiento con una inducción máxima a los 60 minutos. Así mismo, se mostró la translocación de PDK-1 de la fracción citosólica hacia la membrana en un curso temporal; por otra parte existe la fosforilación de GSK-3 como resultado de la activación de Akt. Los eventos están ligados a PI-3K porque se utilizaron inhibidores específicos (wortmanina [50nM] y LY294002 [100nM]), durante 30 minutos causando el bloqueo de la fosforilación de Akt y GSK-3. La inactivación de GSK-3 se ha mostrado que reduce la ubiquitinación de β -catenina, resultando en la acumulación y actividad transcripcional de β -catenina. Consistentemente con lo anterior, se observó que el LPS causa el incremento de β -catenina nuclear dependiendo de PI-3K en los HGF, evento que se confirmó en la microscopia realizada donde se observa la β -catenina en el núcleo de la célula después de 6 horas tratamiento y la activación de genes dependientes de β -catenina, tales como conexina 43 y ciclina D1 (después de 3-6 horas de tratamiento).

En conclusión, los resultados sugieren que el LPS induce la activación de la vía de Akt/PI-3K/PDK1 en los HGF con la subsiguiente translocación del factor de transcripción β -catenina por la inactivación de GSK-3, eventos que están regulados por la vía de PI-3K. Además existe la presencia de las conexina43 y ciclinaD1, proteínas dependientes del factor de transcripción de β -catenina.

3. INTRODUCCIÓN

Los LPS son moléculas que encontramos como componente de la membrana bacteriana de microorganismos Gram-negativos y que son capaces de activar diferentes vías de transducción o por la unión con otras proteínas formando complejos. De esta manera, se asocian a receptores que se localizan en la membrana celular produciendo una señal del entorno al interior celular hasta la expresión de genes y la respuesta celular.

Estas señales de transducción van activando diferentes proteínas afectando de esta forma tanto el metabolismo celular como la síntesis de nuevas proteínas, lo que es de gran importancia e interés debido a que todavía está por descubrirse de que forma la célula interpreta las señales activadas por factores propios del metabolismo del organismo o por partículas externas como las endotoxinas. Es posible que un receptor se acople o active más de una vía de transducción y que de esta forma exista en el interior señalización cruzada que produzca la diferencia en la respuesta celular. Los LPS tienen la capacidad de promover procesos inflamatorios pero la forma en que los HGF responden a este evento no se ha sido dilucidado.

Resultados obtenidos en el laboratorio muestran que los LPS inducen la activación de las isoformas ERK 1/2 en tiempos cortos (10min) y a dosis fisiológicas (10ng/mL), encontramos así mismo que el receptor involucrado en este evento el receptor asociado es el TLR-4¹. Por otra parte se encontró que el LPS induce rápidamente la fosforilación de p38. Encontramos así mismo que p38 regula expresión y síntesis de la enzima óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa-2 y de nítrico óxido y prostaglandina E2².

Por otra parte experimentos preliminares muestran que la translocación del factor NF κ B es sensible al tratamiento con wortmanina (50nM) lo que sugiere que los LPS inducen la activación de la vía denominada PI-3K.

Por este motivo el objetivo de nuestra investigación consistió en determinar la activación de la cinasa Akt y establecer la forma en que se transduce esta señal, además de caracterizar la vía de transducción sensible a wortmanina y LY294002 en HGF tratados con LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Para cumplir con este propósito se identificaron los intermediarios de esta vía y se establecerá que moléculas se expresan por la activación de Akt en estas células.

En macrófagos se ha caracterizado esta vía, estableciéndose que el factor de transcripción β -catenina se activa en respuesta al tratamiento con los LPS, expresándose así mismo conexina 43 y ciclina D1, proteínas dependientes de este factor de transcripción, y que son moléculas importantes en la supervivencia celular. Otras investigaciones señalan que β -catenina induce la expresión de *c-myc*, oncogene involucrado en la apoptosis.

4. ANTECEDENTES

La enfermedad periodontal compromete los tejidos de soporte del diente. Comprende la gingivitis que afecta los tejidos superficiales de protección periodontal y la periodontitis que ataca y destruye los elementos de sostén a través de un proceso inflamatorio iniciado por la biopelícula dental².

Se ha visto que la actividad frustrada del sistema inmune del huésped hacia la acumulación de placa (subgingival) es el origen de la enfermedad periodontal porque hay pérdida de los tejidos de soporte del diente.

En la periodontitis agresiva localizada (juvenil), el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* está fuertemente asociado³ y en la periodontitis del adulto^{4, 5, 6} esta bacteria además está implicada en la patogenésis de varias infecciones tales como endocarditis, pericarditis, meningitis, osteomielitis, efisema y abscesos subcutáneos⁷. Es una bacteria gram-negativa, de forma pleomórfica pequeña con extremos redondeados, no móvil, sacarolítico, fermentativo, cocobacilo. Esta bacteria posee o produce múltiples factores de virulencia incluyendo la presencia en su superficie del LPS molécula denominada leucotoxina que se considera como el factor patógeno de la enfermedad periodontal. Su pared posee una membrana externa con abundante concentración de LPS cuya porción interna, lipídica (lípidio A) constituye a la endotoxina. El LPS estimula a la célula hospedera para producir citocinas inflamatorias, mediadores proinflamatorios e induce la resorción del hueso⁸. En un estudio se demostró que el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es citotóxico para los HGF, ya que se produce desde los 10 minutos de tratamiento, la inhibición de la proliferación celular, disminución en la síntesis de la tasa de DNA y un cambio morfológico⁹. Estudios previos han mostrado la presencia de células apoptóticas de macrófagos infectados con *Actinobacillus actinomycetemcomitans*¹⁰ y el posible involucramiento de CD14¹¹ y PKC¹², se ha demostrado que una toxina purificada de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, causa disminución del ciclo celular en la fase G₂/M y apoptosis en las células HS-72 (linfocitos B). Estos datos sugieren que la habilidad de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* puede promover la apoptosis en varios tipos celulares y, por lo tanto, ser importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

El LPS de los microorganismos Gram-negativos es el más conocido de todos sus factores de virulencia, componente vital de la membrana celular de estas bacterias, en particular la molécula "lípidio A" de éste, que es la verdadera fracción antigénica capaz de inducir la producción de IL-1, TNF- α , INF- γ , inhibidor del plasminógeno, factor hístico de adhesión, y PG. La porción lipídica de los LPS es dañina para el organismo humano y para otros animales, ya que se considera el agente causal del choque séptico.

Los LPS participan como mediadores de procesos inflamatorios. Se ha determinado que estas macromoléculas actúan en todas las células que conforman la encía y en donde inician una cascada de procesos que deterioran las estructuras orales hasta producir la muerte celular programada^{13,10, 14}. Algunos estudios muestran que al tratar tejidos con diversos tipos de LPS se promueve la expresión de mediadores inflamatorios nocivos sobre el tejido del huésped^{2, 15, 16}.

Entre las bacterias gram-negativas que presentan LPS en su pared celular podemos mencionar a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Salmonella enteritidis*, entre otros; los LPS de estas bacterias presentan muy poca variabilidad estructural de una especie a otra, pero para la realización de este estudio se ha trabajado con los LPS de la bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, ya que algunos investigadores han mostrado que es la bacteria principal en la periodontitis juvenil^{3,2,15,16,17}. Kato S., Nakashima K., Inoue M., Tomioka J., Nonaka K., Nishihara T., et al.,¹³ mostraron que el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* produce muerte celular apoptótica en células epiteliales orales en un sistema de cultivo *in vitro*.

4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL LPS

Los LPS se localizan en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. La membrana externa es una bicapa lipídica muy asimétrica. En la monocapa externa hay proteínas y lipopolisacárido, mientras que en la monocapa interna el lipopolisacárido es sustituido por fosfolípidos y lipoproteínas

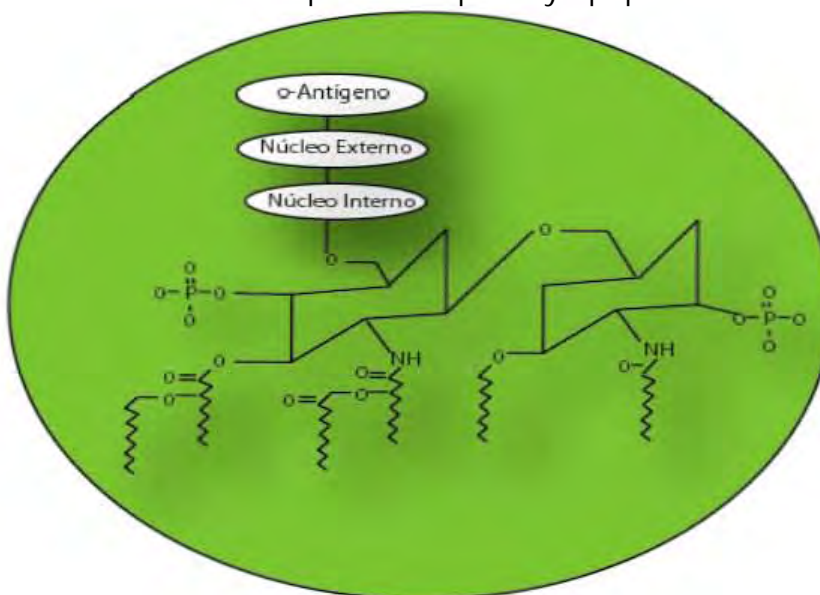


Figura 1. Estructura química del LPS.

El lipopolisacárido está formado por tres estructuras: el lípido A, un polisacárido central y un O-polisacárido.

La estructura química de los LPS consiste en tres regiones: 1) lípido A; 2) un polisacárido central que contiene heptosa y 3) un polisacárido O-específico. El lípido A es la estructura interna formada por octosa 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) y heptosa, posee por lo tanto la característica de ser hidrofóbica y cuando se posee el mínimo requerimiento para el crecimiento (llamada Re LPS) que consta del lípido A y dos unidades de KDO adquiere su característica hidrofóbica al antibiótico e hipersensible al detergente. La región formada por el polisacárido O-específico le confiere la especificidad serológica de los LPS y el lípido A es la endotoxina donde en un extremo tiene grupos fosfatos y en el otro extremo ácidos grasos. Por lo tanto, esta composición química de la molécula le confiere la propiedad anfifílica². Los LPS al estar aislados, forman arreglos micelares que son biológicamente activos.

4.2 FIBROBLASTOS GINGIVALES

Los fibroblastos se han descrito como células delgadas y alargadas con un núcleo oval con la habilidad de sintetizar y modificar los componentes de la matriz extracelular¹⁸ para mantener la integridad del tejido conectivo. Son el tipo celular residente dominante en el periodonto¹⁹. Se clasifican en dos tipos: El primer tipo es el que conforma los fibroblastos del ligamento periodontal (FLP)^{20,21} y el segundo son los fibroblastos de la encía y entre las diferencias que existen son que poseen morfologías diferentes^{8,22}. Los fibroblastos gingivales forman el tejido conectivo que rodea al hueso alveolar capaces de sintetizar colágeno tipo I y tipo III^{23,24} y elastina al igual que glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Se reproducen rápidamente y contienen en poca cantidad microfilamentos contráctiles en comparación con los FLP^{5,25}. Ko, Page, and Narayanan, reportaron²⁶ que los cultivos de fibroblastos son heterogéneos en cuanto a su nivel celular y población. Estas células secretan una variedad de citocinas inflamatorias y mediadores químicos²⁷. Estudios realizados en macrófagos, células epiteliales, fibroblastos, entre otros, ponen en evidencia que las citocinas poseen un papel importante no solo en la homeostasis, sino también en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas. Las citocinas son importantes para conservar la homeostasis y son expresadas constitutivamente por células residentes que componen al tejido. En la periodontitis están implicados tanto factores microbianos como las reacciones inmunopatológicas. Los FG responden ante agentes inflamatorios como prostaglandina E2¹⁷ y liberan IL-8 y la proteína quimotáctica monocítica 1 (MCP-1). Los LPS de *Porphyromonas gingivalis* provocan la liberación de citocinas en la célula huésped incluyendo macrófagos y fibroblastos²⁸.

Los fibroblastos gingivales son capaces de responder a estímulos tales como LPS, IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . Koka, Maze, Reinhart, Dyer,² observaron que el LPS de *Porphyromonas gingivalis* induce mediadores de la inflamación liberados por fibroblastos humanos y esta respuesta depende del sujeto, de donde fueron aisladas las células de la superficie de la muestra usada para preparar las células, fibroblastos gingivales o fibroblastos del ligamento periodontal y de el mediador

examinado (IL-1, IL-6 o PGE2). Se ha reportado que los efectos de IL-1 y TNF- α están involucrados en la regulación de IL-6 por el fibroblasto más que por el efecto directo del LPS de la bacteria²⁹. Por otra parte, los fibroblastos aislados de tejido enfermo producen de forma constitutiva grandes cantidades de IL-6, al igual que es inducido³⁰.

4.3 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La célula para poder responder a diferentes tipos de mecanismos o agresiones, necesita mensajeros internos y también externos para que esto se traduzca en la conservación de la homeostasis celular.

El mecanismo por el cual actúa la célula implica lo que llamamos transducción de señales -mecanismo mediante el cual la célula convierte una señal del medio extracelular, en una respuesta específica-. Estos son de suma importancia, porque si existiera algún tipo de desorden en este mecanismo desarrollaría eventos inmunológicos y endócrinos aberrantes, por mencionar algunos, se encuentra el desorden autoinmune, el pseudoparatiroidismo y la diabetes tipo II³¹.

La importancia de estas señalizaciones radica en la fosforilación de las proteínas (que es reversible) porque va a ver un cambio en su estructura lo que trae consigo que se pueda activar alguna función o que a su vez se active y desencadene una serie de vías de señalización¹⁵; dentro de la célula, este es su mejor lenguaje de comunicación para su desarrollo.

Los sitios fosforilados son usualmente un grupo hidroxil específico para residuos de serina/treonina, y tirosina. El sistema de proteínas fosforiladas está compuesto de un mínimo de tres partes: Fosfoproteínas, que tienen propiedades de fosforilación y desfosforilación. Proteínas cinasas, que transfieren grupos fosfatos de ATP a proteínas en residuos específicos para serina, treonina y tirosina. Proteínas fosfatasas, que desfosforilan la fosfoproteína, de ese modo es restaurado el sistema particular de las proteínas fosforiladas a su estado basal.

4.4 MECANISMOS DE ACCIÓN

El descubrimiento en 1986³² de una proteína plasmática llamada proteína de unión al LPS (LBP) fue el evento más importante para descifrar los mecanismos de activación celular inducidos por LPS. La proteína LBP está presente en el suero normal a concentraciones menores a 0.5 $\mu\text{g/mL}$, y se eleva hasta 5.0 $\mu\text{g/mL}$ después de una respuesta de fase aguda¹⁵. LBP es sintetizada en los hepatocitos y luego es liberada en el plasma en forma^{15,21}. Después de una inyección con LPS, hay un aumento 20 veces mayor de la expresión basal de los niveles de RNAm en hepatocitos, lo que sugiere que el LPS estimula la expresión de LBP. Por otra parte la síntesis de LBP por los hepatocitos es controlada por LPS, IL-1, TNF- α , IL-6 y glucocorticoides y el pretratamiento con LPS predispone a los hepatocitos a

responder a LPS, TNF- α e IL-1 para la síntesis de LBP¹⁶.

La unión específica de la LBP al LPS se da a través del lípido A. La caracterización de la función de LBP como determinante de las respuestas celulares a LPS reveló un mecanismo para la activación celular inducida por LPS que involucraba un receptor de membrana para el complejo LPS-LBP^{15, 33}.

Se ha identificado que el receptor a LPS es la proteína CD14, que es una glucoproteína y se sabe que CD 14 juega un papel clave en la activación celular inducida por LPS^{34, 35}, CD14 puede encontrarse como una proteína sérica soluble (sCD14) y también puede estar anclada a la membrana de células mieloides (mCD14) a través del glucosilfosfatidilinositol (GPI)³⁶ participando en la activación de células antes mencionadas mientras que sCD14 participa en la activación de células no mieloides, como células endoteliales o epiteliales, que normalmente no expresan mCD14³⁷.

Al entrar el LPS a la circulación, la proteína LBP se le une rápidamente, y los complejos LPS-LBP resultantes son reconocidos por el receptor CD 14 de células mononucleares^{38, 39}. Éste, unido al complejo, puede activar la síntesis de TNF- α en estas células, ya sea de manera directa o indirecta, transportando al LPS a la superficie celular, de manera que otras proteínas son estimuladas, en cualquiera de los 2 casos, el mecanismo de acción entre CD14 y LBP difiere de los mecanismos usuales por medio de los cuales las células eucarióticas responden a otros agonistas, como hormonas o linfocinas. La unión del agonista (LPS) es mediada por una proteína soluble que es el sCD14, en lugar de una proteína unida a membrana. Únicamente después de la formación de un complejo soluble, es posible que el LPS se asocie con un receptor de membrana.

CD14 es la única proteína de estructura bien definida que se une a LPS y es el mediador de la activación celular inducida por ellos mismos³⁴. Se tiene evidencia que existen caminos alternativos coexistentes. Sin embargo, se ha visto que CD11/CD18¹⁶, un miembro de la familia de integrinas leucocíticas, también funciona como un receptor de señal transmembranal para LPS.

Estas glucoproteínas no tienen dominio citoplasmático se expresan en la superficie de monocitos, macrófagos y granulocitos. Las señales intracelulares probablemente estén mediadas por la interacción con un receptor adicional⁴⁰. Los LPS inducen fosforilación de tirosinas de una proteína de 74-kDa que es estrictamente dependiente de CD14. Por otro lado, anticuerpos anti-CD14 bloquean la fosforilación de tirosinas inducida por LPS de proteínas de 41 y 42-kDa a concentraciones de LPS menores a 100 ng/mL, pero no hubo bloqueo cuando se utilizó concentraciones mayores de LPS. Estos hallazgos sostienen la existencia de un camino dependiente de CD14 y otro camino independiente de CD14 para la secreción de citocinas inducidas por LPS⁴¹. Aunque en ratones transgénicos que sobre expresan CD14 humano se observa una alta respuesta a

los LPS⁴². Estas observaciones son consistentes con el papel que juega CD14 en la activación y producción de citocinas.

En 1997, el grupo de Janeway reportó la clonación de un receptor con estructura similar a la de los receptores de respuesta inmune de *Drosophila*, llamados *receptores tipo Toll (Toll like receptors –TRL–)* identificados en humanos, este grupo de receptores pertenece a la gran superfamilia de los llamados TIR (receptores Toll/IL-1-interleukina1-) ya que todos ellos tienen un dominio de gran semejanza estructural y poseen mecanismo de transducción semejantes con mediadores secundarios comunes⁴³. Se han clonado nueve TLRs humanos^{44, 45, 41}. Los miembros de la familia de los TLR han sido identificados en humanos y ratones. Se ha visto que sirven como receptor para la señalización de los LPS de las bacterias Gram-negativas. Aunque se sabe que CD14 se une al LPS y funciona como receptor de macrófagos, monocitos, neutrófilos y fibroblastos gingivales pero este no puede transducir la señal debido a que no posee un dominio citoplasmático^{34, 33}. Así que la propuesta es que el genuino receptor que manda al interior de la célula la señal son los TLR, recientemente descubiertos de ahí el interés por su estudio como receptores de los LPS³⁴ y muchos más ligandos. Toll es un tipo I de proteína transmembranal que cuenta con un sitio extracelular que es rico en leucina y un sitio citoplasmático con una secuencia homóloga al receptor humano de IL-1⁴⁶. En varios estudio se ha demostrado que el LPS mediante el receptor Toll activan a NF- κ B en células de embrión humano. En una línea celular de monocitos y monocitos humanos se ha visto que hay expresión de TRL2 y TRL4 y que estos son receptores para LPS¹⁶. Además, en otros estudios, se vio que TRL2 y TRL4 son expresados y están involucrados en la producción de citocinas proinflamatorias en fibroblastos gingivales⁴⁷ seguidos de la estimulación con LPS^{48, 49, 50, 51, 52}. La activación de TLR4 inducida por LPS lleva a una cascada de eventos en macrófagos y neutrófilos como la activación del factor de transcripción NF- κ B⁵³, TNF- α , la expresión de genes como *c-myc*, *c-fos* y la liberación de mediadores proinflamatorios: IL-1, IL-8, IL-12 y PG.

Un camino intracelular de señales activadas por el LPS son las MAP cinasa (*mitogen activated protein kinase pathway*). La MAP es una proteína asociada a los microtúbulos del citoesqueleto, y a través de ella, el LPS podría afectar la fisiología celular al perturbar el sistema de cinasas y fosfatasa asociadas con el citoesqueleto, un organelo que tiene efectos profundos sobre transcripción génica, síntesis de proteínas, transporte intracelular, endocitosis, secreción y forma celular^{54, 55}. Varios ligandos extracelulares, como el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento nervioso, ésteres de forbol e insulina pueden activar el camino de la MAP cinasa^{56,57, 58}. Entre los miembros de este camino está una familia de proteínas cinasas dependientes de serina/treonina de 40-45-kDa, llamadas ERKs (proteína cinasa regulada extracelularmente). Al menos tres diferentes miembros de las ERKs, ERK 1, ERK2 y otra proteína de 38-kDa son activadas por la fosforilación de tirosinas en monocitos después de la estimulación con LPS⁵⁹. Se ha visto que por efecto de los LPS existe la

activación de PDK-1, AKT, GSK-3, β -catenina, PI-3K, conexina y ciclina, entre otras cinasas mencionadas^{60, 61, 62, 63, 64}. A continuación describiré cada uno de los componentes anteriormente mencionados.

4.5 PDK-1

PDK1 es una proteína cinasa ser/thr de 63 kDa (556 aminoácidos) con un dominio catalítico amino terminal y un tallo terminal carboxílico no catalítico que contiene un dominio de homología a pleckstrina (PH; región aproximadamente de 120 aminoácidos que pueden formar una estructura terciaria polarizada electroestática con una posible función de reclutamiento de proteínas)^{65, 66, 67}. PDK1 fosforila y activa a miembros de la familia de las AGC en residuos de serina/treonina e incluye a familias de enzimas regulatorias, por lo que tiene un papel clave en un gran número de importantes eventos de señalización intracelular. Esto incluye a la PKA que regula al AMPc, PKB denominada también AKT, varias isoformas de la PKC, las cinasas p70S6 y la cinasa ribosomal S6 (RSKs). PDK1 recombinante fosforila a PKB α directamente en Thr³⁰⁸ y no en Ser³⁰⁸, en una reacción que es casi siempre dependiente de fosfatidil inositol trifosfato (PIP₃) –además de la colocalización de la enzima y el sustrato hacia la membrana plasmática– principalmente ejerce en el sustrato, una activación directa de la actividad catalítica de las proteínas PDK. Así, la unión de PKB α a PIP₃ induce un cambio en la conformación que incrementa la accesibilidad de las treoninas de la PKB para las PDK1⁶⁸⁻⁷⁰. PDK1 al no fosforilar en residuos de Ser⁴⁷³ a PKB α se piensa que otra proteína cinasa tentativamente llamada PDK2 es la responsable⁶⁸.

Se localiza en el citosol cuando está inactiva y en la membrana de forma fosforilada después de la activación directa de PI-3K⁶⁸⁻⁷¹. La actividad cinasa de PDK-1 es constitutiva para un grupo de sustratos y para otros como: PKB, cinasa p70 ribosomal S6 (P70S6K), proteína cinasa estimulada glucocorticoides y suero (SGK) y cinasa S6 ribosomal p90 (RSK) son fosforiladas por PDK1 en respuesta a un agonista celular pero con una regulación temporal^{69, 70, 71}. La regulación es de una forma sustrato dependiente o de tipo competitiva^{72, 73}.

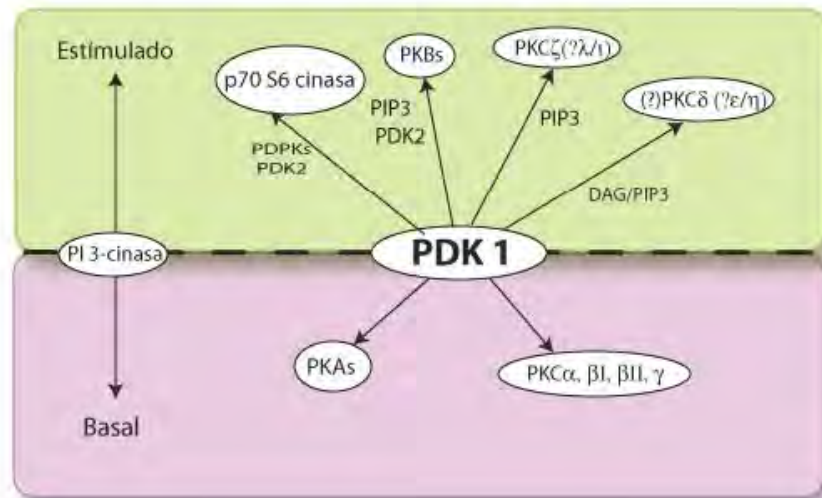


Figura 2. Varias cinasas sugieren ser objetivo de PDK1. Al ser estimulada PDK1 activa a varias cinasa – cinasa p70 ribosomal S6 (p70S6), Proteína Cinasa B (PKBs), Proteína Cinasa C ζλ/ιεδ (PKCs)- pero en estado basal PDK1 activa a otras –Proteína Cinasa A (PKAs), PKCs αβγ.⁷⁴

La función de PDK1 incluye la señalización celular^{69,74}, aspectos estructurales de la regulación^{70,75}, regula un sistema de interacción proteína-proteína o puede proveer una mecanismo molecular usado para sensibilizar la conformación de la proteína²⁰.

4.6 AKT/PKB

Es una proteína cinasa de 57kDa Ser/Thr con una alta homología con la proteína cinasa A y C y fue llamada PKB. Es un homólogo celular de la oncoproteína viral v-Akt¹⁶. Existen tres isoformas en los seres humanos PKB α , PKB γ y PKB β , la activación de estas isoenzimas es dependiente de PI-3K. Formada por un dominio homólogo pleckstrina (PH) al que se le unen PtdIns(3,4,5)P₃ (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) y PtdIns(3,4,)P₂ y más Pi_s, los cuales actúan como segundos mensajeros.

Todas las isoformas de PKB tienen una amplia distribución en los tejidos y consisten de un dominio PH/N-terminal, un dominio cinasa y una región regulatoria C-terminal. Dos sitios específicos, uno es un dominio cinasa (Thr³⁰⁸ en PKB α) y el otro es una región regulatoria C-terminal (Ser⁴⁷⁸ en PKB α) y necesitan ser fosforiladas para la activación completa de esta cinasa⁷⁶. De forma inactiva se encuentra en el citoplasma de la célula y se transloca a la membrana plasmática de forma dependiente de la activación anterior de PI-3K, donde llega a ser activada^{77, 78, 79}. PKB al ser activada sale de la membrana plasmática y a través del citoplasma llega al núcleo de la célula⁸⁰. El mecanismo de translocación aún no es claro.

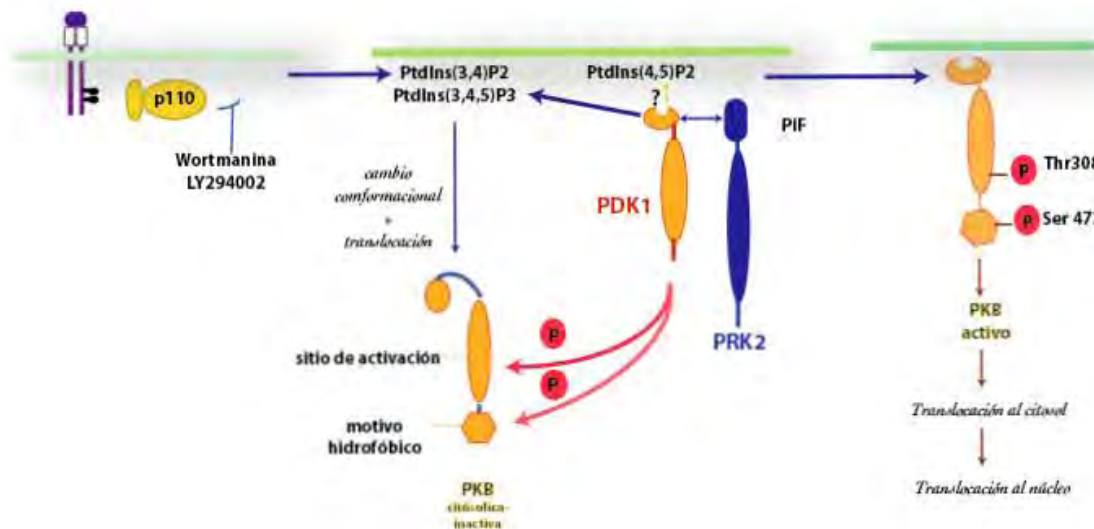


Figura 3. Modelo de activación de Proteína Cinasa B (PKB) por Fostadilinositol - 3cinasa (PI-3K) y PDK1.

PI-3K activado produce fostadilinositol 3,4 bifosfato (PtdIns3,4P₂), fostadilinositol 3,4,5 trifosfato (PtdIns3,4,5P₃) y al mismo tiempo PDK1 forma fostadilinositol 4,5 bifosfato (PtdIns4,5,P₂), produciendo la fosforilación de PKB en residuos de Treonina308(Thr³⁰⁸) y Serina 473(Ser⁴⁷³) que al ser activada se dirige a la membrana celular para posteriormente trasladarse al núcleo⁷⁴.

Por otro lado varios reportes indican que la activación de PKB puede ser independiente de PI-3K. Por ejemplo, en respuesta de heat shock, o en la disminución de Ca²⁺ intracelular o producción de AMPc y activación de PKA^{81,82, 83, 84}.

Se reportado un agonista que incrementa la concentración del Ca²⁺ en la célula puede activar PKB a través de la cinasa de la proteína cinasa dependiente de calmodulina/ Ca²⁺ (CaMKK) que fosforila a PKB en Thr³⁰⁸ en ausencia de PtdIns(3,4,5)P₂⁸⁵. Sin embargo los resultados obtenidos por otros grupos no confirman estos hallazgos.⁶⁸.

PKB está implicada en diferenciación celular^{86, 87}, supervivencia celular^{88, 89, 90, 91}. La activación constitutiva de PKB o PI-3K bloquea la apoptosis inducida por *c-myc*, radiación ultravioleta, TGF-β y Fas⁹².

La activación de PKB resulta en la fosforilación de varios sustratos importantes para la señalización del LPS tales como GSK-3, Bad y la oxido nítrico sinatasa, IκB cinasa, fosfodiesterasa 3 B, Raf-1, caspasa^{93, 94,95, 96}.

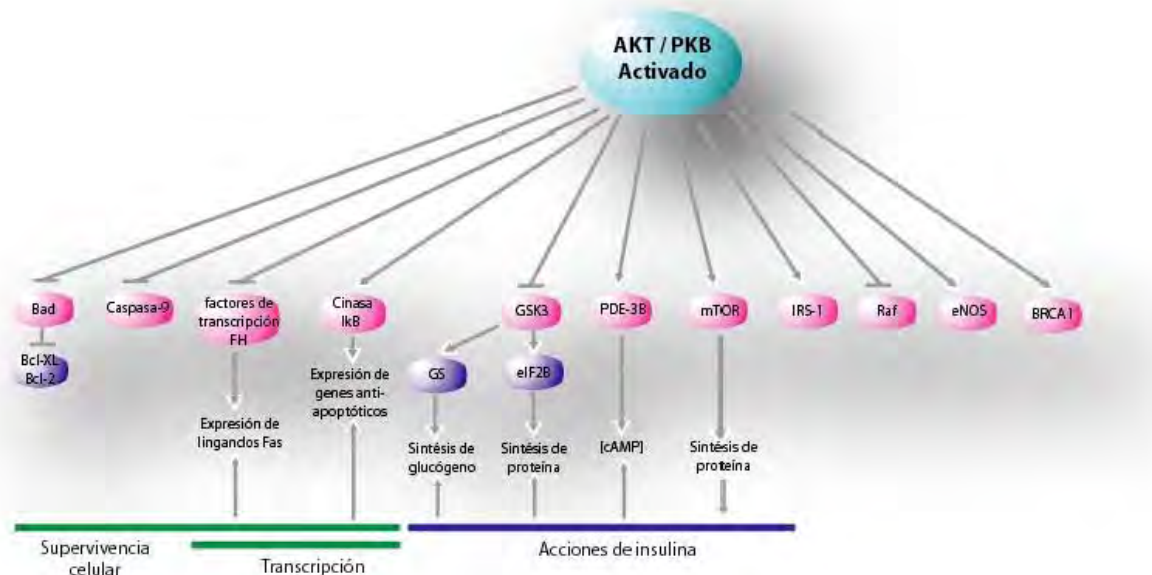


Figura 4. La Proteína Cinasa B (PKB) activa a varias proteínas que están involucradas en la supervivencia celular, en la transcripción de genes y la regulación de los efectos de la insulina⁷⁴.

4.7 PI-3K

Consta de dos unidades, una subunidad catalítica ($p110\gamma$) de 110kDa y una subunidad regulatoria/catalítica ($p101$) de 101kDa que forma heterodímeros. Es una cinasa dependiente de lípidos, que existen múltiples isoformas de PI-3K las cuales se subdividen en tres clases. Solo la clase I_B de PI-3Ks muestra que activa a PKB en células no está claro⁴¹. Estas enzimas también se unen a Ras una proteína-G monomérica. Fosforila el anillo del inositol en la posición 3'OH de los fosfolípidos de inositol generando 3'fosfoinosítidos (3'-PIs). En la célula produce tres tipos de lípidos: fosfatidil inositol 3-fosfato (PtdIns3P), fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PtdIns(3,4,5) P_3) y fosfatidil 3,4-bifosfato (PtdIns(3,4) P_2). PtdIns(3,4,5) P_3 y PtdIns(3,4) P_2 son los lípidos cruciales para el reclutamiento del dominio PH que contienen Akt y PDK1. Las cinasas PI-3cinasa /Akt forman una vía de transducción implicada en la supervivencia celular, crecimiento, y regulación de la apoptosis⁹⁷. Diversos estímulos activan esta vía, lo cual hace que se produzca la fosforilación de componentes críticos de la maquinaria de transducción de señales^{98, 99}.

PI-3K es activada por diversos estímulos como: factores de crecimiento y es inhibida selectivamente por wortmanina y LY294002.

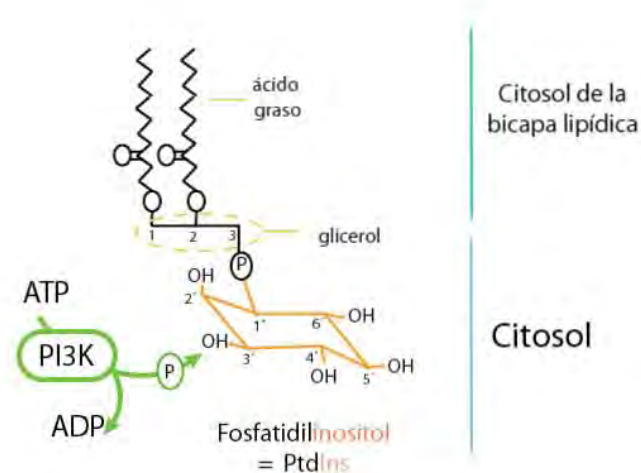


Figura 5. Representación simplificada del fosfatidilinositol (PtdIns) en el punto de acción del Fosfatidilinositol-3Cinasa (PI-3K) ⁷⁴.

4.8 GSK-3

Es una cinasa que posee dos isoformas una alfa y la forma beta. Se localiza únicamente en el citosol. El dominio N-terminal para el pseudosustrato funciona preparando la fosforilación de Akt/PKB dimerizado en sentido de la cabeza a la cola. En lo que corresponde a regulación, posee una actividad basal alta y es inhibida por la insulina y la activación de la señal de Wnt. Akt/PKB fosforilan a GSK-3, formando un complejo proteínico con axina, APC, y β -catenina. Las señales producidas por Wnt inhiben la actividad de GSK-3 por mecanismos aún desconocidos por medio de la inducción de la unión entre axina y otros factores desalineados ¹⁰⁰.

4.9 β -catenina

β -catenina es una proteína citoplásmica con una función dual en las señales de transducción de adherencia y de la señal de célula-célula. En la membrana plasmática, β -catenina se asocia a las cadherinas de las moléculas de adherencia proporcionando así un acoplamiento entre las cadherinas y el citoesqueleto, que es esencial para asegurar una adherencia fuerte. Sin embargo, β -catenina es también un componente en sentido descendente del camino de transducción de la señal de Wnt. La función de β -catenina es distinta a la adherencia, implica que se encuentre libre en el citoplasma de la célula. En células sin estimular, β -catenina es mantenida extremadamente inactiva por fosforilación, ubiquitinación y por la degradación de elementos constitutivos. La activación del camino de Wnt inhibe la maquinaria de fosforilación/ubiquitinación, creando así una acumulación de β -catenina no fosforilada que se encuentra en forma soluble y que después se incorpora el núcleo, y éste actúa recíprocamente con los factores de la

transcripción de la familia de la caja de HGM (grupo de alta movilidad) del DNA, y de esta forma modula la expresión de los genes específicos blanco¹⁰¹.

Axina es una proteína de la familia novel identificada primero en ratón¹⁰². Los embriones del ratón que carecen de Axina desarrollan el eje duplicado, indicando que la función normal de Axina es inhibir específicamente la vía de transducción dependiente de Wnt que es la responsable de la inducción dorsal primaria. También se ha determinado que axina se activa por debajo de la activación de GSK y modula desde β -catenina a lo largo del camino de Wnt.

La caracterización molecular adicional ha demostrado que axina actúa como proteína de andamio debido a que une directamente a β -catenina así como los componentes del camino implicado en la regulación de la fosforilación de β -catenina, en especial GSK-3 y el supresor del tumor APC.

Esta asociación es esencial para la fosforilación específica y la degradación subsecuente de β -catenina. Además, Axina también recluta los reguladores por arriba del camino. Axina se localiza en compartimientos subcelulares distintos, incluyendo las vesículas intracelulares y la membrana plasmática, y se cree que existe un intercambio dinámico entre estos compartimientos implicados en la regulación del camino¹⁰³.

En la actualidad está en proceso la caracterización dinámica del complejo de Axina en respuesta a Wnt, en términos de la composición bioquímica y de la localización celular. Esto nos conducirá a la comprensión de cómo se modula el complejo, habiendo una gran parte sin resolver¹⁰⁴.

Transporte al núcleo de β -catenina

La acumulación de β -catenina en el núcleo, donde actúa recíprocamente con factores de la transcripción, tiene un papel crucial en señales de Wnt. El hecho que β -catenina se incorpora el núcleo ha sorprendido, porque β -catenina no tiene ninguna secuencia nuclear de localización. Partes de β -catenina poseen una homología intrigante (repeticiones de Arm/HEAT) con la familia de receptores/transportadores nucleares solubles, llamadas importinas. La importación ocurre independientemente del camino nuclear clásico de la importación. Estudios indicaron que β -catenina se incorpora el núcleo directamente y de forma similar a las importinas¹⁰⁴.

Recientemente se ha observado que β -catenina también se exporta eficientemente del núcleo. Como la importación, la exportación es muy "anormal", puesto que es independiente de receptores de la exportación. Además, es insensible a la regulación por GTPasas, proteínas regulatorias monoméricas que unen GTP -dinucleótido de guanidina, que posee el grupo fosfato encontrándose de esta manera en forma activa además de catalizar la hidrólisis del GTP

convirtiéndose en GDP y liberando el grupo fosfato-; uno de los paradigmas principales del transporte nuclear clásico. Por otra parte, la exportación β -catenina comparte características comunes con la exportación (reciclaje) de "importinas". Esto es evidente de la capacidad de β -catenina de competir específicamente con la exportación del importina β . Estos resultados consolidan el acoplamiento entre los miembros distantes relacionados de la superfamilia "HEAT/armadillo repiten". El transporte β -catenina representa una versión simplificada del camino convencional de importancia, por medio de las lanzaderas β -catenina dentro y fuera del núcleo sin la direccionalidad impuesta. Ahora se esta analizado el mecanismo potencial que puede controlar el tráfico de la fracción nuclear a la citoplásmica y la distribución de β -catenina.¹⁰⁴

4.10 Conexinas

Un conexón está formado por un grupo hexamérico de proteínas llamados conexinas, cada una de las cuales contienen cuatro hélices alfa que atraviesan la membrana. Las seis conexinas forman un canal mayor y más permeable que el de cinco subunidades de las barreras de neurotransmisores de canales de iones o que el de cuatro subunidades (o dominios) de la barrera voltaica de los canales catiónicos. Las conexinas se agrupan para formar una unión en donde proteínas de bajo peso molecular pueden difundir de una célula a otra célula. Los conexones están presente en todos los organismos metozoarios, donde sus funciones son diversas entre ellas son: controlar el crecimiento de célula y la diferenciación hasta la conducción eléctrica en tejidos excitables¹⁰⁵.

4.11 Ciclinas

El sistema de control del ciclo celular se basa en dos familias clave de proteínas. La primera es la familia de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk, Cyclin-dependent protein kinase), las cuales inducen los procesos subordinados fosforilando proteínas seleccionadas sobre serinas y treoninas. La segunda es una familia de proteínas activadoras especializadas, las ciclinas, que se unen a las Cdk y controlan su capacidad para fosforilar proteínas diana adecuadas, por lo que abundan en el ciclo de la célula. El ensamblaje cíclico de compuestos de ciclinas y Cdk, su activación, y desensamblaje, son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular. Estas ciclinas son proteínas que fueron originalmente identificadas en invertebrados marinos; en almejas y embriones de erizo de mar¹⁰⁶.

Las ciclinas se llamaron así porque inducen un ciclo de síntesis y degradación en cada ciclo de división de la célula. Hay dos clases principales de ciclinas: las ciclinas citosólicas, las cuales se unen a las moléculas de Cdk durante G2 y son necesarias para entrar en la mitosis, y las ciclinas G1, las cuales se unen a moléculas Cdk durante G1 y son necesarias para entrar en la fase S. En las células de levadura, que han jugado un papel fundamental en la investigación del

ciclo celular, el mismo miembro de la familia Cdk proporciona la actividad cinasa en ambos puntos de control. En células de mamífero hay al menos dos proteínas Cdk diferentes, una para cada punto de control^{107, 108}.

Los procesos que llevan a la célula a la mitosis son los siguientes: la ciclina citosólica se acumula gradualmente durante G2 y se une al Cdk formando un compuesto conocido como factor promotor de la fase M (MPF). Este compuesto inicialmente permanece inactivo, pero a través de la acción de otras enzimas que lo fosforilan y desfosforilan, se convierten en un factor activo. La activación final del MPF es casi explosivo, probablemente debido a un mecanismo de retroalimentación positiva por el cual el MPF activo incrementa la acción de las enzimas que lo activan, de este modo la concentración de MPF activo aumenta a ritmo acelerado hasta que se llega a la explosión crucial, después de la cual un flujo de MPF activos desencadena una serie de sucesos que impulsan a la célula hacia la mitosis. El MPF también se desactiva de repente por la degradación de la ciclina mitótica en la metafase-anafase que sucede a continuación, permitiendo a la célula salir de la mitosis.

Cada paso de la activación o desactivación de Cdk marca una transición del ciclo celular y probablemente tiene algún efecto sobre el propio sistema de control celular, iniciando reacciones que finalmente lo conducirán a poner en marcha el proceso subordinado siguiente.

Proteínas del Ciclo de Célula: Proteínas cinasas dependientes de ciclina

Proteínas cinasas dependientes de ciclina (Cdks) son los reguladores críticos de progresión de ciclo de célula que constitutivamente es expresada en todas partes del ciclo de la célula. Los miembros prototipos de esta familia incluyen Cdc2 y Cdk2, que funcionan tardíamente en el ciclo celular, mientras que otros miembros, Cdk4, Cdk6 y una proteína relacionada Cdc7, están implicadas críticamente en G1 y transiciones de fase de S. Cdks comprenden la subunidad catalítica del ciclo de célula cinasas y ellos se asocian con subunidades específicas reguladoras para formar un complejo activo. La ciclina H es una subunidad reguladora que preferencialmente se une a Cdk7 y forma el complejo ciclina H/Cdk7, que entonces puede fosforilarse en Cdc2, Cdk2 y Cdk4 regulando el progreso del ciclo de célula.

5. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Determinar el efecto de los LPS purificados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* para caracterizar las señales intracelulares involucradas que desencadena en fibroblastos gingivales humanos, así mismo determinar si se activa la vía de Akt/PI-3K.

6. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la influencia que tienen los LPS en los procesos de transducción en HGF, es de gran importancia reconocer y comprobar que la activación de la vía PDK 1 hasta β -catenina son un factor de transcripción que regula eventos como la activación de ciclina y conexina involucradas en la función específica de la adhesión y proliferación celular.

Hasta este momento se sabe muy poco sobre las señales intracelulares activadas por los LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en los HGF y no se ha estudiado aún ésta vía.

Conociendo las señales intracelulares que producen los LPS dentro de los HGF, podremos conocer el mecanismo de acción que activan los microorganismos patógenos que originan la enfermedad periodontal.

7. OBJETIVO GENERAL

- Identificar por medio de la vía de Akt si existe la activación de conexina y ciclina en HGF, estimulados por los LPS obtenidos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si el tratamiento con LPS induce la activación y fosforilación de Akt en los HGF.
- Determinar si existe la activación y translocación de PDK-1 mediante el tratamiento de los LPS.
- Determinar por medio de inhibidores específicos (wortmanina y LY294002) de la vía de PI-3K si está involucrada en la activación de conexina.
- Identificar por medio de inhibidores específicos de la vía de PI-3K si está involucrada en la activación de ciclina D1.

8. HIPÓTESIS

Si los LPS son endotoxinas que promueven la expresión de citocinas pro-inflamatorias entonces el tratamiento con LPS purificados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promoverá la activación de la vía de transducción de Akt y expresión de moléculas que participan en respuestas inflamatorias.

- Hipótesis nula

El tratamiento con LPS purificados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* no promoverán la activación de la vía de transducción de Akt y expresión de moléculas que participan en respuestas inflamatorias.

9. TIPO DE ESTUDIO

Experimental.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO:

Los HGF (unidad de trabajo), obtenidos de explantes de tejidos de pacientes libres de enfermedad periodontal, mantenidos en una incubadora con inyección constante de CO₂ a temperatura 36.5 °C y se nutren con DMEM al 10% de SBF y 1% antibiótico–antimicótico.

SELECCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

Extracción de Proteínas Nucleares. Se colocaron aproximadamente 1,000,000 de células en cada caja petri y se dejaron desarrollando hasta subconfluencia.

Extracción de Proteína Total. Se colocó aproximadamente 100,000 células en cada pozo de la caja y se dejaron desarrollando hasta subconfluencia.

La cuantificación de células se realizaron por medio de la cámara de Neubauer. Se realizaron los experimentos en tres ocasiones y se colocó un experimento representativo en los resultados.

CRITERIOS

*INCLUSIÓN

Fibroblastos gingivales humanos. Células en forma ahusada con núcleo concéntrico y grande. Se midió la cantidad de proteína de cada muestra con el método de Lowry, para utilizar 50µg de proteína de cada muestra.

*EXCLUSIÓN

Fibroblastos gingivales humanos, si el medio y las células se presentaran contaminadas.

*ELIMINACIÓN

Fibroblastos gingivales humanos. Cuando las células tienen más de 8 pases, su forma ya no sea ahusada y cuando estén confluentes.

VARIABLES

DEPENDIENTE	DEFINICIÓN	ESCALA
-------------	------------	--------

Presencia de proteínas: PDK-1, Ciclina D1, β -catenina, GSK-3, Conexina 43, Akt.	Presencia de bandas que corresponden a los siguientes pesos moleculares de las siguientes proteínas: *PDK1: 46 Kda *Ciclina D1 : 36 Kda * β -catenina: 90 Kda *Conexina 43: 55 Kda *Akt : 56 Kda *GSK-3 : 49 Kda que se observan mediante la utilización de la técnica de Western Blot	Presencia de las bandas, las cuales se medirá su densidad óptica tomando como referencia el control.
INDEPENDIENTE		
LPS de <i>Actinobacillus Actinomycetemcomitans</i>	Endotoxina extraída de la bacteria gram-negativa <i>Actinobacillus Actinomycetemcomitans</i>	0.001 μ g 0.01 μ g 0.1 μ g 1 μ g 10 μ g 100 μ g
Tiempo	Con el que los Fibroblasto Gingivales Humanos estarán en contacto con lo LPS	1 min 5 min 10 min 15 min 30 min 1 hr. 4 hrs. 6 hrs

CULTIVO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS

Los HGF se obtuvieron mediante la técnica de explante a partir de encías sanas de pacientes que acudieron a la clínica de exodoncia. Las células se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2mM de glutamina en presencia de 1% antibiótico-antimicótico en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%. Las células se utilizaron hasta el 7^o pase y en estado de subconfluencia.¹¹⁰

TRATAMIENTO CELULAR

Las células se desarrollaron hasta la subconfluencia en DMEM + 10% SBF + 1% antibiótico-antimicótico. Se colocaron en ayuno durante 24 hrs y se trataron con el LPS a diferentes tiempos y dosis como es señalado en cada figura. Las células se recuperaron mediante raspado en PBS con 1mM de ortovanadato de sodio. Se

lavaron durante 2 ocasiones, mediante centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en buffer de lisis.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES

Las células se trataron a diferentes tiempos y dosis con el LPS. Al término de la reacción las células se obtuvieron por raspado con PBS con 1mM de ortovanadato de sodio. Las células se centrifugaron y se les retiró el sobrenadante y la pastilla se congeló en baño de hielo seco y etanol por 15 min. Al término las células se van a lisar en buffer Hepes 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 15mM, DTT 1mM pH 7.9 . Se centrifugo a 3500 rpm durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante se recupero y se guardó a -70°C. La pastilla se resuspendió en un buffer hipertónico (Hepes 20mM, NaCl 0.4M; MgCl₂ 1.5mM, Glicerol 25%, EDTA 0.2 mM; DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM pH 7.9). Los núcleos se incubaron durante 30 minutos en agitación a 4°C y se cuantificó la proteína por método de Lowry¹¹¹.

ENSAYO DE WESTERN-BLOT

Se tomaron 50 µg de proteína de las células tratadas que se mezcló 1:1 con buffer de muestra 2x (20%glicerol, 4%SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8) y se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 10% y se corrió a 50 mA por 2h. Al término de la corrida las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 12 hrs a 100 mA. Posteriormente las membranas se bloquearon durante 60 minutos en una solución de PBS y 1% de leche descremada, se lavaron durante 3 ocasiones en PBS con 0.1% Tween. Se incubaron a temperatura ambiente durante 4 hrs con el primer anticuerpo (1:1000) y se lavaron durante tres ocasiones con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo (1:5000) HPR-conjugado durante 2 hrs a temperatura ambiente, las membrana se lavaron durante 3 ocasiones en PBS. Con el propósito de mostrar el mismo contenido de proteínas las membranas se desnudaron y se incubaron con anticuerpos que detectan las formas no fosforiladas de las cinasas. Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia y la autoradiografía se obtuvo después de exponer la película durante 2 min. Los experimentos se realizaron en tres ocasiones por separado.

ENSAYO DE INMUNOCITOQUÍMICA

Las células se crecieron en cubreobjetos durante 4 días hasta 90% de confluencia, posteriormente se ayunaron las células y se trataron con el LPS los tiempos y dosis indicadas en cada figura y se fijaron por 30 minutos con para-formaldehído (PFA) al 2% a 4°C. Se retiró el PFA y se lavó con PBS tres veces. Se colocó 100µL de triton X al 0.1% a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se lavó con PBS tres veces y se incubó el primer anticuerpo por 30 minutos a 4°C y se lavaron con PBS 3 ocasiones. Se incubó durante una hora con el fluoróforo

indicado, procurando que no este en contacto con la luz y se lavaron con PBS en 5 ocasiones. Se quitó completamente el PBS con pipeta Pasteur asegurándose que la lenteja este seca. Las muestras se montaron en resina y se observaron por microscopia confocal. Los experimentos se repitieron en tres ocasiones por separado.

MÉTODO DE REGISTRO Y PROCESAMIENTO Y PLAN DE ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Los experimentos se realizaron tres veces y se presenta un resultado representativo de dichos experimentos. Posteriormente se realizó un análisis densitométrico de las películas como resultado del western-blot y se analizó con el sistema DigiDoc-it System. Los resultados se presentaron como las medias \pm error estándar. La comparación entre las medias se analizaron con la prueba t de Student. Las diferencias entre las medias se considera significativo cuando $p < 0.05$.

MATERIAL

Consumibles

Acilamida. Sigma.

ECL-plus. Amersham.

DMEM enriquecido con SBF al 2% y al 10%. InVitrogen

Nitrocelulosa. Bio-Rad.

Película de alto contraste. Amersham.

Persulfato de amonio. Sigma.

TEMED. Sigma.

Trizma base. Sigma.

Wortmanina. Sigma.

Cajas de seis pozos.

Cajas Falcon Costar.

Cajas Petri Costar

Antibiótico - antimicótico. Life Technologies.

Anticuerpos

Anticuerpos para Akt. Santa Cruz.

Anticuerpos para p-Akt. Santa Cruz.

Anticuerpos para GSK 001-A. Santa Cruz.

Anticuerpos para p-GSK 3 β 001-A. Santa Cruz.

Anticuerpos para PDK 1 C 20. Santa Cruz.

Anticuerpos para β - Catenina H102. Santa Cruz.

Anticuerpos para PI-3K. Santa Cruz.

Anticuerpos para γ -tubulina. Santa Cruz.

Anticuerpos para Conexina43. Santa Cruz.

Anticuerpos para CiclinaD1. Santa Cruz.

Cristaleria

Pipetas (2, 5, 10 mL).

Pipetas Pasteur.

Equipo

Agitador orbital. Lab line.

Cámara de electroforesis. Hoeffer.

Cámara de Newbauer.

Cámara de transferencia. Hoeffer.

Campana de Flujo laminar. Nuair.

Centrífuga clínica. Cole Palmer.

Fuente de Poder. Pharmacia.

Incubadora de dióxido de carbono. Nuair.

Microcentrífuga. Sorvall.

Micropipetas. Gilson.

Microscopio de objetivos invertidos. Olympus.

11. RESULTADOS

11.1 Translocación de PKD-1 en la membrana por efecto de los LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en HGF.

Con la finalidad de determinar si existe la translocación de PDK-1 del citoplasma hacia la membrana celular por acción de los LPS en HGF, se trataron los HGF con un 1µg/mL del LPS a diferentes tiempos. Se realizaron extractos citosólicos y membranales y se corrieron al mismo tiempo. La actividad se determinó haciendo ensayos de Western-Blot.

Encontramos que desde los 5 minutos de tratamiento con el LPS se induce un aumento en la fosforilación del patrón de PDK-1 en la membrana hasta los 60 minutos y en la fracción citosólica el patrón de fosforilación va disminuyendo (Fig.1), así mismo se muestra la proteína total de las membranas.

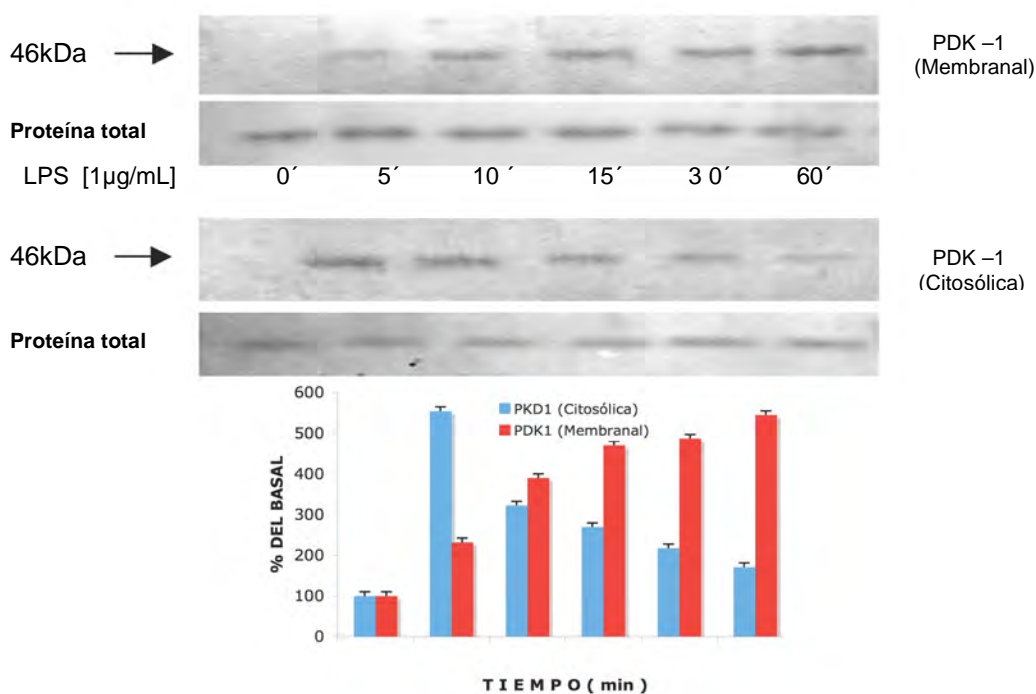


Figura1. El LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* provoca en HGF la translocación de PDK-1 a la membrana celular.

Los HGF se desarrollaron en cajas petri hasta subconfluencia, se ayunaron 24 horas con DMEM sin suero y se trataron con DMEM al 2% de suero bovino fetal con y sin LPS (1µg/mL) durante 5 - 60 minutos. Se obtuvieron proteínas de membrana y citosol, para el análisis de Western se utilizó anticuerpo anti-PDK-1 y anti γ -tubulina. La inmunoreacción de las bandas fueron visualizadas usando un kit de quimioluminiscencia y películas de alto contraste Amersham.

11.2 Activación de Akt por efecto de los LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en HGF.

Con la finalidad de determinar si existe la activación de Akt en los HGF por efecto del LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, se trataron éstos con un 1µg/mL del LPS a diferentes tiempos. Se realizó extracto total y se corrieron. La actividad se determinó haciendo ensayos de Western-Blot.

Encontramos que desde los 5 minutos de tratamiento con el LPS se induce un aumento en la fosforilación del patrón de Akt hasta los 60 minutos, observándose la máxima expresión a los 60 minutos (Fig.2) de tratamiento así mismo se muestra la proteína total de las membranas.

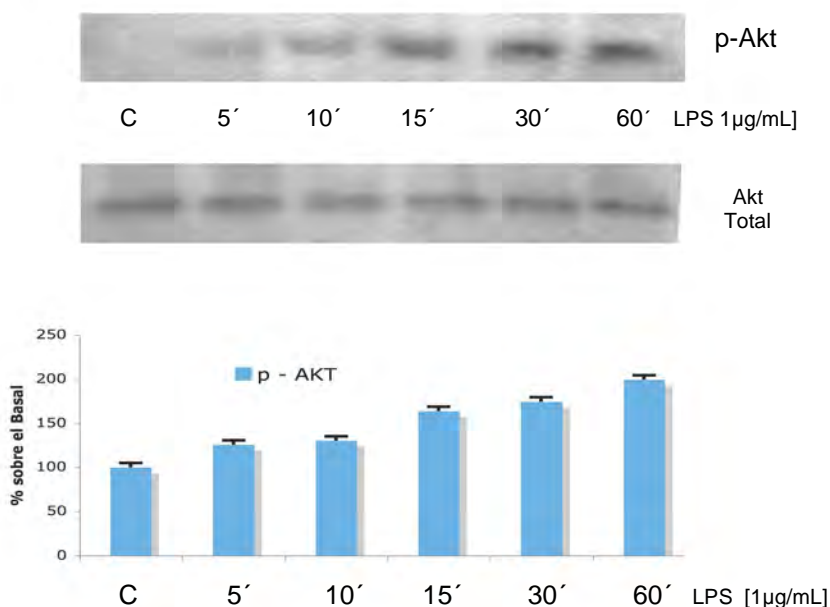


Figura 2. El LPS provoca en HGF la activación de Akt.

Los HGF se desarrollaron en cajas petri hasta subconfluencia, se ayunaron 24 horas con DMEM sin suero y se trataron con DMEM al 2% de suero bovino fetal con y sin LPS (1µg/mL) durante 5 - 60 minutos. Se obtuvieron proteínas totales, para el análisis de Western se utilizó anticuerpo anti-pAkt y anti-Akt. La inmunoreacción de las bandas fueron visualizadas usando un kit de quimioluminiscencia y películas de alto contraste Amersham. La imagen es una de tres experimentos que se realizaron por separado.

11.3 Fosforilación GSK-3 por acción de los LPS.

Para determinar si existe la fosforilación de GSK-3 por acción de los LPS en HGF, se trataron los HGF con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos. La fosforilación se determinó haciendo ensayos de Western Blot.

Se encontró que desde los 5 minutos de tratamiento con el LPS se induce un aumento en la fosforilación del patrón de GSK-3 y a los 15-30 minutos se encuentra el máximo de su inducción, por otro parte la isoforma β se observa que es preferentemente fosforilada (Fig.3). Para determinar que la concentración de proteína sea la misma se procedió a desnudar la membrana y se colocó un anticuerpo anti- GSK-3 total.

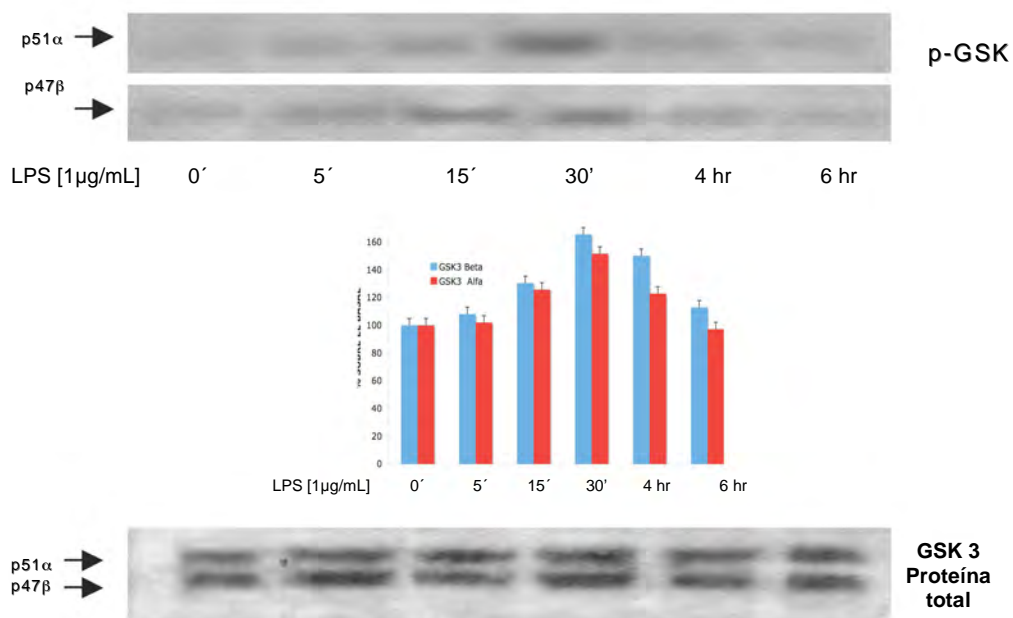


Figura3. LPS induce la fosforilación de GSK-3.

Los HGF fueron tratados con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) por varios tiempos. El extracto total fue obtenido y se realizó el Western, se utilizaron anticuerpos específicos para GSK-3 total, el anti GSK-3 fosforilado en residuos de serina 21 y serina 9 (a). Para comprobar la existencia de la misma concentración de proteína en la membrana se desnudo y se utilizó el GSK-3 total. El primer anticuerpo se utilizó 1:1,000 y el segundo anticuerpo a 1:10,000. La inmunoreacción de las bandas fueron visualizadas usando un kit de quimioluminiscencia y películas de alto contraste Amersham.

11.4 PI-3K está involucrada en la activación de Akt y GSK-3

Para demostrar que Akt y GSK-3 están acoplados en la activación de PI-3K, los HGF se trataron con inhibidores de PI-3K (wortmanina y LY294002) con un 1µg/mL del LPS. La actividad se determinó haciendo ensayos de Western-Blot.

Se encontró que incubando con concentraciones desde 50nM wortmanina y 50µM de LY294002 existió una inhibición de la fosforilación de Akt y GSK-3 lo que nos indica que es por efecto de la activación primaria de PI-3K (Fig. 4).

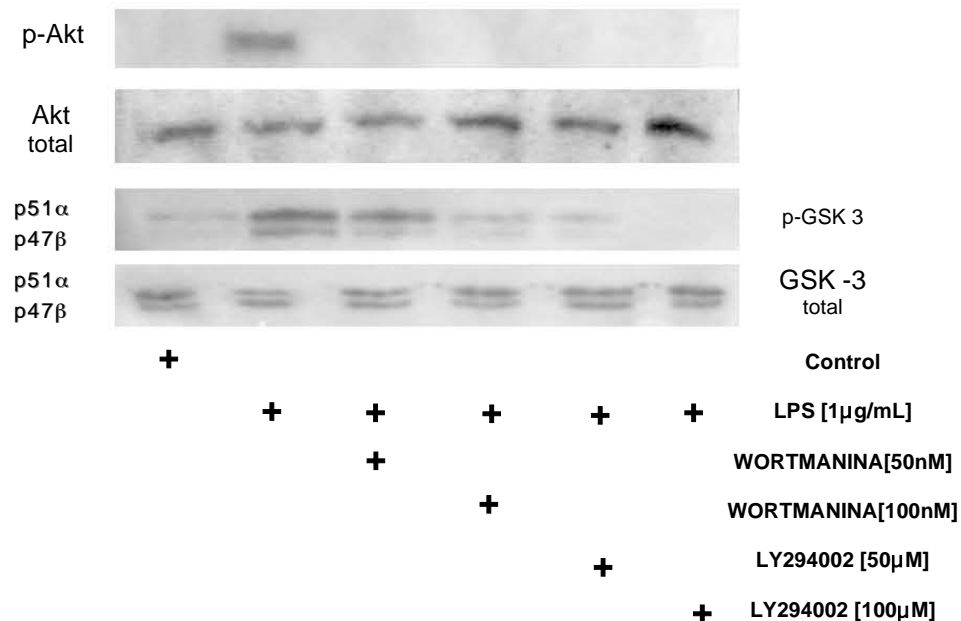


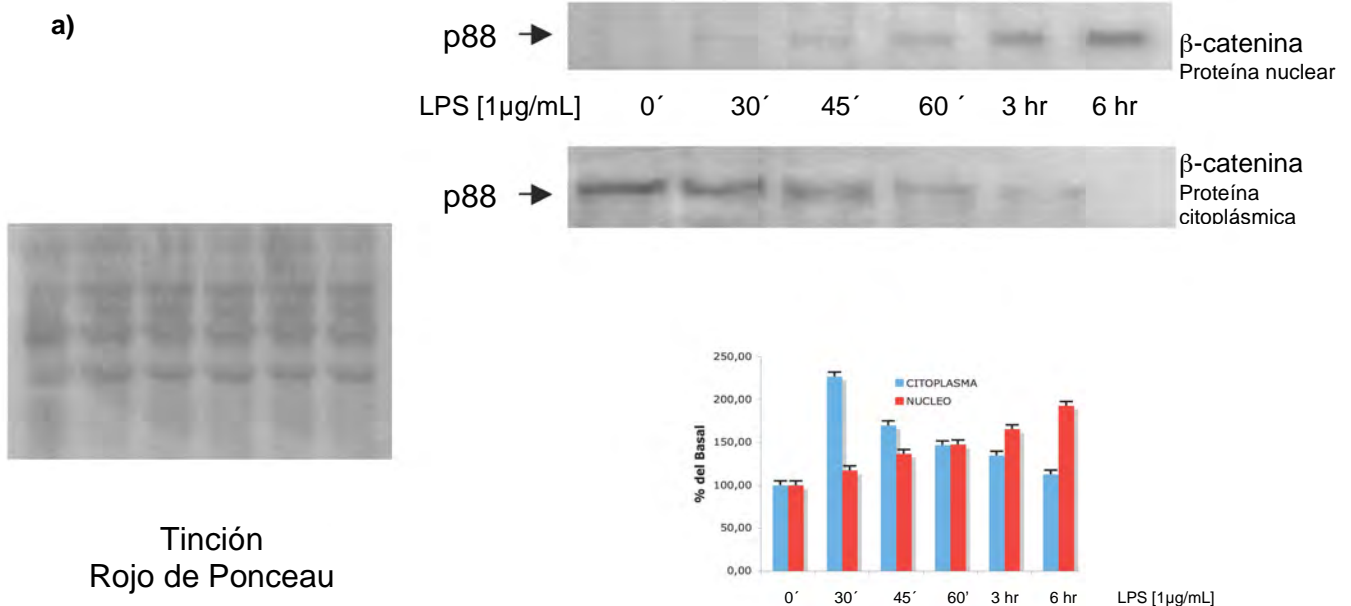
Figura 4. LPS fosforila a Akt y GSK-3 a través de PI-3K.

Los HGF fueron tratados con LPS (1µg/mL) por 15 minutos con y sin inhibidores de PI-3K durante 30 minutos, wortmanina (50-100nM) y LY294002 (50- 100µM). El extracto total fue obtenido y realizando el Western, se utilizaron anticuerpos específicos para GSK-3 total, el fosfo anti GSK-3 y anti-Akt total y fosfo anti-Akt. Para comprobar la existencia de la misma concentración de proteína en la membrana se desnudo y se utilizó el GSK-3. El primer anticuerpo se utilizó a 1:1,000 y el segundo anticuerpo a 1: 10,000. La inmunoreacción de las bandas fueron visualizadas usando un kit de quimioluminiscencia y películas de alto contraste Amersham.

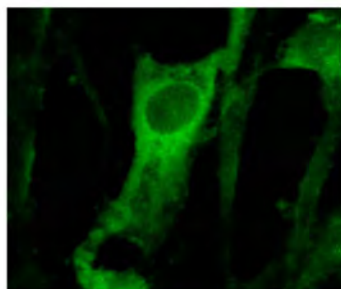
11.5 Acumulación de β -catenina en el núcleo por efecto de los LPS de *Actinobacillus. actinomycetemcomitans*.

En la vía de Wnt, la fosforilación e inactivación de GSK-3 trae como resultado la acumulación nuclear de β -catenina. El incremento de β -catenina se ha ligada a la activación transcripcional de algunos genes. Para demostrar que en HGF por efecto del LPS producen la translocación de β -catenina, se realizó un curso temporal realizando los extractos nucleares y citoplásmicos para observar como se da el efecto. La actividad se determinó haciendo ensayos de Western Blot.

Se encontró que al paso del tiempo va desapareciendo β -catenina del extracto citoplásmico y en el extracto nuclear va en aumento la señal (Fig. 5a), así mismo se muestra la proteína total de las membranas por medio de la tinción Rojo de Ponceau. Por otra parte se realizó inmunocitoquímica para observar la localización de β -catenina lo que muestra que al tratamiento con el LPS existe la acumulación de la proteína en el núcleo del HGF lo que basalmente no es así (Fig. 5b).



b)



Control

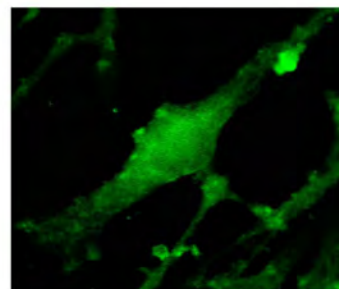
 β -catenina

Figura5. LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* provoca en HGF la translocación de β -catenina al núcleo celular.

(a) Los HGF se desarrollaron en cajas petri hasta subconfluencia, se ayunaron 24 horas con DMEM sin suero y se trataron con DMEM al 2% de FBS con y sin LPS (1 μ g/mL) durante 30min-6hrs. Se obtuvieron proteínas de núcleo y citoplasma, para el análisis de Western se utilizó anticuerpo anti- β -catenina. La inmunoreacción de las bandas fueron visualizadas usando un kit de quimioluminiscencia y películas de alto contraste Amersham. La membrana se tiñó con rojo de ponceau para determinar la concentración de proteína.

(b) Se realizó la inmunocitoquímica con y sin LPS (6hr) como se indica en Materiales y Métodos. Se utilizó anti- β -catenina acoplado a fluoresceína.

11.6 La acumulación de β -catenina inducida por LPS está ligada a la vía de PI-3K.

Se demostró anteriormente que por efecto del LPS se transloca β -catenina al núcleo de la célula. Para demostrar que este efecto está ligado a la vía de PI-3K se realizó un ensayo con el inhibidor específico de PI-3K, LY294002 (50-100 μ M). Y la actividad se determinó haciendo ensayos de Western Blot.

Encontramos que al tratamiento con el inhibidor de PI-3K bloquea la activación β -catenina desde una concentración de 50 μ M (Fig. 6).

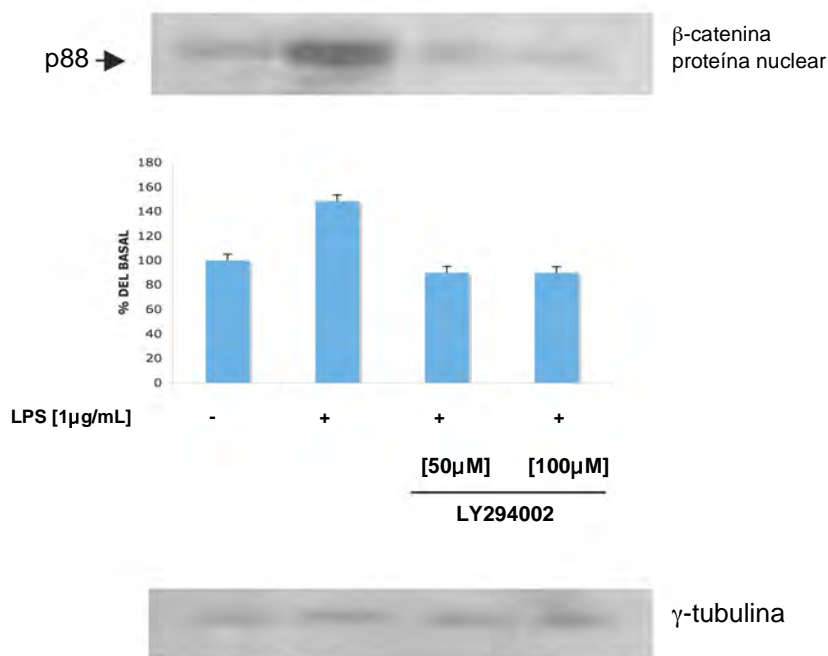


Figura 6. La vía de PI-3K produce la activación β -catenina por efecto del LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en HGF.

Los HGF se desarrollaron en cajas petri hasta subconfluencia, se ayunaron 24 horas con DMEM sin suero y se trataron con DMEM al 2% de suero bovino fetal con y sin LPS (1 μ g/mL) durante 1hr. Se preincubo a las células con LY294002 (50-100 μ M) Se obtuvieron proteínas de núcleo, para el análisis de Western se utilizó anticuerpo anti- β -catenina. La inmunoreacción de las bandas fueron visualizadas usando un kit de quimioluminiscencia y películas de alto contraste Amersham.

11.7 LPS induce el incremento de ciclina y conexina.

Finalmente se buscó ligar el evento fisiológico que ocurre en la activación y acumulación de β -catenina en el núcleo. Se evaluaron dos proteínas involucradas en la actividad transcripcional de la vía de señalización de β -catenina/TCF/Lef-1¹¹². Se realizó un curso temporal (30min-6hrs) de conexina 43 y ciclina D1, realizando extractos totales. La actividad se determinó haciendo ensayos de Western Blot.

Encontramos que desde los 30 minutos de tratamiento con el LPS existe la presencia de conexina 43 y ciclina D1 y va aumentando de una manera dependiente del tiempo, así mismo se muestra la proteína total de las membranas colocando un anticuerpo para γ -tubulina (Fig. 7).

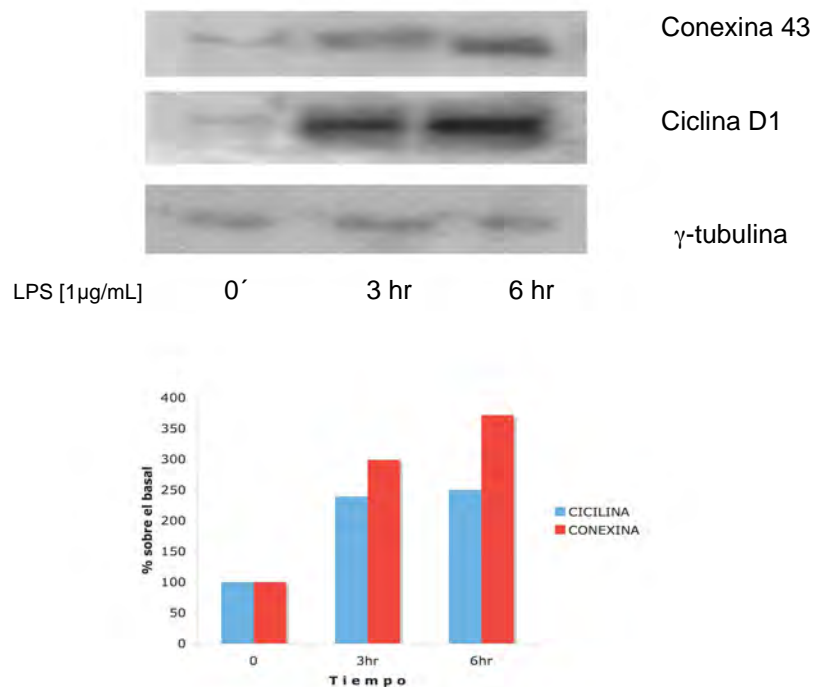


Figura 7. LPS de *Actinobactillus actinomycetemcomitans* producen la acumulación de Ciclina y conexina en HGF.

Los HGF se desarrollaron en caja de 6 pozos hasta subconfluencia, se ayunaron 24 horas con DMEM sin suero y se trataron con DMEM al 2% de suero bovino fetal con y sin LPS (1 μ g/mL) a diferentes tiempos (3hr y 6hrs). Se obtuvieron proteínas totales, para el análisis de Western se utilizó anticuerpo anti-ciclina, anti-conexina y γ -tubulina. La inmunoreacción de las bandas fueron visualizadas usando un kit de quimioluminiscencia y películas de alto contraste Amersham.

12. DISCUSIÓN

La enfermedad periodontal es caracterizada por la inflamación del tejido conectivo iniciada por el huésped en respuesta a la invasión bacteriana. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se asocia con la periodontitis agresiva localizada³ y del adulto⁴. En un estudio con células epiteliales orales humanas en presencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* la célula libera citocinas proinflamatorias tales como la IL-1 β , IL-18 y TNF- α ¹¹³. Los HGF es uno de los tipos celulares que forman al periodonto, aún no se sabe que papel juegan en la enfermedad periodontal y como es el mecanismo de acción de las células involucradas en la respuesta ante la presencia del lipopolisacárido.

Se ha demostrado que los LPS activan a PI-3K en diferentes sistemas celulares^{114, 115}. En este trabajo tratamos de elucidar el posible evento que se da después de la activación de PI-3K. EL LPS activa a la PI-3K y esto se ha ligado con la activación de una forma atípica de PKC, ζ ¹¹⁴. Venkataraman et al., mostraron que en células B, la proliferación es dependiente de PI-3K. En macrófagos, Procyk et al.,¹¹⁶ relaciona que la activación de la cinasa relacionada con la señal extracelular y PI-3K es inducida por el LPS. Varias publicaciones por Herrera-Velit muestran que la señalización activada por el LPS (adherencia, PKC ζ y lyn) es a través de PI-3K^{117,118}. En este estudio demostramos y sugerimos que el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* activa la vía de PI-3K teniendo un papel importante en la respuesta celular al LPS.

En macrófagos murinos se demostró que después de la activación de PI-3K, Akt se activa por acción PI-3K¹⁰⁹. Akt es una serina/treonina cinasa que tiene una homología significativa con PKC ϵ y PKA⁵¹. Se ha descrito como una mediadora de los efectos de la insulina, factores de crecimiento, citocinas y varios otros factores⁷⁵. Akt es activada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas, insulina y adhesión celular^{119, 120}. Los efectos que se derivan después de la

activación de Akt incluyen la inhibición de la cinasa I κ B, eNOS y la cinasa p70s6^{94, 96}. Numerosos estudios han demostrado que la inhibición de Akt bloquea la apoptosis como resultado de diversos estímulos (luz UV, fragmentación del DNA)¹¹⁹. Por lo que el interés de este estudio es saber si el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* activa a Akt en los HGF durante el proceso de la enfermedad periodontal para el mantenimiento de la viabilidad celular durante la liberación de mediadores inflamatorios.

Se mostró que el LPS activa a Akt trayendo como resultado la fosforilación de GSK-3 y el incremento de β -catenina en el núcleo. GSK-3 es una enzima constitutiva que es regulada negativamente por la vía Wnt y por la fosforilación inducida por Akt¹⁰². En estudios previos muestran que en cáncer de colon, PKC β 2 inactiva a GSK-3, lo que trae como resultado el aumento de la división celular y tumorigenesis¹²¹. La fosforilación de GSK-3 en residuos de serina 21/9 produce la disociación de GSK-3 del complejo de APC, axin, y β -catenina. Cuando GSK-3 es removido del complejo, no sigue promoviendo la fosforilación de β -catenina y dirigirlo para su ubiquitinización y la degradación proteosomal¹⁰³. Esta regulación negativa de GSK-3 se ha ligado a la señalización de la vía de Wnt, factores de crecimiento, insulina e interacciones célula/fibronectina.^{122, 103}. Aunque la señalización de la acumulación de β -catenina y la actividad transcripcional por la inactivación de GSK-3 es por vía Wnt¹⁰³. En HGF, tratados a diferentes tiempos (30min-6hrs) con el LPS, se observó gradualmente la acumulación de β -catenina en el extracto nuclear con la subsiguiente activación de GSK-3. Por otra parte se realizó el ensayo de inmunohistoquímica y se observó como en las células tratadas, β -catenina se ubica en el núcleo de la célula en comparación con el basal. En otra serie de experimentos se preincubaron a los HGF con LY94002, un inhibidor específico de PI-3K, observándose que se bloquea totalmente la expresión de Akt y GSK-3 por lo que PI-3K está implicada en el evento de activación de Akt y GSK-3. Aunque quedaría todavía por estudiar si la vía Wnt está implicada en el evento de translocación de β -catenina del citoplasma al

núcleo de la célula. En otros sistemas, β -catenina estabiliza un complejo transcripcional que la contiene así misma y el factor de transcripción TCF/Lef-1. El complejo β -catenina-TCF/Lef-1 puede activar o suprimir la transcripción de genes ¹²³. Los genes que muestran que contienen los sitios de TCF/Lef-1 regulados positivamente por β -catenina incluyen a *c-myc*, fibronectina, ciclina D1, c-jun, fra-1, e caderina y conexina 43 ^{124, 125, 112}. En los datos se muestra que el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (1 μ l/mL) promueven la expresión de ciclina D1 y conexina 43 a tiempos largos (4-6hrs), con lo que podemos decir que de alguna manera existe una regulación de la transcripción de los genes ciclina D1 y conexina 43 por efecto de la translocación de β -catenina al núcleo con la involucración de la vía de PI-3K.

13. CONCLUSIONES

En este estudio caracterizamos la vía de señalización de Akt que se encuentra involucrada por efecto del LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en los fibroblastos gingivales humanos. Así como:

1. El LPS fosforila y activa a Akt en los HGF.
2. PDK-1 se transloca del citoplasma a la membrana celular por efecto del LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
3. La activación de conexina y ciclina D1 son activadas por el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en HGF por la vía de PI-3K y la activación de β -catenina.

LITERATURA CITADA

- ¹ **Gutiérrez-Venegas G., Kawasaki-Cárdenas P., Cruz-Arroyo S.R., Pérez-Garzón M., Maldonado-Frías S.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates the phosphorylation of p44 and p42 MAP kinases through CD14 and TLR-4 receptor activation in human gingival fibroblasts. *Life Sci.* 2005 Nov 26; [Epub ahead of print]

- ² **Koka S., Maze C., Reinhart R., Dyer J.** Variability of inflammatory mediator production by human periodontal fibroblast stimulated with bacterial lipopolycchacaride. *In vitro Cell Dev Biol.* 1996; 32: 528-530.

- ³ **Zambon J.J.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* Jan. 1985;12(1):1-20.

- ⁴ **Slost J., and Listgarten M.A.** Bacteroides ginigivalis, Bacteroides intermedius and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988;15;85-93.

- ⁵ **Chrstersson L.A., Wikesjo U.M., Albin B., Zambon J.J., and Genco R.J.** Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. *J Periodontol.* 1987;58;540-545.

- ⁶ **Slots J., Reynolds H.S., and Genco R.J.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun.* 1980;29;1013-1020.

- ⁷ **Kaplan A.H., Weber D.J., Oddone E. Z., and Perfect J.R.** Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. *Rev. Infect. Dis.* 1989;11:46-63.

- ⁸ **Ishihara Y., Nishihara T., Maki E., Noguchi T., and Koga T.** Role of interleukin-1 and prostaglandin in Vitro bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J Periodont Res.* 1991;26: 155-160.

-
- ⁹ **Hammond B.F., Stevens R.H.,** Gatewood C. Cytotoxicity of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* extracts in human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 1983;28(11):981-7.
- ¹⁰ **Kato S., Muro M., Akifusa S., Hanada N., Semba I., Fujii T., Kowashi Y., and Nishihara T.** Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect Immun.* 1995;63:3914-3919.
- ¹¹ **Muro M., Koseki T., Akifusa S., Kato S., Kowashi Y., Ohsaki Y., Yamato K., Nishijima M., and Nishihara T.** Role of CD14 molecules in internalization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by macrophages and subsequent induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 1997;65:1147-1151.
- ¹² **Nonaka K., Ishisaki A., Muro M., Kato S., Oido M., Nakashima K., Kowashi Y., and Nishihara T.** Possible involvement of protein kinase C in apoptotic cell death of macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 159-254.
- ¹³ **Kato S., Nakashima K., Inoue M., Tomioka J., Nonaka K., Nishihara T., and Kowashi Y.** Hum epithelial cell death caused by *Actinocillus actinomycetemcomitans* infection. *J Med Microbiol.* 2000; 49: 739-745.
- ¹⁴ **Kato Y., Morikawa A., Sugiyama T., Koide N., Jiang G.Z., Lwin T., Yoshida T. and Yokochi T.** Augmentation of lipopolysaccharide-induced thymocyte apoptosis by interferon-gamma. *Cell Immunol.* 1997;177:103-108.
- ¹⁵ **Higashida C., Guerrero y Gutiérrez V.** Lipopolisacáridos: extraordinarias moléculas activadoras de señales de transducción celular. Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Odontología, UNAM; *REB.* 2002; 10(3): 45-56.
- ¹⁶ **Ramadori G. Meyer zum Bushenfelde K.H., Tobias P.S., Mathison J.C., u Ulevitch R.J.** Biosynthesis of Lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology.* 1990: 58;89-94.
- ¹⁷ **Gutiérrez G., Peña M., y Flores A.** Los Lipopolisacáridos como promotores de procesos inflamatorios en cavidad oral. Laboratorio de Bioquímica, División de

-
- Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, UNAM; *REB.* 2002; 21(2):98-104.
- ¹⁸ **Hefti A.F.** Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontology.* 2000; 3:64-75.
- ¹⁹ **Hassell T.M.** Tissue and cells of the periodontium. *Periodontology.* 2000;3:9-38.
- ²⁰ **Bordin S., Page R.C., And Narayanan A.S.** Heterogeneity of normal human diploid fibroblast: Isolation and characterization of one phenotype. *Science.* 1984;223;171-173.
- ²¹ **Velázquez J.C.** Principales protagonistas de la respuesta inflamatoria a la infección. Hospital Pediátrico Docente "William Soler". Servicio de Infectología; *Rev. Cubana Pediatra.* 1998; 70(2):84-91.
- ²² **McCulloch D., And Bordin S.** Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodont Res.* 1991:44-154.
- ²³ **Stefanova I., Corcoran M.L., Horak E.M., Horak L.M., Bolen J.B., and Horak I. D.** Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56. *J Biol Chem.* 1993:268;272.
- ²⁴ **Castor C.W., Prince R.K., and Dorstewitz E.L.** Characteristics of human "fibroblasts" cultivated in vitro from different anatomical sites. *Lab Invest.* 1962; 11;7037-7093.
- ²⁵ **Rose G.G., Yamasaki A., Pinero G.J., and Mahan C.J.** Human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodont Res.* 1987;22; 20-28.
- ²⁶ **Ko S.D., Page, R.C., and Narayanan, A.S.** Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984;74: 171-173.
- ²⁷ **Murakami S., and Okada H.** Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9;284-266.

-
- ²⁸ **Takada H., Mihara J., Morisaki I., Hamada S Hamada S, Holt SC., McGhee JR.** Production of cytokines by human gingival fibroblast. In: *Periodontal disease: pathogens and host immune response*. Quintessence Publishing. 1991. pp.276.
- ²⁹ **Kent L.W., Rahemtulla F., Hockett R.D. Jr., Gilleland R.C., Michalek S.M.** Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblast. *Infect Immun*. 1998;66:608-614.
- ³⁰ **Kent L.W., Rahemtulla F., Michalek S.M.** Inteleukin (IL)-1 and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblasts derived from healthy or periodontal diseased human gingival tissue. *J Periodontol*. 1999;79:274-282.
- ³¹ **Cruz M., Velasco E., Kumate J.** Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. *Gaceta Médica de México*.2001;137:135-147.
- ³² **Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J.** Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med*. 1986;164(3):777-93.
- ³³ **Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., and Mathisson J.C.** CD14 serves as the cellular receptor for complexes of lipopolysaccharide with lipopolysaccharide binding protein. *Science*.1990;249:1431-1433.
- ³⁴ **Ulevitch R.J., and Tobias P.S.** Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 437-457.
- ³⁵ **Goldblum S.E., Brann T.W., Ding X., Pugin J., Tobias P.S.** Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein and soluble CD14 function as accessory molecules for LPS-induced changes in endothelial barrier function *in vitro*.*J.Clin. Invest*. 1992;93:692-702.
- ³⁶ **Bazil V., Horejsi V., Baudys M., Stefanova I., Low M.G., Zbrozek J., et al.** Structure relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14. *Mol Immunol*. 1989;26:657-662.

-
- ³⁷ **Frey E.A., Miller D.S., Jahr T.G., Sundan A., Bazil V., Espevik T., et al.** Soluble CD14 participates in the response of cell to lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1992;176:1665-1671.
- ³⁸ **Johnson D.A., Kelley M., Busse L.A., Zukowsky M.M., and Wrigh S.D.** Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp. Med.* 1994;179:269-177.
- ³⁹ **Dentener M.A., Bazil V., Asmuth U.V., Ceska M., Burman W.A.** Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol.* 1993: 150;2885-2891.
- ⁴⁰ **Perera P.Y., Vogel S.N., Detore G.R., Haziot A., Goyert S.M.** CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. *J Immuno* 1997:158;4422-4429.
- ⁴¹ **Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F.** A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95; 588-593.
- ⁴² **Ferrero E., Jiao D., Tsuberi B.Z., Tesio L., Rong G.W., Haziot A., et al.** Transgenic mice expressing human CD14 are hepersensitive to lipopolysaccharide. *Pro Natl Acad Sci USA.* 1993;90; 2380-2384.
- ⁴³ **Medzhtov R., Preston-Hulburt P., Janeway C.A. Jr.** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signal activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388; 394-397.
- ⁴⁴ **Chaudhary P.M., Ferguson C., Nguyen V., Nguyen O., Massa H.F., Eby M., et al.** Cloning and characterization of two Toll/interleukin-1 receptor-like genes TLR3 and TLR4: evidence for multi-gene receptor family in humans. *Blood.* 1998;91; 4020-4027.
- ⁴⁵ **Hemmi H., Takeuchi O., Kawau T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., et al.** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408:740-744.

-
- ⁴⁶ **O'Neil L.A., Greene C.** Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukocyte Bio.* 1998;63:650-657.
- ⁴⁷ **Wang P.L., Shirasu S., Shinohara M., Azuma Y., Daito M., Yasuda H., et al.** IL-10 inhibits *Porphyromonas gingivalis* LPS-stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999: 263;372-377.
- ⁴⁸ **Weinstein S.L., June C.H., and De Franco A.L.** Lipopolysaccharide-induced protein tyrosine phosphorylation in human macrophages is mediated by CD14. *J Immunol.* 1993;151: 3829-3838.
- ⁴⁹ **Kielian T.L., and Blecha F.** CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide. *Immunopharmacology.* 1995;29:187.
- ⁵⁰ **Kirschning C.J., Wesche H., Merrill Hynes T., Rothe M.** Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp Med.* 1998;188:2091-2097.
- ⁵¹ **Yang R.B., Mark M.R., Gurney A.L., Godowsky J.** Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor. *J Immunol.* 1999;163;639-643.
- ⁵² **Matsuguchi T., Takagi K., Musikachoen T., Yoshikai Y.** Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood.* 2000;95;1378-1385.
- ⁵³ **Zhang F. X., Kirschning C. J., Mancinelli R., Xu X. P., Jin Y., Faure E., Mantovani A., Rothe M., Muzio M. and Arditi M.** Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human termal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J. Biol.Chem.* 1999: 274; 7611-7614.
- ⁵⁴ **Nishida E., Gotoh Y.** The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci.* 1993;18:128-130.

-
- ⁵⁵ **Ruderman J.V.** MAP kinase and the activation of quiescent cells. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5;207-213.
- ⁵⁶ **Xue L., Murray J.H., y Tolkovsky A.M.** The ras/phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/ERK pathways function as independent survival modules each of which inhibits a distinct apoptotic signaling pathway in sympathetic neurons. *J Biol Chem.* 1999;275;8817-8824.
- ⁵⁷ **Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., And Greenberg M.E.** Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science.* 1995;270;1326-1331.
- ⁵⁸ **Valledor A.F., Comalada M., Xaus J., And Celada A.** The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *J Biol Chem.* 2000;275;7403-7409.
- ⁵⁹ **Willis S., y Nisen P.** Differential induction of the mitogen-activated protein kinase pathway by bacterial lipopolysaccharide in cultured monocytes and astrocytes. *Biochem J.* 1996; 313;519-524.
- ⁶⁰ **Kendel E.S., Hay N.** The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* 1999;253:210-229.
- ⁶¹ **Madrid L.V., Mayo M.W., Reuther J.Y., Baldwin Jr. A.S.** Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the I kappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem.* 2001;276: 1894-1894.
- ⁶² **Toker A.** Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol.* 2000;57;652-658.
- ⁶³ **Belham C., Wu S., And Avruch J.** Intracellular signalling: PKD1-a kinase at the hub of things. *Curr Biol.* 1999; 11:9(3):R93-6.
- ⁶⁴ **Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Lin B., Watanabe G., Haines 3rd G.K., Siegel P.M., Hung M.C., Yarden Y.,**

-
- Horowitz J.M., Muller W.J., Pestell R.G.** Ciclyn D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2000;20;672-683.
- ⁶⁵ **Hirata M., Kanematsu T., Takeuchi H., Yagisawa H.** Pleckstrin homology domain as an inositol compound binding module. *Jpn J Pharmacol.* 1998;76(3):255-63.
- ⁶⁶ **Leslie, N. R., Biondi, R. M. and Alessi, D. R.** Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem Rev.* 2001;101: 2365–2380.
- ⁶⁷ **Moore, M. J., Kanter, J. R., Jones, K. C. and Taylor, S. S.** Phosphorylation of the catalytic subunit of protein kinase A. Autophosphorylation versus phosphorylation by phosphoinositide-dependent kinase-1. *J. Biol. Chem.* 2002: 277;47878–47884.
- ⁶⁸ **Alessi D.R., Deak M., Casamayor A., Caudwell F.B., Morrice N., Norman D.G., Gaffney P., Reese C.B., MacDougall C.N., Harbison D., et al.** 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol.* 1997;7;776-789.
- ⁶⁹ **Parker P.J., and Parkinson S.J.** AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochem Soc Trans.* 2001;29;861-863.
- ⁷⁰ **Newton A.C.** Regulation of the ABC kinase by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J.* 2003;370; 361-371.
- ⁷¹ **Biodin R.M.** Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation. *TRENDS Biochem Sciences.* 2004; 29:137-142.
- ⁷² **Peterson R.T. and Schreiber S.L.** Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr Biol.* 1999; 9:R521.
- ⁷³ **Toker A.L., Cantley C.** Signalling through the lipids products of phosphoinositide-3-oh kinase. *Nature.* 1997;387-673.

-
- ⁷⁴ **Vanhaesebroeck B., and Alessi D.R.** The PI-3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 2000: 346;561-576.
- ⁷⁵ **Toker A., and Newton A.C.** Cellular signaling:pivoting around PDK-1. *Cell.* 2000:103;185-188.
- ⁷⁶ **Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., and Hemmings B.A.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996:15;6541-6551.
- ⁷⁷ **Andjelkovic M., Alessi D.R., Meier R., Fernández A., Lamb N.J., French M., Cron P., Copen P., Lucocq J.M., and Hermmings B.A.** Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem.* 1997: 272;31515-31524.
- ⁷⁸ **Meier R., Alessi D.R., Cron P., Andjelkovic M., and Hermmings B.A.** Mitogenic activation, phosphorylation , and nuclear translocation of protein kinase B. *J Biol Chem.* 1997:272;30491-30597.
- ⁷⁹ **Meier R., Equinca A., Stephens L.R., and Hawkins P.T.** Protein kinase B and rac are activated in parallel within a phosphatidylinositide 3 OH-kinase-controlled signaling pathway. *J Biol Chem.* 1998:273;11248-11256.
- ⁸⁰ **Meier R., Alessi D.R., Cron P., Andjelkovic M., and Hermmings B.A.** Mitogenic activation, phosphorylation , and nuclear translocation of protein kinase B. *J Biol Chem.* 1997:272;30491-30597.
- ⁸¹ **Moule S.K., Welsh G.I., Edgell N.J., Foulstone E.J., Proud C.G., and Denton R.M.** Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and b-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells: activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and-insensitive mechanisms. *J.Biol.*1997:272;7713-7719.
- ⁸² **Konishi H., Matsuzaki H., Tanaka M., Ono Y., Tokunaga C., Kuroda S., and Kikkawa U.** Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hiperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA .*1996:93;7639-7643.

-
- ⁸³ **Sable C.L., Filippa N., Hemmings B., and Van Obberghen E.** cAMP stimulates protein kinase B in a wortmannin-insensitive manner. *FEBS Lett.* 1997;409;253-257.
- ⁸⁴ **Yano S., Tokumitsu H., and Soderling T.R.** Calcium promotes cell survival through Cam-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* (London).1998;396;584-587.
- ⁸⁵ **Delgado-Acevedo Blanca.** Tesis de Licenciatura: Efectos de I ψ s sobre la activaci3n de Akt. Facultad de Odontolog3a UNAM. 2003. 39 p.
- ⁸⁶ **Kaneko S., Feldman R.I., Yu L., Wu A., Gritsko T.M., Shelley S.A., Nicosia S.V., Nobori T., and Cheng J.Q.** Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. Cloning of Akt2 promoter. *J Biol Chem* 2002;277; 23230-23235.
- ⁸⁷ **Meredith J.E., Fazeli B., and Schwartz M.A.** The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 1993;4;953-9261.
- ⁸⁸ **Sugatani T. and Hruska K.A.** Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *Biolog Chemistry J.* 2005;280;3583-3589.
- ⁸⁹ **Kops G.J., De Ruiter N.D., De Vries-Smits A.M., Bos J.L., and Burgering B.M.** Direct control of the Forkhead transcription factor AFX BY protein kinase B. *Nature.* 1999;398;630-634.
- ⁹⁰ **Burow M.E., Weldon C.B., Melnik L.I., Duong B.N., Collings-Burow B.M., Beckman B.S., and McLachlan J.A.** PI-3K/Akt regulatin of NF-KB signaling events in supresi3n of TNF-induced apostosis. *Biochim Biophys Acta.* 2000: 271; 342-351.
- ⁹¹ **Eves E.M., Xion W., Bellacosa A., Kennedy S.G., Tschilis P.N., Rosner M.R., and Hay N.** Akt, a target of phosphatilinositol 3-kinase, inghibits apoptosis in a differentiatign neuronal cell line. *Mol Cell Biol.* 1998;18;2143-2152.

-
- ⁹² **Kauffmann-Zeh A., Rodriguez-Viciano P., Ulrich E., Gilbert C., Coffey P., Downward J., and Evan G.** Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*. 1997.385:544.
- ⁹³ **Pap M., and Cooper G.M.** Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 1998:273;19929-19932.
- ⁹⁴ **Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A., and Sessa W.C.** Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999:400;792-796.
- ⁹⁵ **Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S., and Reed J.C.** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998:282;1318-1321.
- ⁹⁶ **Panka D.J., Mano T., Sahara T., Walsh K., and Mier J.W.** Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem*. 2001:276;6893-6893.
- ⁹⁷ **Osaka M., Oshimura M., and Ito H.** PI-3K-Akt pathway its function and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004:9;667-676.
- ⁹⁸ **Sheik M.P., and Woodgett J.R.** Unravelling the activation mechanism of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett*. 2003:546; 108-112.
- ⁹⁹ **Kim D., and Chung J.** Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem. Mol Biol*. 2002:35;106-115.
- ¹⁰⁰ **Monick M.M., Carter A.B., Flaherty D.M., Peterson M.W., Hunninghake G.W.** Protein kinase C plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J Immunol*. 2000:165;463-472.

-
- ¹⁰¹ **Monick M.M., Carter A.B., Flaherty D.M., Peterson M.W., Hunninghake G.W.** Protein kinase C plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J Immunol.* 2000;165;463-472.
- ¹⁰² **Chen R.H., Ding W.V., McCormick F.** Wnt signaling to b-catenin involves two interactive components: glycogen synthase kinase-3b inhibition and activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 2000: 275; 17894-17899
- ¹⁰³ **Seidensticker M.J., and Behrens J.** Biochemical interactions in the Wnt pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1495 (2);168-182.
- ¹⁰⁴ **Ding W.V., Chen R.H., and McCormick F.** Differential regulation of GSK-3 b by insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2000; 275(42):32475-32481.
- ¹⁰⁵ **Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julia, Raff Martin, Roberts Keith and Watson D James.** *Biología Molecular de la Célula.* Editorial Omega. 3ra Ed.1994.1397pp.
- ¹⁰⁶ **Evans T., Tosenthal E.T., Youngblom J., Distel D., Hunt T.** Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 1983;33;389-396.
- ¹⁰⁷ **Sherr C.J.** Mamalian G1 cyclins. *Cell.*1993 :73;1059-1065,.
- ¹⁰⁸ **Claesson-Welsh L.** Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem.* 1994;269(51):32023-32026.
- ¹⁰⁹ **Monick M.M., Carter A.B., Robeff P.K., Flaherty D.M., Peterson W., Hunninghake W.** Lipopolysaccharide Activates Akt in Human Alveolar Macrophages Resulting in Nuclear Accumulation and Transcriptional Activity of b- Catenin. *J of Immunology.* 2001;166; 4713– 4720.
- ¹¹⁰ **Freshney R.I.** *Culture of Animal Cells.* Third Edition. New York, New York. Wiley-Lys Ed. 1996.389p.
- ¹¹¹ **Terrance G.C.** *The tools of Biochemistry* , New York. Ed. Wiley Interscience. 1977. 423p.

-
- ¹¹² **Van der Heyden M.A., Rook M.B., Hermans M. M., Rijksen G., Boonstra J., Defize L. H., and Destree O.H.** Identification of connexin 43 as a functional target for Wnt signalling. *J. Cell. Sci.* 1998: 111;1741-1749.
- ¹¹³ **Fives-Taylor P., Meyer D., Mintz K.** Virulence factors of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* β -catenina. *J Periodontol.* 1996: 67;291-297.
- ¹¹⁴ **Herrera-Velit P., and Reiner N.E.** Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-Kinase in human monocytes. *J Immuno.* 1996;156:1157.
- ¹¹⁵ **Toker A., Newton L.C.** Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical pdk-2 site. *J Biol Chem.* 2000: 275;8271-8279.
- ¹¹⁶ **Procyk K.J., Kovarik P., Von Gabain A., and Baccarini M.** *Salmonella typhimurium* and lipopolysaccharide stimulate extracellularly regulated kinase activation in macrophages by a mechanism involving phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase D as novel intermediates. *Infect. Immun.* 1999;67;1011-1017.
- ¹¹⁷ **Herrera-Velit P., Knutson K.L., and Reiner N.E.** Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of protein kinase C- ζ in bacterial lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:16445-16452.
- ¹¹⁸ **Franke T.F., Yang S.I., Chan T.O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D.K., Kaplan D.R., and Tsichlis P.N.** The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* . 1995;81;727-736.
- ¹¹⁹ **Datta S.R., Brunet A., and Greenberg M.E.** Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* 1999;13;2905-2927.
- ¹²⁰ **Calera M. R., Martinez C., Liu H., Jack A. K., Birnbaum M. J., and Pilch P. F.** Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 1998;273;7201-7204.

-
- ¹²¹ **Murray N.R., Davidson L.A., Chapkin R.S., Clay Gustafson W., Schattenberg D.G., Fields A.P.** Overexpression of protein kinase C β 1 induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *J Cell Biol.* 1999; 145:699-707.
- ¹²² **Orena S. J., Torchia A. J., and Garofalo R. S.** Inhibition of glycogen synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3 L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2000;275:15765.
- ¹²³ **Kuhl M., Sheldahl L. C., Park M., Miller J. R., and Moon R. T.** The Wnt/Ca²⁺ pathway a new vertebrate wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 2000; 16:279-283.
- ¹²⁴ **Tetsu O., and McCormick F.** b-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 1999:398-422.
- ¹²⁵ **He T.C., Sparks A. B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L. T., Morin P. J., Vogelstein B., and Kinzler K. W.** Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998; 281:1509-1512.

Anexos

Anexo I

CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS.

Se tripsinizo el cultivo. Se requiere aproximadamente 10^6 células /mL para este procedimiento. Se mezcló adecuadamente la suspensión y se colectó 10 μ l de la suspensión en tubo eppendorf. Se tomó 10 μ l de la muestra y se transfirieron inmediatamente al borde de la cámara. Se colocó el hemocitómetro en el microscopio de objetivos invertidos. Se enfoca la cámara hasta que se observe el cuadrante. Se contaron las células en los 4 cuadrantes que rodean al cuadrante central (cada uno de 1 mm²). Para el análisis calcular el promedio de los cuatro cuadrantes, multiplicar por la constante 1×10^4 y por 2 que es el factor de dilución el número que se obtenga representa el número de células/mL.

ACEPTACION: de 100 a 300 células por cuadrante.

RECHAZO: Número muy grande de células que impida el conteo.