



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“EL EFECTO DEL ÁCIDO LIPOTEICOICO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE
SEÑALES EN FIBROBLASTOS GINGIVALES DE PACIENTES
DIABÉTICOS.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

NOÉ JERÓNIMO GONZÁLEZ

TUTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS
ASESORA: C.D. SANTA RITA ARROYO CRUZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque son lo que más quiero, porque siempre me han brindado su apoyo y cariño, y sin ellos no hubiera logrado tanto.

A mis hermanos, por todo su apoyo, comprensión, ayuda y el tiempo que me han dedicado.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, quien me abrió la puerta a nuevos conocimientos y al sorprendente campo de la investigación. Gracias a su ayuda todo esto ha sido posible.

A la C.D. Rita Arroyo Cruz, gracias amiga por todo tu tiempo y dedicación a esta tesis, tu ayuda ha sido única.

A todos mis profesores que tantas valiosas enseñanzas me han dejado, por compartir todo su conocimiento y su experiencia.

A todos mis amigos y compañeros que han estado conmigo, por todo ese tiempo que pasamos juntos en la facultad y a todos los amigos que además han compartido tantos momentos especiales.

Existen personas especiales en mi vida que me han ayudado en momentos difíciles, gracias por tu gran apoyo y por todas tus aportaciones a esta tesis.



Índice

1.	Abreviaturas	3
2.	Introducción	4
3.	Antecedentes	7
3.1	Periodonto normal	7
3.1.1	Características Clínicas	7
3.1.1.1	Encía marginal	7
3.1.1.2	Encía insertada	8
3.1.1.3	Encía interdental	9
3.1.1.4	Surco gingival	10
3.1.2	Características microscópicas	10
3.1.2.1	Epitelio gingival	10
3.1.2.2	Epitelio del surco	12
3.1.2.3	Epitelio de unión	12
3.1.3	Líquido gingival	13
3.1.4	Tejido conectivo gingival	13
3.1.4.1	Fibras gingivales	14
3.1.4.2	Grupo Gingivodental	15
3.1.4.3	Grupo Circular	15
3.1.4.4	Grupo transeptal	15
3.1.5	Elementos celulares	16
3.1.6	Irrigación sanguínea	18
3.1.7	Ligamiento periodontal	19
3.1.8	Cemento	21
3.1.9	Proceso alveolar	22
3.2	Enfermedad periodontal	23
3.2.1	Etiología	24
3.2.2	Patogenia	27
3.2.3	Clasificación	29
3.3	Diabetes mellitus	31
3.3.1	Diabetes mellitus tipo 1	33
3.3.2	Diabetes mellitus tipo 2	34
3.4	Páncreas	35
3.4.1	Insulina	37
3.5	Manifestaciones bucales de la diabetes	40
3.6	Invasión bacteriana	44
3.6.1	Bacterias gram positivas y gram-negativas	44
3.6.2	Envoltura celular	46
3.6.2.1	Envoltura celular gram-positivo	46
3.6.3	Función de la membrana citoplásmica	47
3.6.3.1	Permeabilidad y transporte	48
3.6.3.2	Transporte de electrones y fosforilación oxidativa	48
3.6.3.3	Excreción de exoenzimas hidrolíticas	48
3.6.3.4	Funciones biosintéticas	48



3.6.3.5	Sistemas quimiotácticos	49
3.6.3.6	Pared celular	49
3.6.3.7	Componentes esenciales de las paredes celulares gram positivas	49
3.6.4	Ácido teicoico y teicurónico	50
3.6.4.1	Polisacáridos	50
3.6.5	<i>Streptococos sanguis</i>	50
3.7	Ácido Lipoteicoico (LTA)	51
3.8	Señales celulares y vías de transducción	54
3.8.1	Vías de transducción	55
3.8.2	Vía Map Kinasa	56
3.8.3	ERK	57
3.8.4	JNK	58
3.8.5	p38	58
3.8.6	AKT	59
4.	Planteamiento del problema	60
5.	Justificación.	62
6.	Hipótesis	63
6.1	Hipótesis verdadera	63
6.2	Hipótesis falsa	63
7.	Objetivos	64
7.1	Objetivo general	64
7.2	Objetivo específico	64
8.	Tipo de estudio	64
9.	Material	65
9.1	Equipo	65
9.2	Reactivos	66
10.	Métodos	68
10.1	Cultivo de fibroblastos gingivales humanos	68
10.2	Detección de fosforilación de proteínas	68
11.	Resultados	70
12.	Conclusión	88
13.	Discusión	89
14.	Bibliografía	96



1. Abreviaturas

AMPC = Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

DMEM = Medio de cultivo *Eagle* modificado

ERK= Proteína cinasa activada extracelularmente

FGH= Fibroblastos gingivales humanos.

LTA= Acido lipoteicoico

MAPK= Proteína cinasa activada por mitógeno

MAPKK= Proteína cinasa activadora de MAPK

MAPKKK= Proteína cinasa activadora de MAPK

SBF= Suero bovino fetal

kDa= Kilodaltones

(MODS)= síndrome de disfunción múltiple de órganos



2. Introducción

En los Estados Unidos de América se presentan aproximadamente 500,000 casos de sepsis y del síndrome de disfunción múltiple de órganos.²⁵ Estos padecimientos son ocasionados por bacterias gram-negativas, en específico por los lipopolisacáridos. Actualmente se sabe que los lipopolisacáridos por si mismos no pueden producir todas las características del síndrome de disfunción múltiple de órganos. También participan bacterias gram-positivas que carecen de lipopolisacáridos. La bacteria *Staphylococcus sanguis* es una de las bacterias que se obtiene de pacientes con sepsis.²⁶⁻²⁹ Los peptidoglucanos y el ácido lipoteicoico son dos de los principales componentes de las bacterias gram-positivas.

Se han identificado los tres eventos que son ocasionados por bacterias gram-positivas y que conducen a la liberación de citocinas entre los que se encuentran: En primer lugar, la presencia de componentes de las bacterias gram-positivas, en segundo lugar, la interacción con receptores presentes en las células inmunes y finalmente la activación de mecanismos de transducción que conducen a la expresión de citocinas.

El ácido lipoteicoico es un componente único de la pared celular de las bacterias gram-positivas, pertenece a la clase de polimeros de azúcar fosfato que contiene grupos acilo anclados a la membrana celular. Una forma no acetilada del LTA es el ácido teicoico, que está unido covalentemente al peptidoglucano de la pared celular de las bacterias gram-positivas. Con LTA purificado se demostró que activa a las células inmunes las cuales sintetizan citocinas.¹⁶

La diabetes como factor de riesgo de la enfermedad periodontal ha sido una idea analizada y debatida durante muchos años. Se ha propuesto una



cantidad de mecanismos potenciales por los cuales esta enfermedad podría contribuir al empeoramiento de la situación periodontal. Dos estudios (Pommereau y cols., 1992; Pinson y cols., 1995) que se dedicaron a estudiar la diabetes en niños y adolescentes encontraron una gingivitis más acentuada en los pacientes con diabetes mellitus, dependientes de insulina, pero no lograron encontrar diferencias notables en las condiciones periodontales entre individuos diabéticos y sanos. Otros estudios han demostrado condiciones periodontales más graves en los pacientes adultos con diabetes.¹ Un estudio realizado por Emrich y cols. (1991), el cual empleó un análisis multivariado en una muestra amplia de sujetos con alto predominio de diabetes tipo 2, demostró que los diabéticos tenían tres veces más posibilidades de sufrir pérdida de inserción y de hueso alveolar que los no diabéticos. La mayor parte de los estudios indican, además, que la diabetes prolongada, su iniciación precoz y el mal control metabólico, pueden generar un mayor riesgo de periodontitis destructiva.¹

Por otra parte, múltiples estudios recientes que incluyen exclusivamente a pacientes diabéticos no lograron demostrar una clara asociación entre los parámetros usados en la evaluación del estado diabético y las condiciones periodontales. La microflora subgingival se presenta como similar en las bolsas enfermas de los pacientes, cualquiera que sea la gravedad de su diabetes (Sastrowijoto y cols., 1989), pero los pacientes con diabetes prolongada y mal controlada experimentan una mayor pérdida de inserción y de hueso alveolar que los diabéticos con buen control metabólico (Safkan y Ainamo, 1992). En 1993, Oliver y cols., demostraron un aumento en la concentración de enzimas catabólicas en el líquido crevicular gingival de los pacientes con diabetes mal controlada. También se ha relacionado el progreso de la periodontitis con el control metabólico de la enfermedad. En un estudio de Sepala y cols., pacientes con diabetes prolongada fueron seguidos durante un periodo de dos a tres años. Estos investigadores demostraron que los pacientes con un buen control metabólico



presentaban una menor pérdida de inserción y de hueso alveolar longitudinal que los pacientes mal controlados, pese a niveles similares de control de placa. En un estudio retrospectivo de pacientes con registros de largo plazo de control metabólico (Tervonen y Oliver, 1993) se demostró que el sarro y el control prolongado de la diabetes eran predictivos de profundidad de sondeo mayor o igual a 4 mm.¹



3. Antecedentes

3.1. Periodonto Normal

El periodonto esta formado por los tejidos de soporte y revestimiento del diente. Se divide en dos partes: la encía y el aparato de inserción compuesto por el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar.³

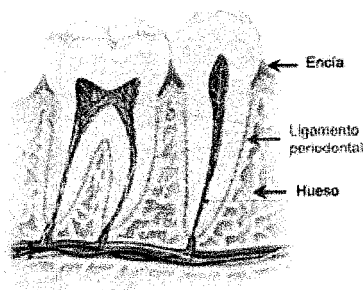


Fig.1 Esquema del periodonto

www.clinicadentalausin.com

3.1.1. Características Clínicas

La encía forma parte de la mucosa bucal, es la parte que reviste las apófisis alveolares que rodean el cuello de los dientes. Anatómicamente, la encía se divide en marginal, insertada e interdental.³

3.1.1.1. Encía Marginal

Es también llamada encía libre y corresponde al margen terminal o borde de la encía que rodea los dientes a modo de collar, hasta una depresión lineal superficial, llamado surco gingival libre, que la separa de la encía



insertada, esta parte de la encía forma la pared de tejido blando del surco gingival.³



Fig. 2 Encía marginal

www.secom.org

3.1.1.2. Encía Insertada

Es la encía que continúa con la encía marginal, se extiende hasta la mucosa alveolar que es relativamente laxa y móvil, y se separa de ésta por la unión mucogingival. Esta encía es firme y resiliente y está fijada con fuerza al periostio subyacente del hueso alveolar.³

El ancho de la encía insertada corresponde a la distancia entre la unión mucogingival y la proyección sobre la superficie externa del fondo del surco gingival. La unión mucogingival permanece invariable durante la vida adulta, por lo tanto, la variación del tamaño de la encía insertada depende de las modificaciones de la posición del extremo coronario. El ancho de la encía insertada aumenta con la edad y en los dientes sobre erupcionados

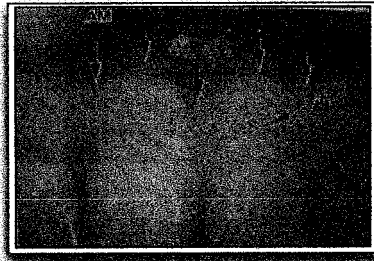


Fig. 3 Encía insertada
Lindhe. Periodontología Clínica. 2000.

3.1.3.3. Encía Interdental

Ocupa el espacio interproximal por debajo del área de contacto de cada diente, ésta puede ser piramidal o tener forma de "col", en el primer caso, la punta de una papila se halla inmediatamente por debajo del punto de contacto, la forma de col presenta una depresión a modo de valle que conecta una papila vestibular y otra lingual y se adapta a la morfología de contacto interproximal. La forma de la encía interdental depende del punto de contacto entre los dos dientes contiguos y de la presencia o ausencia de cierto grado de recesión. La superficie lingual y vestibular de la encía convergen hacia el área de contacto interproximal, mientras que las mesiales y distales son algo cóncavas. Las papilas interdentes están formadas por una continuación de la encía marginal de los dientes adyacentes, la porción intermedia se compone de encía insertada.³



Fig. 4 Encía interdental

www.dent.unizh.ch/ppk/parodontologie/gingiva

3.1.1.4. Surco Gingival

Es el surco poco profundo que rodea al diente, por un lado está formado por la superficie dental y por el otro el revestimiento epitelial del margen libre de la encía. En circunstancias de normalidad mide en promedio 1.8 mm de profundidad.³

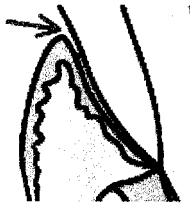


Fig. 5 Surco gingival

www.vet.ed.ac.uk/

3.1.2. Características Microscópicas

3.1.2.1. Epitelio Gingival

La encía está constituida por epitelio escamoso estratificado que puede serlo o no dependiendo de la zona de la encía.² En términos morfológicos y



funcionales se divide en: epitelio bucal, epitelio de surco o el epitelio de unión.³

La función principal del epitelio gingival es proteger las estructuras profundas y permitir un intercambio selectivo con el medio bucal, esto se logra mediante la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.⁴

Las células de Langerhans son de tipo dendrítico, se localizan en los niveles suprabasales, pertenecen al sistema mononuclear fagocítico como monolitos modificados derivados de la médula ósea. Contienen gránulos alargados y se les considera macrófagos.³ Estas células poseen una función relevante en la reacción inmunitaria y actúan como células que presentan los antígenos a los linfocitos, tienen gránulos específicos, se localizan en el epitelio bucal de la encía normal y, en cantidades menores, en el epitelio del surco.

Las células de Mekel se ubican en las capas más profundas del epitelio, poseen terminaciones nerviosas y se conectan con células contiguas mediante desmosomas.³

El epitelio se une al tejido conectivo mediante la membrana basal con una condensación reticular de fibras de tejido conectivo subyacente, sobre todo con fibras de colágeno de tipo IV.³ Cubre la cresta y la superficie exterior de la encía marginal y la superficie de la cresta insertada. Está queratinizado, paraqueratinizado o presenta estas variedades combinadas. El grado de queratinización gingival disminuye con la edad y varía en diferentes zonas de la mucosa bucal



3.1.2.2. Epitelio del Surco.

Es el epitelio que recubre el surco gingival, es escamoso estratificado no queratinizado y sin proyecciones interpapilares que se extiende desde el límite coronal desde el epitelio de unión hasta la cresta del margen gingival. La importancia del epitelio de surco radica en que en ocasiones actúa como una membrana semipermeable a través de la cual los productos tóxicos de las bacterias pasan hacia la encía y el líquido gingival se filtra hacia el epitelio del surco.³

3.1.2.3. Epitelio de Unión.

El epitelio de unión consta de una banda que rodea al diente de modo de collar constituida por epitelio escamoso estratificado no queratinizado. El epitelio de unión se forma por la confluencia del epitelio bucal y el epitelio reducido del esmalte durante la erupción dentaria. El epitelio de unión se fija a la superficie dental mediante una membrana basal interna y, con el tejido conectivo gingival, por medio de una lámina basal externa que posee la misma estructura que otras uniones de epitelio con tejido conectivo en otras partes del cuerpo.³

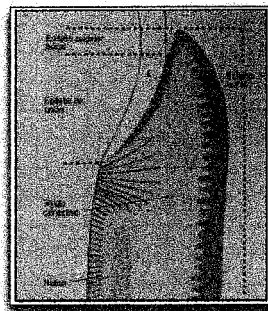


Fig. 6 Epitelios gingivales

Lindhe. Periodontología Clínica. 2000



3.1.3. Líquido Gingival

El surco gingival contiene un líquido que se filtra hacia él desde el tejido conectivo gingival a través del delgado epitelio del surco. Las funciones de este líquido gingival son: eliminar el material del surco, contiene proteínas plasmáticas que podrían mejorar la adhesión del epitelio con el diente, posee propiedades antimicrobianas y ejerce actividad inmunitaria para proteger la encía.⁴

3.1.4. Tejido Conectivo Gingival

El tejido conectivo de la encía se denomina lámina propia, y consta de dos capas: un estrato papilar subyacente al epitelio, que incluye proyecciones papilares entre las proliferaciones epiteliales interpapilares, y una capa reticular contigua al periostio del hueso alveolar, el tejido conectivo posee un compartimiento celular y otro extracelular compuesto por fibras y sustancia fundamental.³

La sustancia fundamental ocupa el espacio entre fibras y células, es amorfa y posee un contenido elevado de agua.³ Se compone de proteoglicanos, principalmente ácido hialurónico, sulfato de condroitina y glucoproteínas, sobre todo fibronectina. La fibronectina fija a los fibroblastos a las fibras y a otros muchos componentes de la matriz intercelular, o contribuye a mediar la adhesión y migración de las células.

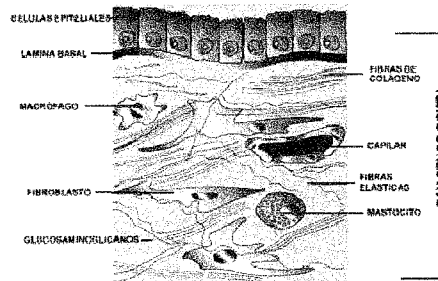


Figura 7. Componentes del tejido conectivo
www.cienciahoy.org.ar/hoy40/molecb.htm

Los tres tipos de fibras de tejido conectivo son colágenas, reticulares y elásticas.³ La colágena de tipo I conforma el mayor componente de la lámina propia y confiere al tejido gingival resistencia a la tensión. La colágena de tipo IV se ramifica entre los haces colágenos de tipo I y se continúa con fibras de la membrana basal y las paredes de los vasos sanguíneos.

El sistema de fibras elásticas se integra con fibras de oxitalán, elaunina y elastina distribuidas entre las fibras colágenas.

3.1.4.1. Fibras Gingivales

El tejido conectivo de la fibra marginal es de naturaleza densamente colágena y contiene un sistema predominante de haces de fibras colágenas llamadas fibras gingivales, integradas por colágena de tipo I.

Las fibras gingivales poseen tres funciones³:

- Aseguran firmemente la encía marginal contra el diente.



- Proveen la rigidez necesaria para soportar las fuerzas de masticación sin separarse de la superficie dentaria.
- Unen la encía marginal libre con el cemento de la raíz y la encía insertada contigua.

Las fibras gingivales se agrupan en tres grupos: gingivodental, circular y transeptal.

3.1.4.2. Grupo Gingivodental.

Las fibras de esta clase corresponden a las superficies interproximales, linguales y vestibulares. Se insertan en el cemento, justo por debajo del epitelio, en la base del surco gingival. En las superficies vestibulares y linguales, se proyectan como abanico desde el cemento hasta la cresta y la superficie externa de la encía marginal, para terminar a poca distancia del epitelio. También se extienden por fuera del periostio de los huesos alveolares vestibular y lingual y terminan en la encía insertada o se unen con el periostio. En sentido interproximal, las fibras gingivodentales se extienden hacia la cresta de la encía interdental.³

3.1.4.3. Grupo Circular.

Las fibras circulares atraviesan el tejido conectivo de la encía marginal e interdental y rodean al diente en forma de anillo.³

3.1.4.4. Grupo Transeptal.

Localizadas en el espacio interproximal, las fibras del grupo transeptal forman haces horizontales que se extienden entre el cemento de dientes adyacentes, en los cuales se insertan. Se ubican entre el epitelio del surco gingival y la cresta del hueso interdental.⁴

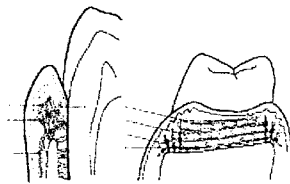


Fig.8. Fibras gingivales

www.dent.ucla.edu/pic

3.1.5. Elementos Celulares del Tejido Conectivo.

El fibroblasto es el elemento celular predominante del tejido conectivo gingival. De las células residentes en el tejido conectivo, las distribuidas con mayor tamaño y con mayor abundancia son los fibroblastos.³¹ Estas células aparecen numerosamente entre los haces de fibras. Los fibroblastos sintetizan colágena y fibras elásticas, así como las glucoproteínas y los glucosaminoglucanos de la sustancia intercelular amorfa. Además los fibroblastos regulan la degradación de la colágena.³

Los fibroblastos que sintetizan la matriz extracelular del tejido conectivo se derivan de células mesenquimatosas indiferenciadas. Pueden encontrarse en estado activo o en estado de reposo.³¹

Los fibroblastos activos suelen residir en relación estrecha con los haces de colágena, en los que se encuentran situados de manera paralela al eje largo de la fibra. Son células fusiformes alargadas que poseen un citoplasma de tinción pálida. La parte más notable de la célula es el núcleo ovoide de color oscuro, que es de gran tamaño y granuloso, además contiene un nucleolo bien definido. Cuando se observan con microscopio electrónico, revelan un aparato de golgi prominente y abundante retículo endoplásmico rugoso, en especial cuando la célula está elaborando activamente matriz.³¹



Los fibroblastos inactivos son células más pequeñas y más ovoides y poseen citoplasma acidofílico, su núcleo es más pequeño alargado y de tinción más oscura.³¹

Los fibroblastos son las células que producen las fibras y la sustancia intersticial amorfa de los tejidos conectivos normales. Pueden poseer amplios procesos citoplasmáticos o presentar forma de huso su abundante citoplasma es marcadamente basófilo y sus nucleolos, por lo general son prominentes, lo que indica una alta síntesis proteica. La fina estructura de los fibroblastos es característica de las células que secretan proteínas de manera muy activa.⁹

Mientras que su función formadora de colágena se conoce perfectamente, no se valora igual que los fibroblastos también producen colagenaza y por lo tanto, puedan desdoblar la colágena, incluyendo la colágena residual que queda cuando la matriz de hueso es resorbida. Es posible que la colágena este presente dentro de los fibroblastos, pero confinado en los fagosomas o lisosomas secundarios y no se le encuentra dentro de los organelos secretorios. De este modo, los fibroblastos son capaces de producir nueva colágena y desdoblar la colágena existente al mismo tiempo.⁹

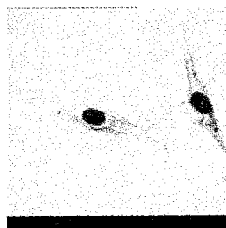


Fig.9 Fibroblastos

biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/catquery.



Los mastocitos, distribuidos en el cuerpo, abundan en el tejido conectivo de la mucosa bucal y la encía. Los macrófagos fijos y los histiocitos están presentes en el tejido conectivo gingival como componentes del sistema mononuclear fagocítico y derivan de los monocitos sanguíneos.³ Los adipocitos y los eosinófilos, son escasos pero también se hallan en la lámina propia.⁴

En la encía clínicamente normal, hay focos pequeños de plasmocitos y linfocitos en el tejido conectivo cercano a la base del surco. En el tejido conectivo gingival y el surco se observan cantidades relativamente altas de neutrófilos. Estas células inflamatorias aparecen casi siempre en cantidades pequeñas en la encía clínicamente normal.³

3.1.6. Irrigación Sanguínea, Vasos Linfáticos y Nervios

Las tres fuentes de irrigación sanguínea de la encía son las siguientes:

-Arteriolas suprapariosteicas.

Corren a lo largo de la superficie vestibular y lingual del hueso alveolar. A partir de ellas, los capilares se extienden a lo largo del epitelio del surco y entre las proliferaciones reticulares de la superficie reticular exterior. Algunas ramas de las arteriolas pasan a través del hueso alveolar hacia el ligamento periodontal o corren sobre la cresta del hueso alveolar.

-Vasos del ligamento periodontal.

Se extienden hacia la encía y establecen anastomosis con capilares en el área del surco.



-Arteriolas.

Emergen de la cresta del tabique interdental y que se extienden paralelas a la cresta del hueso para anastomosarse con vasos del ligamento periodontal, con capilares en áreas del surco gingival y vasos que discurren sobre la cresta alveolar.³

Por debajo del epitelio en la superficie gingival externa, los capilares se extienden hacia el tejido conectivo papilar entre las proyecciones epiteliales interpapilares en la forma de asas terminales agudas con ramas eferentes y aferentes, espirales y várices.³

El drenaje linfático de la encía capta los vasos linfáticos de las papilas de tejido conectivo, sigue hacia la red de colección externa al periostio del proceso alveolar y después hacia los ganglios linfáticos regionales.

La innervación gingival deriva de las fibras que surgen de los nervios presentes en el ligamento periodontal y de los nervios labiales, bucales y palatinos.³

3.1.7. Ligamento Periodontal

Es el tejido conectivo que rodea la raíz y la conecta con el hueso, se continúa con el tejido conectivo de la encía y se comunica con los espacios medulares a través de los conductos vasculares del hueso³. El ligamento periodontal se compone, de modo principal, de fibras colágenas dispuestas en haces². Las fibras son los elementos más importantes del ligamento periodontal, son de colágena, están dispuestas en haces y siguen una trayectoria sinuosa en cortes longitudinales. Las porciones terminales de las fibras principales que se insertan en el cemento y el hueso reciben el nombre de fibras de Sharpey, los haces de estas fibras principales constan



de fibras individuales que forman una red continua de conexiones entre el hueso y el diente.³

Las fibras principales del ligamento periodontal están dispuestas en seis grupos:

- Grupo transeptal: Estas fibras se extienden en sentido interproximal sobre la cresta alveolar y se insertan en el cemento de los dientes adyacentes. Se puede considerar que estas fibras pertenecen a la encía porque no se insertan en el hueso.
- Grupo de la cresta alveolar: Estas fibras se extienden en sentido oblicuo desde el cemento apenas por debajo del epitelio de unión hasta la cresta alveolar. También corren desde el cemento, por encima de la cresta alveolar, hasta la capa fibrosa del periostio que cubre el hueso alveolar. Evitan la extrucción del diente y se oponen a los movimientos laterales.
- Grupo horizontal: Las fibras horizontales se extienden perpendiculares al eje longitudinal del diente, desde el cemento hasta el hueso alveolar.
- Grupo de fibras oblicuas: Las fibras oblicuas son el grupo más voluminoso del ligamento periodontal, se extienden desde el cemento en dirección coronal y oblicua hacia el hueso. Sostienen la mayor parte de la tensión masticatoria vertical y la transforman en tensión en el hueso alveolar.
- Grupo apical: Estas fibras divergen de manera irregular desde el cemento hasta el hueso en el fondo del alveolo. No se encuentran sobre las raíces de formación incompleta.
- Grupo interradicular: las fibras interradiculares se abren en abanico desde el cemento hasta el diente en las zonas de las furcaciones de los dientes multirradicales³

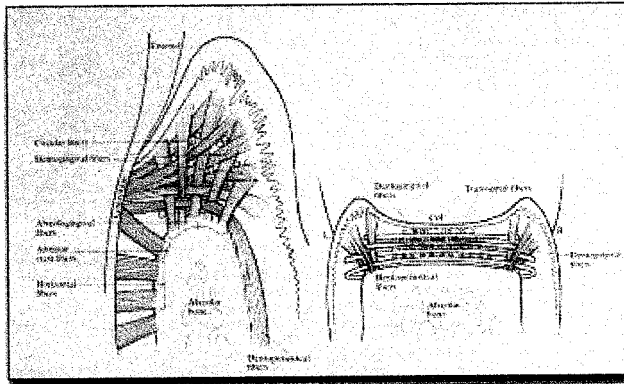


Fig. 10 Fibras del ligamento periodontal
Guttman y Harrison. 1994

El ligamento periodontal también contiene una porción considerable de sustancia fundamental que rellena los espacios entre las fibras y las células, consta de dos componentes principales: glucosaminoglucanos y glucoproteínas así como un contenido elevado de agua.³

3.1.8. Cemento

El cemento es un tejido duro cuya sustancia intercelular se calcifica y se presenta en capas al rededor de la raíz dental. Existen dos clases de cemento radicular: acelular y celular.²

El cemento acelular es amorfo y transparente compuesto por cementoblastos que depositan la sustancia sin llegar a incluirse en el diente. Este cemento cubre siempre la parte cervical del diente y en ocasiones se extiende hacia casi toda la raíz, excepto en la porción apical donde se haya el cemento celular.²



Este cemento es el primero en formarse y cubre desde el tercio cervical hasta la mitad de la raíz. Este cemento se forma antes de que el diente alcance su plano oclusivo. Las fibras de Sharpey constituyen la mayor parte de la estructura del cemento acelular.³

El cemento celular se forma una vez que el diente llega al plano oclusivo, es más irregular y contiene células (cementocitos) en espacios individuales (lagunas) que se comunican entre sí. Este cemento es menos calcificado que el tipo acelular.³

El cemento celular tiene características parecidas al hueso y se puede formar más tarde sobre el cemento acelular, los cementocitos se encuentran en el interior de las lagunas. Las prolongaciones del cementocito se anastomosan entre sí.²

3.1.9. Proceso Alveolar

El proceso alveolar es la porción de maxilar y mandíbula que forma y sostiene los alvéolos dentarios. Se forma cuando el diente erupciona a fin de promover la inserción ósea para el ligamento periodontal. Desaparece de manera gradual una vez que se pierde el diente.³

El proceso alveolar consiste de una tabla externa de hueso cortical y laminillas óseas compactadas. Una pared interna del alveolo, constituida por hueso compacto delgado llamado hueso alveolar. Trabéculas esponjosas operan como hueso alveolar de soporte.³

En términos anatómicos, es posible dividir el hueso alveolar en zonas diferentes, sin embargo funciona como unidad con todas las partes interrelacionadas en el soporte de la dentición. La mayor parte de las porciones vestibulares y linguales de los alvéolos está constituida por



hueso compacto solo. El esponjoso rodea la cortical alveolar en las zonas apical, apicolingual e interradicular.³

Los elementos hísticos del hueso alveolar son idénticos a los componentes del hueso. La porción ósea del proceso alveolar cubre los alvéolos dentro de los cuales articulan las raíces dentales; a este hueso delgado y compacto lo traspasan numerosas y pequeñas aberturas por las cuales penetran vasos sanguíneos y linfáticos así como fibras nerviosas. El hueso alveolar se fusiona a la lámina cortical de la porción labial y lingual, en la cresta del proceso alveolar. El hueso alveolar posee las terminaciones adheridas de las fibras del tejido conectivo del ligamento periodontal (fibras de Sharpey) la porción reticular del proceso se localiza entre las láminas corticales y el hueso alveolar. Ésta continúa con la porción esponjosa, la cual abarca la mayor parte del tabique interdentario y una más pequeña de las placas labiales o linguales.²

3.2. Enfermedad Periodontal

La periodontitis es el tipo de enfermedad periodontal mas frecuente y resulta de la extensión del proceso inflamatorio iniciado en la encía hacia los tejidos periodontales de soporte.⁴ Una de las características clínicas más importantes de la enfermedad periodontal es un surco gingival profundizado por la inflamación, llamada también bolsa periodontal.³ La formación progresiva de bolsas conduce a la destrucción de los tejidos periodontales de soporte y a la movilidad y pérdida de los dientes.⁴



Fig. 11 Periodontitis crónica

www.tabaquismo.freehosting.net/Bocoral

3.2.1. Etiología

La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos o grupos de microorganismos específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con la formación de bolsas, recesión o ambas.³ La característica clínica que distingue a la periodontitis de la gingivitis es la pérdida ósea detectable.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad periodontal son producto de una compleja interacción entre el agente causal, en este caso las bacterias específicas de la placa dental, y los tejidos del huésped. La inflamación es la característica patológica central de la enfermedad periodontal y la placa bacteriana el factor causal que induce el mecanismo inflamatorio del huésped. El aumento de la acumulación de placa es consecuencia de una higiene bucal deficiente y se complica más por la presencia de factores locales como cálculo, restauraciones deficientes o dientes en malposición.³

Los factores del huésped también son decisivos en el mecanismo de reparación de los tejidos que interviene en el buen resultado del



tratamiento de afecciones periodontales. Los diabéticos y los fumadores son más propensos a la destrucción periodontal respecto a los individuos no diabéticos y no fumadores.³

La periodontitis crónica es la forma más frecuente de periodontitis, la cual es predominante en adultos. La periodontitis crónica se vincula con la acumulación de placa y cálculos. Los factores locales ejercen influencia sobre la acumulación de placa. Las enfermedades sistémicas como diabetes mellitus influyen sobre las defensas del huésped; los factores ambientales como el tabaco y el estrés también modifican la reacción del huésped a la acumulación de placa.

En la actualidad, la periodontitis como manifestación de enfermedad sistémica es un diagnóstico aplicable cuando la enfermedad general es el factor principal respecto a la predisposición, sin embargo, no son evidentes factores locales como grandes cantidades de placa y cálculo. En caso de que la destrucción periodontal sea el resultado claro de factores locales y se agrave por la aparición de afecciones como la diabetes mellitus, el diagnóstico debe ser el de periodontitis crónica modificada por una enfermedad sistémica.³

La periodontitis ya no se considera una enfermedad aislada. Ésta presenta tres formas: crónica, agresiva y como manifestación de enfermedades sistémicas.

La periodontitis es una enfermedad infecciosa relacionada con un grupo de bacterias; aunque estos patógenos son necesarios para causar periodontitis su simple presencia no es suficiente para ocasionar la enfermedad. Los microorganismos son la causa de la periodontitis, pero la expresión clínica de la enfermedad (extensión y gravedad) depende de como reacciona el huésped a la extensión y la virulencia de la carga



microbiana. La respuesta inflamatoria del cuerpo es un intento de protegerse de los patógenos, pero al mismo tiempo la inflamación puede generar destrucción del tejido conectivo periodontal y degeneración ósea cuando el cuerpo trata de deshacerse del diente infeccioso.³

Muchos son los trastornos sistémicos que señalan como indicadores de riesgo para alteraciones periodontales. Con toda claridad hay una causa bacteriana esencial y bacterias específicas relacionadas con la enfermedad periodontal, pero no solo estos, por su simple presencia causan la enfermedad, la respuesta del huésped varía entre los individuos, la reacción a los patógenos es muy importante, lo cual causa diferencias en la gravedad de la enfermedad entre una persona y otra.

Los trastornos endócrinos como la diabetes y las fluctuaciones hormonales presentan cuadros sistémicos que ejercen un efecto adverso sobre el periodonto. La influencia de los trastornos endócrinos y las fluctuaciones hormonales sobre el tejido periodontal es directa, modifican la respuesta de los tejidos a factores locales y producen cambios anatómicos en la encía que favorecen la acumulación de placa y el avance de la enfermedad.

La diabetes es un factor que incrementa la susceptibilidad de una persona a padecer periodontitis. La prevalencia y la gravedad de la periodontitis son bastante mayores en los diabéticos de tipo 1 y tipo 2 que en los no diabéticos.³²

La diabetes tipo 1 ocurre en la infancia o adolescencia, mientras la diabetes tipo 2 suele aparecer después de los 45 años de edad, alrededor de 9 de cada 10 diabéticos tienen diabetes tipo 2. Los efectos de la diabetes son similares entre individuos con diabetes tipo 1 y tipo 2, siempre que la duración de su enfermedad sea similar, pero, por lo general, los diabéticos de tipo 1 padecen diabetes a partir de edades más tempranas



que los de tipo 2 y, por lo tanto, pueden estar en riesgo de experimentar más periodontitis. Además de su duración, el control a largo plazo de la diabetes es un factor importante en la periodontitis, la prevalencia, la gravedad y la extensión de la periodontitis son mayores en los diabéticos mal controlados si se comparan con diabéticos con control bueno y moderado.³

3.2.2. Patogenia De La Enfermedad Periodontal

La lesión inicial en el desarrollo de la periodontitis es la inflamación de la encía como reacción a la agresión bacteriana.³ La bolsa periodontal, definida como un surco gingival profundizado de manera patológica, es uno de los rasgos clínicos más importantes de la enfermedad periodontal.

Los siguientes signos clínicos sugieren la presencia de enfermedad periodontal:

- Encía marginal agrandada de color rojo azulado con el borde "enrollado" que se separa de la superficie del diente.
- Ruptura de la continuidad vestibulo lingual de la encía interdental.
- Encía brillante decolorada e inflamada, en ocasiones superficies radiculares expuestas.
- Hemorragia gingival.
- Exudado purulento del margen gingival, o su aparición en respuesta a la presión digital en la cara lateral del margen gingival.
- Movilidad, extrusión o migración de los dientes, o desarrollo de diastemas en donde no existían.⁴

Características histopatológicas de la enfermedad periodontal.

- El cambio de color es consecuencia del estancamiento circulatorio; la flacidez se debe a la destrucción de las fibras gingivales y adyacentes;



La superficie brillante y lisa a consecuencia del edema y la atrofia del epitelio; el hundimiento a la presión corresponde al edema y la degeneración.

- Los cambios fibróticos predominan sobre el exudado y la degeneración, particularmente en la superficie externa de la pared de la bolsa; a pesar del aspecto externo sano, la pared interna de la bolsa presenta cierta degeneración y a menudo está ulcerada.
- La facilidad en el sangrado se debe a la mayor irrigación, el adelgazamiento y la degeneración del epitelio, así como a la proximidad de los vasos sanguíneos a la superficie interna
- El dolor a la estimulación táctil es efecto de la ulceración de la pared interna de la bolsa
- El exudado purulento aparece en las bolsas con inflamación supurativa de la pared interna.

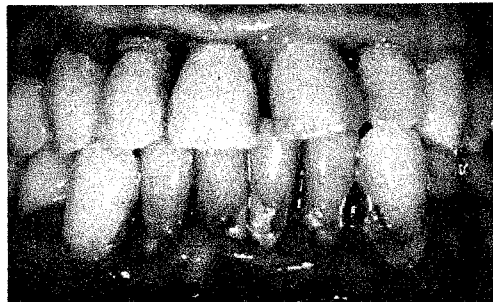


Fig.12 Signos clínicos de enfermedad periodontal.

www.uic.edu

Los microorganismos y sus productos causan las bolsas periodontales. La formación de bolsas comienza como un cambio inflamatorio en la pared de tejido conectivo del surco gingival y se produce por la placa bacteriana. El exudado inflamatorio líquido y celular causan la degeneración del tejido conectivo circundante incluyendo las fibras gingivales. Con la inflamación, el epitelio de unión prolifera a lo largo de la raíz por medio de proyecciones



con aspecto de dedo, cuyo espesor es de dos o tres células. La porción coronal del epitelio de unión se separa de la raíz conforme migra hacia la porción apical.⁴

Como resultado de la inflamación, la porción coronal de epitelio de unión está sujeta a la invasión aumentada de leucocitos polimorfonucleares que no está unidos entre sí, pero tampoco con el resto de células epiteliales por medio de desmosomas. Cuando el volumen relativo de leucocitos polimorfonucleares alcanza aproximadamente el 60% o más del epitelio de unión, este tejido se separa de la superficie del diente. Por lo que el surco del fondo migra hacia apical y el epitelio bucal del surco ocupan una porción del revestimiento del surco que aumenta en forma gradual.⁴

Con la inflamación continua, la encía aumenta en volumen y el borde del margen gingival se extiende hacia la corona. El epitelio de unión sigue migrando a lo largo de la raíz y se separa de ella. En el epitelio de la pared lateral de la bolsa prolifera flora bacteriana y eminencias bulbosas y en forma de cordón dentro del tejido conectivo inflamado. Los leucocitos y el edema del tejido conectivo inflamado se infiltran en el epitelio que recubre la bolsa y trae como resultado distintos grados de degeneración y necrosis.⁴

3.2.3. Clasificación De La Enfermedad Periodontal

Se han utilizado diferentes clasificaciones de las enfermedades periodontales a través de los años y se han reemplazado conforme los nuevos conocimientos mejoran nuestro entendimiento de las causas y los trastornos de las enfermedades del periodonto. La que se utiliza actualmente se basa en las características clínicas y radiográficas, así como en el estado de salud o enfermedad sistémica del paciente. Los tejidos periodontales pueden ser afectados también por otras



enfermedades sin relación con placa dentobacteriana y muchas de estas caen en la categoría degenerativa, éstas se consideran como manifestaciones orales de enfermedades sistémicas, que pueden tener su inicio en los tejidos gingivales, en las estructuras de soporte subyacente o en ambas. Las clasificaciones de una enfermedad son útiles para el diagnóstico, pronóstico y plan de tratamiento.

A finales de 1999 en la ciudad de Oak Brook, Illinois, la Academia Americana de Periodoncia AAP, realizó el taller sobre la clasificación de enfermedad periodontal, que fue publicado en los anales de periodoncia de diciembre de 1999, dándonos nuevos parámetros para unificar universalmente las diferentes entidades que se presentan en la enfermedad periodontal.

Dentro de esta nueva clasificación de la enfermedad periodontal, es mencionada en el primer grupo la causada por diabetes mellitus, dentro del apartado correspondiente a periodontitis causada por trastornos del sistema endócrino:

- I. Enfermedades Gingivales
 - A. Enfermedades gingivales inducidas por placa dental
 1. Gingivitis asociada con placa dental solamente
 - a. Sin otros factores locales contribuyentes
 - b. Con otros factores locales contribuyentes (ver VII A)
 2. Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos
 - a. Asociadas con el sistema endócrino
 - 1) Gingivitis asociada a la pubertad
 - 2) Gingivitis asociada al ciclo menstrual
 - 3) Gingivitis asociada al embarazo



- a) Gingivitis
- b) Granuloma piógeno

4) Diabetes mellitus asociada a gingivitis

- b. Asociadas con discracias sanguíneas
 - 1) Gingivitis asociada a la leucemia
 - 2) Otras

3.3. Diabetes Mellitus

Es un trastorno crónico del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, consiste en el déficit de la respuesta de la secreción de insulina con alteración en el uso de los carbohidratos (glucosa) y la consiguiente hiperglucemia.

La diabetes mellitus comprende un grupo heterogéneo de trastornos cuya característica común es la hiperglucemia. Las formas más frecuentes e importantes de diabetes mellitus se deben a trastornos primarios del sistema de señalización entre células de los islotes y la insulina. Estas formas se dividen en tipo 1 y tipo 2 que difieren en sus patrones de herencia, sus respuestas a la insulina y sus causas.

- La diabetes tipo 1 es también llamada diabetes mellitus insulino dependiente y antes conocida como diabetes juvenil, constituye alrededor del 10% de todos los casos de diabetes primaria.
- La diabetes tipo 2 la sufren del 80 al 90% de los afectados es llamada no insulino dependiente, antiguamente llamada diabetes del adulto.⁸



Las complicaciones a largo plazo constituyen las causas más importantes de morbilidad y mortalidad asociadas a la diabetes.

Una característica peculiar de la diabetes mellitus es la alteración de la tolerancia a la glucosa, fenómeno que puede ponerse de manifiesto mediante un estudio de sobrecarga, como la prueba de tolerancia oral a la glucosa.

La morbilidad asociada a la diabetes de larga evolución de cualquier tipo se debe a diversas complicaciones graves, principalmente microangiopatía, retinopatía, nefropatía y neuropatía. La mayoría de las pruebas experimentales y clínicas disponibles indican que las complicaciones son consecuencia de las alteraciones metabólicas principalmente de la hiperglucemia.

Es un trastorno metabólico complejo que se caracteriza por hiperglucemia crónica. La menor producción de insulina, el deterioro de la acción de la insulina, o una combinación de ambas cosas, impide el transporte de la glucosa desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos, lo que a su vez genera altos niveles de glucosa en sangre y excreción de azúcar en la orina. En la diabetes se altera también el metabolismo de lípidos y proteínas. La diabetes no controlada (hiperglucemia crónica) se presenta con varias complicaciones a largo plazo, incluso enfermedades microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía), alteraciones macrovasculares (cardiovasculares y cerebrovasculares), mayor propensión a infecciones y mala cicatrización de las heridas.

Las alteraciones más importantes son las relacionadas con las múltiples complicaciones generales tardías de la enfermedad



Diferencias Entre La Diabetes Mellitus Tipo 1 Y Tipo 2.⁸

	TIPO 1	TIPO 2
	DIABETES MELLITUS INSULINODEPENDIENTE	DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE
CLINICAS	Comienzo 20 años de edad Peso normal Descenso de la insulinemia Anticuerpos anticélulas de los islotes Cetoacidosis frecuente	Comienzo > 30 años Obesidad Insulinemia normal o alta No anticuerpos anticélulas de los islotes Cetoacidosis rara
GENÉTICAS	50 % de concordancia en gemelos	90-100 % de concordancia en gemelos
PATOGENIA	Autoinmunidad Mecanismos inmunopatológicos Grave déficit de insulina	Resistencia a la insulina
CÉLULAS DE LOS ISLOTES	Insulinitis precoz Gran atrofia y fibrosis Ausencia de células beta	No insulinitis Atrofia focal y depósitos de amiloide Leve carencia de células beta

3.3.1. Diabetes Mellitus Tipo 1

Esta forma de diabetes se debe a una carencia intensa y absoluta de insulina, causada por la reducción de células beta, suele desarrollarse durante la infancia y se hace evidente y grave durante la pubertad. Los pacientes dependen de la administración de insulina para su supervivencia, sin insulina estos pacientes desarrollan graves complicaciones metabólicas, como la cetoacidosis aguda y el coma diabético.



La destrucción de los islotes se debe a tres mecanismos relacionados entre sí: la susceptibilidad genética, la auto-inmunidad y la agresión ambiental.

Se denominaba antes diabetes mellitus insulino-dependiente, se debe a una respuesta inmunitaria mediada por células que destruye las células beta productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas cuyo resultado es la deficiencia de insulina. Es resultado de la falta de producción de insulina y es muy inestable y difícil de controlar. Tienen gran tendencia a la cetosis y al coma, no va precedida de obesidad y requiere insulina inyectable para controlarse. Los pacientes con diabetes mellitus tipo I se presentan con síntomas tradicionalmente relacionados con diabetes como polifagia, polidipsia, poliuria y predisposición a infecciones.³

3.3.2. Diabetes Mellitus Tipo 2

En el tipo 2, que surge en adultos, el cuerpo sí produce insulina, pero, o bien, no produce suficiente, o no puede aprovechar la que produce. La insulina no puede escoltar a la glucosa al interior de las células. El tipo II suele ocurrir principalmente en personas a partir de los cuarenta años de edad.

La patogenia de esta diabetes no es bien conocida hasta el día de hoy, no existen pruebas de que en ella intervenga algún mecanismo auto inmunitario, la obesidad desempeña un papel importante, los factores genéticos son más importantes en este tipo de diabetes.

Los defectos metabólicos que caracterizan a la diabetes tipo 2 son: una alteración en la secreción de insulina por las células beta y una disminución en la respuesta de los tejidos periféricos de la insulina.



Se denominaba anteriormente diabetes del adulto, también conocida como diabetes no insulino dependiente, es ocasionada por resistencia periférica a la acción de la insulina, deterioro de la secreción de insulina e incremento en la producción de glucosa en el hígado. Esta es la forma más común de diabetes. La respuesta autoinmunitaria mediada por células no destruye las células beta del páncreas productoras de insulina.

3.4. Páncreas

El páncreas, además de sus funciones digestivas, secreta dos hormonas esenciales: la insulina y el glucagón para la regulación del metabolismo de la glucosa, los lípidos y las proteínas.

El páncreas se compone de dos tipos de tejido:

- Los acinos, que secretan jugo digestivo al duodeno
- Los islotes de Langerhans que secretan insulina y glucagón de forma directa a la sangre

El páncreas humano cuenta con uno a dos millones de islotes de Langerhans cada uno de unos 0.3mm de diámetro, los islotes se organizan en torno a pequeños capilares, hacia los que vierten sus hormonas. Los islotes contienen tres tipos fundamentales de células:

- Alfa, componen casi un 25% del total de las células, secretan glucagón.
- Beta representan casi el 60% de la totalidad, se encuentran sobre todo en el centro de cada islote y secretan insulina y amilina.
- Delta, representan un 10% y secretan somatostatina.

Se diferencian entre sí por sus características morfológicas y de tinción.



En los adultos el páncreas mide 15cm de longitud y está formado por cabeza cuerpo y cola. Histológicamente, el páncreas tiene dos componentes las glándulas endócrinas y las exócrinas, la parte exócrina constituye el 85% del órgano y está formada por numerosas glándulas o acinos compuestas por células epiteliales cilíndricas o piramidales orientadas en sentido radial alrededor de la circunferencia de la glándula.

Las células acinares son fuertemente basófilas debido a la abundancia de retículo endoplásmico existente en la porción basal de sus citoplasmas, que además poseen un aparato de golgi supranuclear bien desarrollado, formando parte de un complejo secretor, orientado en sentido apical que fabrica abundantes gránulos de zimógeno unidos a la membrana y muy ricos en enzimas digestivas.

El páncreas secreta de 2 a 2.5 litros diarios de un líquido rico en bicarbonato que contiene enzimas y proenzimas digestivas la regulación de éstas depende tanto de la estimulación nerviosa, a través del vago, como de factores humorales, de los que los mas importantes son las hormonas secretina y colecistocinina, producidas en el duodeno. La secretina estimula la secreción de agua y bicarbonato en las células de los conductos, mientras que la colecistocinina favorece la descarga de enzimas digestivas por las células acinares. El estímulo mas importante para la producción de secretina en el duodeno es la carga de grasa que llega al mismo con el contenido gástrico y los ácidos grasos existentes en la luz. La mucosa duodenal secreta colecistocinina como respuesta a los ácidos grasos y a los productos de las enzimas digestivas: péptidos y aminoácidos.



Las enzimas digestivas son: tripsina, quimotripsina, aminopeptidasas, elastasas, amilasas, lipasas, fosfolipasas, y nucleasas. De ellas la más importante es la tripsina, pues cataliza la activación de las demás

3.4.1. Insulina

La homeostasis normal de la glucosa esta estrechamente regulada por tres procesos relacionados entre sí: la producción de glucosa en el hígado, la captación y utilización de la glucosa por los tejidos periféricos, y la secreción de insulina. El origen de la insulina se expresa en las células β de los islotes pancreáticos. La preproinsulina se sintetiza a partir del mRNA de la insulina en el retículo endoplásmico rugoso, desde donde se libera hacia el aparato de golgi, donde una serie de reacciones proteolíticas catalizadas por las convertasas de la pro hormona generan la insulina madura y un péptido procedente de la ruptura de la pro insulina, el péptido C.

El estímulo mas importante para la síntesis y liberación de la insulina es la glucosa. La elevación de los niveles sanguíneos de glucosa conlleva a la captación de estas por las células beta, captación facilitada por una proteína transportadora de la glucosa que es independiente de la insulina a la que se denomina GLUT-2. Este proceso pone en marcha una liberación inmediata de insulina probablemente la que existía almacenada en los gránulos de las células beta.

La insulina es una de las hormonas anabólicas más importantes. Es necesaria para:

- 1) El transporte de la glucosa y aminoácidos a través de las membranas celulares.



- 2) La formación de glucógeno en el hígado y en los músculos esqueléticos.
- 3) La conversión de la glucosa en triglicéridos.
- 4) La síntesis de ácidos nucleicos.
- 5) La síntesis de proteínas.

Su principal función metabólica consiste en aumentar la velocidad del transporte de la glucosa al interior de determinadas células del organismo. Estas células son las musculares estriadas, los fibroblastos y los adipocitos que en conjunto representan alrededor de dos tercios del peso corporal total. Junto a estos efectos metabólicos, la insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina inician la síntesis de ADN en determinadas células y estimulan su crecimiento y diferenciación.

La acción de la insulina en las células diana se ejerce en primer lugar, mediante la unión de la insulina a su receptor lo que hace que el número y función de estos sea importante para la regulación de la acción de la hormona.

El receptor de insulina esta formado por dos subunidades glucoproteínas α y β , de las que la subunidad β posee actividad de tirosina cinasa en la región situada en el citosol celular. La unión entre la insulina y el receptor desencadenan una cascada de respuestas intracelulares, como son la activación de ADN y de la síntesis de proteínas, la activación de las vías metabólicas anabólicas y la inhibición de las vías catabólicas.

Uno de los primeros efectos importantes en los tejidos efectores consiste en la traslocación de las proteínas de transporte de glucosa (GLUT) del aparato de Golgi a la membrana plasmática, lo que facilita la captación celular de glucosa.



La insulina se forma en los ribosomas primero en forma de proinsulina, la cual es trasladada al aparato de Golgi pasando por las cisternas del retículo endoplásmico. La proinsulina se separa en insulina y péptido C que se empaquetan en las vesículas de Golgi. Finalmente a la recepción de ciertas señales desencadenadas por un incremento de nivel de glucosa en sangre, el contenido de dichas vesículas se libera por exocitosis en la sangre, atravesando la membrana plasmática. El Ca^{2+} desempeña un papel importante en la liberación de insulina.

La concentración de insulina en la sangre y en los tejidos es muy pequeña, el páncreas humano normal contiene unos 10mg de insulina, pero la cantidad diaria secretada a la sangre es tan solo de 1 a 2mg. Cuando el nivel de glucosa en sangre se eleva significativamente por encima de su valor promedio de 80 o 90mg por 100ml, el contenido de las vesículas secretoras situadas más cerca de la membrana plasmática de células beta se vierte al torrente circulatorio. Entonces la concentración de glucosa desciende hasta su nivel normal. El promedio de vida de las moléculas de insulina en la sangre es de solo de 3 a 4 minutos, por lo tanto la liberación de insulina por el páncreas constituye una respuesta muy sensible a las fluctuaciones del nivel de la glucosa sanguínea. La liberación de insulina también es secretada por los niveles incrementados de ciertos aminoácidos, así como factores específicos secretados por el estómago y el intestino.

La insulina también posee un efecto inmediato de inducir la conversión de la forma inactiva de la glucogeno- sintetasa en su forma activa, además, la insulina inhibe la lipólisis. Como consecuencia en los tejidos periféricos se provoca una conversión intensificada de la glucosa sanguínea en glucosa y lípidos y un incremento en la oxidación de la glucosa a dióxido de carbono. La insulina impulsa la síntesis proteica a partir de aminoácidos, intensifica la inducción de glucoquinasa y de la fosfofructoquinasa y suprime la



formación de ciertas enzimas de la glucogénesis, tales como la piruvato-carboxilasa y la fructosa- difosfatasa. La insulina ejerce una acción generalizada sobre la membrana plasmática de sus células blanco, provocando cambios que favorecen la entrada no solo de glucosa, sino también de aminoácidos, lípidos y K^+ seguida de una acrecentada biosíntesis de productos plasmáticos y de almacenamiento.

3.5. Manifestaciones Bucales de la Diabetes

Las alteraciones bucales en la diabetes incluyen: queilosis, desecamiento y agrietamiento de las mucosas, ardor bucal y lingual, menor flujo salival y alteraciones de la flora bucal, con predominio de *Candida albicans*, *Streptococos hemolíticos* y *Estafilococos*. Estos cambios no siempre están presentes, no son específicos ni patognomónicos de la diabetes.⁴

Los efectos específicos de la diabetes sobre el periodonto son una tendencia al agrandamiento gingival, pólipos gingivales sésiles o pediculados, proliferaciones gingivales polipoides, formación de abscesos, periodontitis y movilidad dental. Lo más notable de la diabetes no controlada es quizá la reducción de los mecanismos de defensa y el aumento de la propensión a infecciones que conducen a enfermedad periodontal destructiva.³

La enfermedad periodontal en diabéticos no se presenta siempre de la misma forma ni con características particulares. Generalmente se observa inflamación gingival severa, bolsas periodontales profundas, pérdida ósea rápida y abscesos periodontales cuando hay higiene bucal deficiente. Los estudios realizados revelan una incidencia y una gravedad más altas de la enfermedad periodontal en personas con diabetes que sin ella, con factores locales similares. Existe una mayor pérdida de la inserción, incremento de la hemorragia al sondeo y mayor movilidad dentaria.



Estudios mas recientes señalan que la diabetes no controlada o mal controlada se relaciona con mayor susceptibilidad y gravedad de infecciones, entre ellas periodontitis. La diabetes no causa gingivitis o bolsas periodontales, pero se cuenta con indicios de que altera la respuesta de los tejidos periodontales a factores locales al acelerar la pérdida ósea y retrasar la cicatrización posoperatoria de los tejidos periodontales. Abscesos periodontales frecuentes son una característica importante de la enfermedad periodontal en diabéticos.³

La diabetes mellitus es una enfermedad en extremo importante desde el punto de vista periodontal.³

Existe una relación directa entre la diabetes mellitus y las enfermedades dentales. Los signos y síntomas orales de la diabetes pueden variar desde un grado mínimo hasta un grado grave e incluyen un espectro completo de alteraciones orales. Los signos y síntomas clínicos pueden estar relacionados con cambios salivales y dentales, alteraciones periodontales y de la mucosa, infecciones oportunistas, aliento cetónico o diabético y alteración de la cicatrización de las heridas.⁵

Una alteración frecuente del paciente con diabetes no controlada es la xerostomía, la deshidratación de los tejidos orales, y la neuropatía pueden contribuir a los síntomas de dolor bucal generalizado, alteración del gusto y sensación de quemazón, las cuales pueden ser causadas por la alteración de la flora oral⁷. Los pacientes diabéticos pueden presentar inflamación bilateral asintomática de las glándulas parótidas con aumento de la viscosidad producida por incremento del depósito de los ácidos grasos e hipertrofia compensatoria resultante de la disminución de la producción de saliva. De forma secundaria a la xerostomía, puede observarse un aumento en la actividad de caries, sobre todo en la región cervical. La respuesta gingival de los pacientes con diabetes no controlada a la



acumulación de placa suele ser acentuada, produciendo una encía hiperplásica y eritematosa. Otros hallazgos gingivales que se observan con frecuencia son los abscesos gingivales fulminantes agudos y las proliferaciones granulares subgingivales. Los hallazgos radiológicos incluyen ensanchamiento del ligamento periodontal y excesiva pérdida del hueso alveolar, produciendo una extrema movilidad dentaria y una pérdida precoz de los dientes.⁶ La encía del paciente diabético revela una disminución de la respuesta vascular a la irritación, dificultad de la respuesta de las células inflamatorias y engrosamiento de la lamina basal de los microvasos gingivales, que pueden limitar la permeabilidad de estos vasos.

La flora subgingival está compuesta fundamentalmente por *Capnocytophaga* y otros microorganismos gram-negativos que incluyen: *Fusobacterium* y *Campilobacter*, y ocasionalmente, *Actinomyces actinomycetecomitans*. En la gingivitis que se vincula con la diabetes los microorganismos preponderantes incluyen: *Actinomyces* (33%), *Streptococcus* (36%), *Veillonela parvula* (12%), y *Fusobacterium* (10%).

Al igual que en otras formas agresivas de enfermedad periodontal, la diabetes muestra a menudo un defecto en la quimiotaxis leucocitaria, se estima que esta deficiencia contribuye de manera directa a la patogenia de la enfermedad.

Existen diversos cambios periodontales en los pacientes diabéticos como una tendencia hacia la formación de abscesos, encía expandida, pólipos gingivales, proliferaciones polipoides de la encía y dientes móviles.

La enfermedad periodontal en los diabéticos no sigue un patrón uniforme, la inflamación gingival muy marcada, las bolsas periodontales profundas, pérdida ósea rápida y abscesos periodontales frecuentes ocurren a



menudo en pacientes diabéticos con higiene bucal precaria. La diabetes no causa gingivitis o periodontitis, pero existen indicadores de que altera la reacción de los tejidos periodontales ante los irritantes locales, acelerando la pérdida de hueso y retardando la cicatrización posquirúrgica de los tejidos del periodonto. Los abscesos periodontales suelen ser frecuentemente un rasgo importante de la enfermedad periodontal en los diabéticos.³

Los cambios microscópicos que se presentan en el tejido gingival comprenden un engrosamiento de la membrana basal y el estrechamiento de la luz de los capilares y las arterias precapilares, este cambio en las paredes vasculares puede obstaculizar el transporte de nutrientes necesarios para la conservación de los tejido gingivales.³

La comparación de los valores salivales y sanguíneos de la glucosa con el estado periodontal de diabéticos señala que las concentraciones de glucosa en saliva son mayores en pacientes diabéticos. El contenido de glucosa en el líquido gingival y la sangre es mayor en los diabéticos que en los pacientes no diabéticos con un índice gingival de placa similar. La mayor concentración de glucosa en el líquido gingival y la sangre de los diabéticos podrían cambiar el ambiente de la microflora, provocando cambios cualitativos en las bacterias que podrían afectar los cambios periodontales. El líquido gingival en pacientes diabéticos contiene un valor reducido de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) en contraste con el de los no diabéticos. Dado que el cAMP reduce la inflamación este es otro mecanismo probable que podría inducir a la mayor gravedad de la inflamación gingival en los diabéticos.³



3.6. Invasión Bacteriana.

La invasión bacteriana de las áreas apical y lateral de la pared de la bolsa ocurre en la periodontitis crónica de los seres humanos. Al principio las bacterias invaden el espacio intercelular bajo las células epiteliales que se exfolian, pero también se encuentran entre las células epiteliales profundas y se acumulan en la lámina basal, algunas bacterias la traspasan e invaden el tejido conectivo subepitelial. También existe la presencia de bacterias dentro del epitelio bucal y tejido conectivo adyacente de las bolsas periodontales profundas. Esto ocurre en las áreas inflamadas no queratinizadas de la encía.

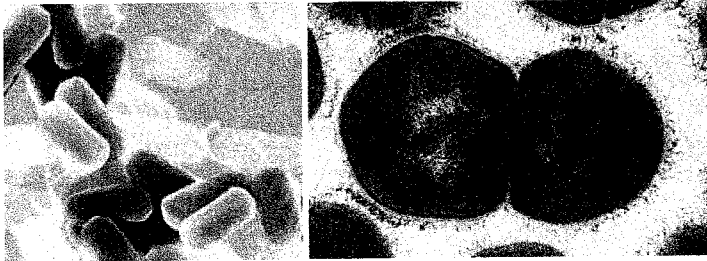


Fig.13 Bacterias bacilos *sp* y *Streptococcus sp*.

www.kepler.uag.mx/.../ciencias

3.6.1. Bacterias Gram positivas y Gram negativas

Una característica importante de las bacterias es su respuesta a la tinción de Gram. Las bacterias se clasifican como gram positivas o gram negativas según su respuesta a la técnica de tinción de Gram. Este procedimiento, denominado así por el histólogo Christian Gram, consiste en teñir la células con cristal violeta y yodo, luego se lavan con acetona y alcohol, en la última etapa se decoloran las bacterias gram negativas, pero no a las bacterias gram positivas. Esta característica parece ser fundamental, pues la



reacción a la tinción se correlaciona con muchas otras propiedades morfológicas en maneras relacionadas filogenéticamente.

El procedimiento para la tinción de Gram se inicia con la aplicación de un colorante básico, el cristal violeta. Luego se aplica una solución de Yodo; en este momento todas las bacterias se tiñen de azul. A continuación las bacterias se tratan con alcohol. Las células gram positivas retienen el complejo cristal violeta-yodo y permanecen de color azul; en cambio las gram-negativas se decoloran completamente por el alcohol. Finalmente se aplica un colorante de contraste (como la safranina que es un colorante rojo) de esta manera las células gram negativas, previamente decoloradas, toman el colorante de contraste y las células gram-positivas ahora aparecen púrpuras.

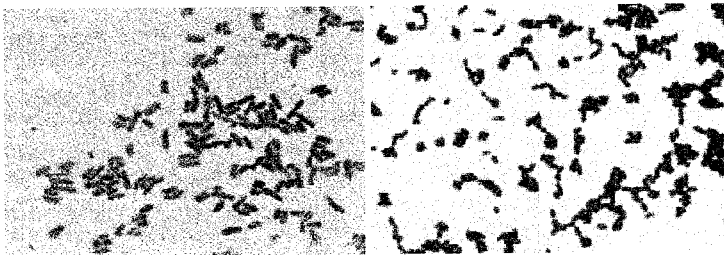


Fig.14 Tinción de gram negativo (izquierda) y positivo (derecha)

www.meddean.luc.edu/.../med34/gram/tech.htm

La diferencia entre las bacterias gram positivas y las gram negativas reside en la pared celular.



3.6.2. Envoltura Celular

Las capas que rodean a la célula procariota se conoce como envoltura celular. La estructura y organización de esta difiere en las bacterias gram positivas y las gram negativas, de hecho esta es la diferencia la que define a estos dos grandes grupos de especies bacterianas.

3.6.2.1. Envoltura Celular Gram-positivo

La envoltura celular de las bacterias gram positivas es relativamente simple: esta constituida por dos a tres membranas: la membrana citoplasmática, una capa de petidoglicano gruesa y en algunas bacterias una capa externa llamada capsula.

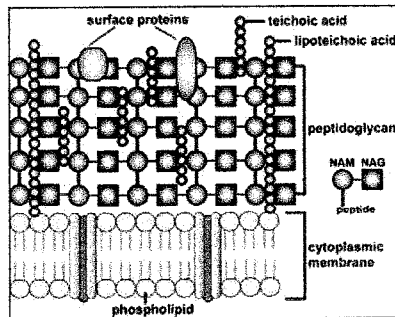


Fig. 15 Envoltura celular gram positivo
faculty.ircc.edu/.../micro%20resources.htm

La membrana citoplasmática de las bacterias también es conocida como membrana celular. Esta membrana se compone de fosfolípidos y proteínas. Invaginaciones contorneadas de la membrana citoplasmáticas forman estructuras especializadas denominadas mesosomas. Hay dos tipos:



mesosomas de tabique; los cuales funcionan en la formación de paredes transversas durante la división celular, y mesosomas laterales.

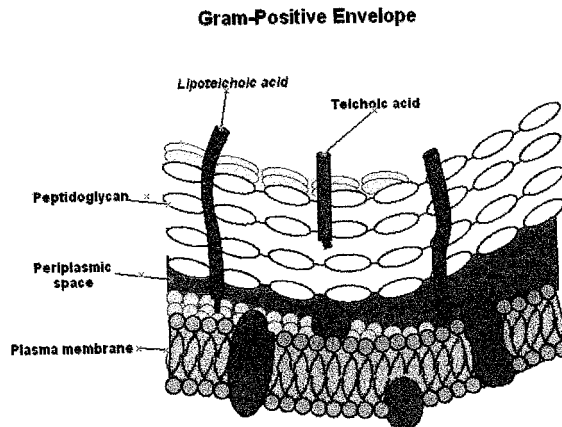


Fig.16 Envoltura celular gram positivo
www.conceptdraw.com/en/sampletour/medical/

3.6.3. Función De La Membrana Citoplasmática

Las principales funciones son:

1. Permeabilidad selectiva y transporte de solutos;
2. Transporte de electrones y fosforilación oxidativa;
3. Excreción de exoenzimas hidrolíticas;
4. Portar a las enzimas y a las moléculas transportadoras que intervienen en la biosíntesis de DNA, polímeros de la pared celular y lípidos de membrana;
5. Porta a los receptores de membrana y otras proteínas de los sistemas quimiotácticos y otros de transducción sensorial.



3.6.3.1. Permeabilidad y transporte.

La membrana es tanto una barrera permeable como un anillo de la permeabilidad: los sistemas específicos de proteínas presentes (permeasas) facilitan la difusión pasiva de solutos específicos y a la vez catalizan el transporte activo dependiente de energía en oposición de un gradiente de concentración.

3.6.3.2. Transporte De Electrones Y Fosforilación Oxidativa

Los citocromos y otras enzimas y componentes de la cadena respiratoria, se encuentran en la membrana citoplasmática. La membrana citoplasmática bacteriana constituye por lo tanto un análogo funcional de la membrana mitocondrial interna.

3.6.3.3. Excreción de Exoenzimas Hidrolíticas.

Todos los microorganismos que dependen de los polímeros orgánicos macromoleculares como fuente de nutrientes, por ejemplo, proteínas, polisacáridos, lípidos; excretan enzimas hidrolíticas que degradan a los polímeros en subunidades lo suficientemente pequeñas como para penetrar la membrana citoplasmática; las bacterias lo liberan directamente hacia el medio exterior.

3.6.3.4. Funciones Biosintéticas

La membrana citoplasmática es el sitio de los lípidos portadores sobre el cual se ensamblan las subunidades de la pared celular, al igual que el sitio de depósito de las enzimas de la biosíntesis de la pared celular. Las enzimas de la síntesis fosfolípida también se localizan en la membrana citoplasmática. Algunas proteínas del complejo replicante del DNA se



encuentran presentes en los sitios discretos en la membrana, en los mesosomas del tabique a los cuales se fija el DNA.

3.6.3.5. Sistemas Quimiotácticos

Son sistemas de atracción y repulsión que se unen a los receptores específicos en la membrana de la bacteria. Existen por lo menos veinte diferentes quimiorreceptores de membrana, algunos de los cuales también funcionan como primer paso en el proceso de transporte.

3.6.3.6. Pared Celular

Las capas de la envoltura celular que se ubican entre la membrana citoplasmática y la capsula se conocen como pared celular. En las bacterias gram positivas la pared celular esta constituida principalmente por peptidoglicanos y acido teicoico. La pared celular bacteriana debe su resistencia a una envoltura compuesta por una sustancia denominada: mureína, mucopéptido o peptidoglicano.

Además de la protección osmótica que proporciona, la pared celular desempeña una función esencial en la división celular funcionando como un primordio para su propia biosíntesis.

3.6.3.7. Componentes Esenciales de las Paredes Celulares Grampositivas

La mayor parte de las paredes celulares de las bacterias grampositivas contienen considerables cantidades de acido teicoico y teicurónico, los cuales forman hasta 50% del peso seco de la pared y 10%



del peso seco de la célula en su totalidad, algunas paredes celulares de grampositivos pueden contener moléculas de polisacáridos.

3.6.4. Ácido teicoico y teicurónico

Son polímeros hidrosolubles que contiene ribitol o residuos de glicerol unidos por medio de enlaces fosfodiéster y que tienen uno o más aminoácidos o sustitutos de azúcar. Hay dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido de pared unido de manera covalente al peptidoglicano, y el ácido teicoico de la membrana (ácido lipoteicoico) unido por covalencia al glucolípido de la membrana y concentrado en los mesosomas. Algunas especies grampositivas carecen de ácidos teicoicos de pared, pero al parecer todas las especies contienen ácidos teicoicos de la membrana

3.6.4.1. Polisacáridos

La hidrólisis de las paredes de las bacterias grampositivas ha proporcionado, en ciertas especies, azúcares neutros tales como manosa, arabinosa, galactosa, ramnosa, y glucosamina y azúcares ácidos como el glucurónico y el amurónico. Se ha propuesto que estos azúcares existen como subunidades de polisacáridos en la pared celular.

3.6.5. *Streptococcus Sanguis*

Son bacterias esféricas gram positivas que forman de modo característico pares o cadenas durante el crecimiento. Pertenecen al grupo de los *Streptococcus viridians*. En general son alfa hemolíticos. La optoquina no inhibe su crecimiento y las colonias no son solubles en bilis. Los *Streptococcus viridians* son los miembros más abundantes en la flora normal de vías respiratorias superiores y tienen importancia en la



conservación de la salud de las mucosas de esta área. Pueden alcanzar la circulación sanguínea como consecuencia de un traumatismo y constituyen una causa importante de endocarditis en válvulas cardiacas anormales.

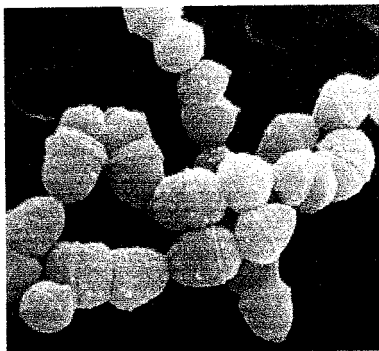


Fig.17 Streptococcus
www.kepler.uag.mx/.../ciencias

3.7 Acido Lipoteicoico (LTA)

El Ácido lipoteicoico (LTA) es un componente único de la pared celular de las bacterias gram-positivas, pertenece a la clase de polímeros de azúcar fosfato que contiene grupos acilo anclados a la membrana celular. Una forma no acetilada del LTA es el ácido teicoico, que está unido covalentemente al peptidoglucano de la pared celular de las bacterias gram-positivas. Desde 1993, el LTA se extrae con fenol y cromatografía de interacción hidrofóbica. Con LTA purificado se demostró que activa a las células inmunes las cuales sintetizan citocinas, en estudios *in vitro* se demostró la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF α en monocitos.¹⁶

La sepsis bacteriana y el shock séptico resultan de la sobreproducción de mediadores de la inflamación como una consecuencia de la interacción del sistema inmune con las bacterias y los constituyentes de las paredes bacterianas en el cuerpo. Los constituyentes de las paredes bacterianas



como los lipopolisacáridos, peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos son particularmente responsables de los efectos aniquiladores de las bacterias. Esos componentes interactúan en el cuerpo con un gran número de proteínas y receptores, y estas interacciones determinan los eventuales efectos inflamatorios de los compuestos. Dentro de la circulación los componentes bacterianos interactúan con proteínas como lipoproteínas del plasma y lipopolisacáridos. La interacción con los constituyentes bacterianos con los receptores de superficie de células mononucleares son principalmente responsables de la inducción de los mediadores proinflamatorios por las bacterias. El papel de los receptores individuales como los receptores de membrana y CD14 en la inducción de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión aun es discutido. Las terapias para el tratamiento de sepsis bacteriana y shock séptico son discutidas en relación con la acción de los receptores y citocinas mencionados.⁴²

Streptococcus pneumoniae es una causa importante de sepsis por bacterias gram positivas, y el ácido lipoteicoico (LTA) podría ser causa importante de shock séptico por bacterias gram positivas. El LTA tiene la habilidad para estimular los monocitos humanos.⁴⁷

El papel del ácido lipoteicoico de las bacterias gram positivas como molécula inmuno estimuladora fue controversial por varios años, con métodos de preparación inadecuados, así como también heterogéneos y endotoxinas contaminadas, las preparaciones comerciales conducían hacia resultados contradictorios. Un análogo sintético de LTA de *Staphylococcus aureus* ha comprobado la relación de función/ estructura. El papel principal de esteres de D- alanina para la respuesta inmune de LTA fue confirmado por derivados sintéticos. El glucolípido ancla de LTA juega un papel esencial análogo para el lípido A de lipopolisacáridos.⁴³

Los ácidos lipoteicoicos (LTA) han sido presentados como la parte inmuno estimuladora de las bacterias gram positivas homólogo a los



lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas. Sin embargo el LTA de *Staphylococcus aureus* el patógeno gram positivo clínicamente más nocivo, fue inactivo después de su purificación. El LTA representa el componente inmuno estimulador más importante de bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus*.⁴⁴ En contraste con los lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas, el LTA requiere de un receptor de membrana TLR2 y no TLR4 para la inducción de citocinas en monocitos y macrófagos.⁴⁴

Las complicaciones de amenaza de vida por sepsis en humanos son debidas a infecciones adquiridas por bacterias gram positivas y gram negativas. El LTA de las bacterias gram positivas induce la activación de CD14 y la transcripción del factor NF κ B en células huésped como los macrófagos.⁴⁶ LTA proveniente de *Streptococcus* del grupo B y *Stafilococcus aureus* interactúan con TLR2 y TLR6.⁴⁵

El LTA provoca una liberación dramática de citocinas, con una aparición temprana de TNF- alfa e IL -1 beta y una liberación retardada de IL-8, es un potente activador de los neutrófilos humanos con generación de citocinas.⁴⁸

El ácido lipoteicoico es el componente mayor de la membrana de las células bacterianas gram positivas. Aunque el LTA ha sido cada vez más reconocido como un inmuno modulador su efecto en los neutrófilos polimorfonucleares aun no es claro. La interacción entre el ácido lipoteicoico y los neutrófilos polimorfonucleares es de particular importancia, los neutrófilos son los primeros leucocitos que migran al sitio de la infección y encuentran a los patógenos bacterianos. El LTA tiene un efecto evidente sobre las funciones de los neutrófilos. El LTA induce la liberación de citocinas proinflamatorias tales como IL-8 factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Los efectos del LTA en neutrófilos están asociados a



la activación de NFκB. El LTA inhibe la apoptosis espontánea de los neutrófilos y por lo tanto, incrementan su periodo de vida. El LTA componente de las bacterias gram positivas, activa directamente los gránulos de los neutrófilos, que son las células efectoras primarias en la primera línea de defensa contra las infecciones.⁴⁹

3.8.. Señales Celulares Y Vías De Transducción

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

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

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



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

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

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

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

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

3.8.1. Vías de Transducción.

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



Se conocen diferentes vías de transducción en donde intervienen distintos segundos mensajeros como pueden ser la fosforilación de proteínas a través de AMP o GMPc o la de fosfolípidos y calcio, en este caso nos interesa la vía de las MAP cinasas.

3.8.2. Vía MAP Cinasa (Proteínas activadas por mitógeno)

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

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

En levaduras, esta vía controla la expresión de una gran variedad de factores de crecimiento así como otras respuestas celulares, como su reproducción, forma y esporulación. En los mamíferos regula el crecimiento celular y la diferenciación por este motivo se le denominó proteínas cinasas activadas por mitógeno.⁴



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

Existen tres grupos mayores de MAP cinasas en células de mamíferos: la proteína cinasa regulada extracelularmente (ERK), la MAP cinasas p38 y la cinasa terminal c-Jun NH₂ (JNK). Estas MAP cinasas son activadas por fosforilación dual en el tripéptido Thr-Xaa-Tyr. La secuencia de este tripéptido es diferente para cada grupo de MAP cinasas: para ERK (Thr-Glu-Tyr); para p38 (Thr-Gly-Tyr) y JNK (Thr-Pro-Tyr). La fosforilación en residuos de treonina (Thr) y tirosina (Tyr) es mediada por una cascada de proteínas cinasas.

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

3.8.3. ERK (Proteína cinasa de regulación extracelular)

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



3.8.4. JNK (Cinasa amino-terminal reguladora del factor de transcripción c-Jun)

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

En mamíferos se han identificado tres tipos específicos de la cinasa JNK: JNK1, JNK2 y JNK3. ⁴

3.8.5. p38

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

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



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

3.8.6. AKT

La vía de señalización de AKT es crucial para diversos aspectos del desarrollo celular, supervivencia y apoptosis.³⁴ La vía de señalización PI3K/AKT es importante para diversas funciones fisiológicas celulares, la activación de la cinasa AKT juega un papel central en funciones celulares fundamentales tales como la proliferación y supervivencia celular a través de la fosforilación de una variedad de sustratos.³⁵



4. Planteamiento Del Problema

Uno de los principales problemas de salud bucal en la población mexicana es sin duda la enfermedad periodontal. La enfermedad periodontal posee gran número de factores que la predisponen para su desarrollo, sin embargo, la etiología de mayor importancia para la enfermedad, es la presencia de bacterias en la cavidad bucal. Las enfermedades periodontales, también conocidas como enfermedades gingivales, son infecciones bacterianas graves que destruyen las encías y los tejidos adyacentes de la cavidad bucal; estas enfermedades periodontales afectan al hueso alveolar que rodea al diente, las encías, las capas que cubren las raíces de los dientes y el ligamento periodontal.

Cuando existe una deficiencia en los hábitos de higiene bucal, es inevitable la formación de placa dentobacteriana, en esta biopelícula existe una inmensa cantidad de grupos bacterianos que se organizan entre sí, inevitablemente la organización de estas bacterias y el elevado número de ellas causarán enfermedad. Para que los microorganismos produzcan enfermedad es necesario que posea factores que le permitan adherirse a la célula, generar algún tipo de metabolito que dañe al hospedero, ejercer acción tóxica, penetrar en las células, diseminarse a través de los tejidos o evitar la actividad defensiva de los fagocitos, o la desarrollada por los anticuerpos naturales o adquiridos, ya sea en forma activa o pasiva. Dentro de estos grupos bacterianos se encuentran las bacterias gram positivas, una de sus características más importantes es poseer una pared celular y en ésta pared se encuentra un componente de virulencia llamado ácido lipoteicoico, el cual es uno de los principales responsables en provocar la respuesta inflamatoria. El ácido lipoteicoico, cuya fracción lipídica constituye la endotoxina, productos metabólicos o enzimas que al ejercer su acción sobre el sustrato producen metabolitos intermedios o terminales con acción letal sobre las células y tejidos.



La diabetes mellitus también se encuentra dentro de los principales problemas de salud que afecta a la población mexicana. Es un síndrome que se define por un grupo diverso de trastornos metabólicos y cuya característica principal es la hiperglucemia. Lo más notable de la diabetes no controlada es quizá la reducción de los mecanismos de defensa y el aumento de la propensión a infecciones que, entre otras, conducen a enfermedad periodontal destructiva.

La respuesta inflamatoria es uno de los principales mecanismos de defensa ante cualquier infección, pero estos elementos nos hacen especular que el proceso de inflamación en pacientes diabéticos está alterado, el principal grupo celular de los tejidos de la encía es el fibroblasto gingival, los estudios realizados con anterioridad muestran que esta endotoxina; el ácido lipoteicoico (LTA); estimula los mecanismos de defensa del huésped, específicamente en lo que concierne a la respuesta inflamatoria del huésped.

En el presente trabajo se estudiarán los estímulos que inducen a los mecanismos inflamatorios intracelulares provocados por el ácido lipoteicoico, si existe o no activación de vías de transducción en la población celular de fibroblastos gingivales; que se ven afectados por el proceso de inflamación en pacientes diabéticos. Específicamente ocuparnos de la activación por medio del LTA de todas las proteínas pertenecientes a la familia de MAP cinasas: JNK, ERK y p38 y de la fosforilación de AKT.



5. Justificación Del Estudio

Al observar la fosforilación en diferentes tiempos y dosis de AKT y de las cinasas JNK, ERK y p38, en fibroblastos gingivales humanos provenientes de pacientes diabéticos, estaremos observando una de las vías en la cual se codifica información para la célula donde se formaran citocinas, óxido nítrico y la apoptosis, que consecuentemente desencadenan los signos clínicos de la inflamación del tejido periodontal, así será posible que en un futuro se logre la creación de nuevos fármacos que permitan inhibir la acción de los estímulos por medio del bloqueo de la vía de las MAP-cinasas y con ello mediar la respuesta de supervivencia celular.

Con la descripción de lo anterior se pretenderá bloquear éstos efectos con inhibidores específicos para ERK1/2, p38 y JNK. De esta manera y con el conocimiento de la importancia que representan nuevos tratamientos para la enfermedad periodontal, específicamente en pacientes diabéticos, se pretende disminuir los efectos inflamatorios adversos que ocasiona en los fibroblastos gingivales humanos, de tal manera que la regulación de esta situación no conduzca a la célula hacia una apoptosis y nos proporcione alternativas para continuar con su aplicación clínica en odontología.



6. Hipótesis

6.1 Hipótesis Verdadera

Si el ácido lipoteicoico activa la transducción de señales en fibroblastos gingivales humanos provenientes de pacientes diabéticos, entonces provocará la fosforilación de proteínas y la consecuente activación de la respuesta inflamatoria.

6.2 Hipótesis Falsa

Si el ácido lipoteicoico no activa transducción de señales en fibroblastos gingivales humanos provenientes de pacientes diabéticos, entonces no provocará la fosforilación de proteínas ni la consecuente activación de la respuesta inflamatoria.



7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Caracterizar la fosforilación de proteínas pertenecientes a la familia de MAP cinasas en fibroblastos gingivales humanos de pacientes diabéticos por ácido lipoteicoico en distintas dosis y a diferentes tiempos.

7.2 Objetivo Específico

Determinar el efecto del LTA sobre la activación de las MAP cinasas (ERK, p38 y JNK) y AKT en fibroblastos gingivales humanos de pacientes diabéticos.

8. Tipo De Estudio

Los tipos de estudio que se han utilizado para el desarrollo de esta investigación fueron de tipo experimental, comparativo y prospectivo.



9. Materiales

9.1 Equipo

	(Marca)
Agitador magnético	(Nuova)
Balanza GA 200	(Ohaus)
Baño de agitación	(PrecisionScientific)
Baño seco	(Fisher)
Cajas de cultivo de 6 pozos	(Costar)
Cámara de electroforesis vertical	(Hoefer)
Cámara de transferencia semiseca	(GIBCO-Life Technologies)
Campana de flujo laminar	(Nuaire)
Celdas de cuarzo	
Centrífuga	(Sorvall)
Digi-Doc	
Espectrofotómetro	(Perkin Elmer)
Gendarme	(Costar)
Gradillas	(Nalgene)
Incubadora	(Nuaire)
Negatoscopio	
Microscopio de objetivos invertidos C22	(Olympus)
Orbit Shaker	(Labline)
Pipetas de 10 y 5 ml	(Finnipipette)
Potenciómetro	(Equipar)
Probetas graduadas	
Propipeta	(Pepet-aid)
Sonicador	(Lab-Line instrumets)
Timer	
Tubos clínicos 25 y 50 ml	(COSTAR)
Tubos de ensayo	



Tubos Eppendorf
Vasos de precipitados
Vortex

9.2 Reactivos

- Acrilamida (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
- Antibiótico-Antimicótico 1%
penicilina G sódica,
estreptomina anfotericina B (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA).
- Anticuerpos: anti-mouse
monoclonal pERK1/2 (sc-7383 Santa Cruz Biotechnology, Ca.USA)
- anti-rabbit polyclonal ERK (sc-9350 Santa Cruz Biotechnology, Ca.USA)
- anti-mouse monoclonal pp-38 (sc-7973 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)
- anti- rabbit polyclonal p38 (sc-7149 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)
- anti-mouse monoclonal pJNK (sc-2398 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)
- anti-mouse monoclonal JNK (sc-2345 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)
- anti-mouse monoclonal (sc-2980 Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)
- anti-rabbit polyclonal (sc2572- Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)
- anti-goat polyclonal (sc5678- Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)
- Azul de bromofenol (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
- Cloruro de sodio (DIFCO)



-Dodecil sulfato de sodio	(J.T.BAKER.NJ.USA)
-EDTA	(J.T.BAKER. NJ.USA)
-Glicina	(J.T.BAKER. NJ. USA)
-Glicerol	(J.T.BAKER. NJ. USA)
-Kit de Quimioluminiscencia	(Santa Cruz Biotechnology. Ca. USA)
-Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco	(INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)
-Solución de Hanks	(INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA)
-Membrana de nitrocelulosa	(Bio-rad Laboratorios, Inc. Ca. USA.)
-Ortovanadato de sodio	(SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)
-Suero bovino fetal	(INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA)
-Trisma	(SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)
-Tripsina	(SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)
-Triton 100X	(J.T. BAKER. NJ. USA)
-Tween	(SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA)



10. Métodos.

10.1 Cultivo De Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH).

Los FGH se obtuvieron a partir de muestras de tejido de encía de pacientes diabéticos, que acudieron a las clínicas de la Facultad de Odontología. El tejido se colocó en solución de Hanks, se procesó la muestra para la obtener las células y se colocó en medio de Eagle Modificado por Dulbecco adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal y 1% de antibiótico antimicótico y se incubaron bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C.

10.2 Detección de la fosforilación de las fosfoproteínas

Después de la fosforilación de las proteínas cinasas AKT, ERK 1/2, p38, JNK, la detección se llevó a cabo por medio de ensayos de Western Blot.

Para caracterizar la fosforilación de ERK 1/2, p38 y JNK, así como la expresión de AKT por ácido lipoteicoico se realizaron experimentos tipo dosis respuesta y curso temporal. Se sembraron los fibroblastos gingivales humanos en cajas de 6 pozos hasta la semiconfluencia.

Se dejaron 1 hora en ayuno con DMEM libre de suero bovino fetal con 1% de antibiótico-antimicótico. Posteriormente se trataron con Peróxido de hidrógeno en DMEM adicionado con 2% de SBF según se indicaba en el protocolo para cada ensayo. Posterior a la incubación con peróxido de hidrógeno se colocó buffer de fosfato salino (NaCl; KCl; Na₂HPO₄ 7H₂O; KH₂PO₄) adicionado con 1mM de ortovanadato de sodio y se obtuvieron las células mediante raspado con gendarme. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm a 4°C y se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl 20mM, Tritón 1%, NaCl 137mM, EDTA 2mM, Vanadato de sodio



1mM, Glicina 10%). Posteriormente se sonicaron a 30w por 30 segundos. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Las muestras se desnaturalizaron y se sometieron a tratamiento térmico. Se realizó la electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% a 60 V. La proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la posterior incubación del anticuerpo específico de la fosfoproteína AKT, ERK 1/2, p38 y JNK, según lo indicaba el protocolo de cada ensayo. Después de la incubación con anticuerpos se procedió a realizar el procedimiento de revelado mediante el Kit de quimioluminiscencia.



11. Resultados

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

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

La relación entre la enfermedad periodontal y la diabetes está muy documentada. Diversos estudios han mostrado que la enfermedad periodontal se encuentra mayormente en diabéticos que en personas no diabéticas.⁵⁰⁻⁵⁴ Lo anterior quizás se deba al hecho de que los diabéticos son más susceptibles a contraer infecciones.

Los investigadores están descubriendo ahora que la enfermedad periodontal puede predisponer o exacerbar la diabetes. En un estudio prolongado de la diabetes y la enfermedad periodontal se demostró que la periodontitis severa puede representar un importante factor de riesgo para la progresión de la diabetes, por lo que los médicos deben considerar la condición periodontal de los pacientes diabéticos con dificultades en el control glicémico.⁵⁰⁻⁵⁴

Otro evento que se exagera en la diabetes es el cúmulo de la placa dentobacteriana y de manera importante la placa subgingival en la que predominan microorganismos Gram-negativos que entre sus componentes se encuentran los lipopolisacáridos y el ácido lipoteicoico presente en las bacterias Gram-positivo. Diversas investigaciones señalan que tanto los LPS como el ácido lipoteicoico activan e inducen señales de transducción y síntesis de COX-2, óxido nítrico, interleucinas. Todas estas moléculas



están involucradas en promover procesos de inflamación que de forma inicial actúan como un mecanismo de defensa del huésped pero cuando este evento se produce de manera permanente promueve procesos como la inflamación crónica y por tanto conlleva al desarrollo de enfermedad periodontal. Nosotros hemos caracterizado el efecto de las endotoxinas en muestras provenientes de pacientes diabéticos y mostramos que las endotoxinas inducen la activación por fosforilación de las cinasas de la familia de las MAPK y de la vía de AKT. Por este motivo deseamos caracterizar si se presentan diferencias en la cinética de activación de estas cinasas.



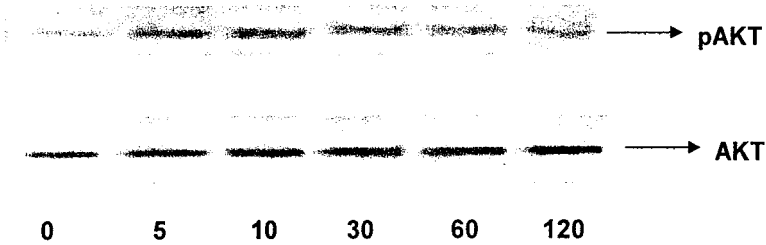
Curso Temporal Para La Fosforilación De AKT Por Acción De Ácido Lipoteicoico En Fibroblastos Gingivales De Pacientes Diabéticos

La vía de señalización de AKT es crucial para diversos aspectos del desarrollo celular, supervivencia y apoptosis.³⁴ Sin embargo, la vía de señalización PI3K/AKT es importante para diversas funciones fisiológicas celulares, y en particular, para la señalización de la insulina, que cuando se bloquea in vivo puede causar graves efectos secundarios sistémicos³⁴

Para caracterizar la fosforilación de AKT, se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de ácido lipoteicoico de 30µg/ml utilizando tiempos de 5, 10,15, 30, 60 y 120 minutos. A partir de los 5 minutos de tratamiento, se observó la fosforilación de AKT, cuyo peso molecular es 43 KDa, en ese mismo momento se produjo la mayor inducción y la fosforilación comenzó a disminuir a los 10 minutos. Lo anterior sugiere que el ácido lipoteicoico es capaz de inducir la fosforilación dependiendo del tiempo de AKT, por lo que se procedió a estudiar el patrón de fosforilación específico para cada uno de los miembros de las MAPK: ERK, P38 y JNK.



A



B

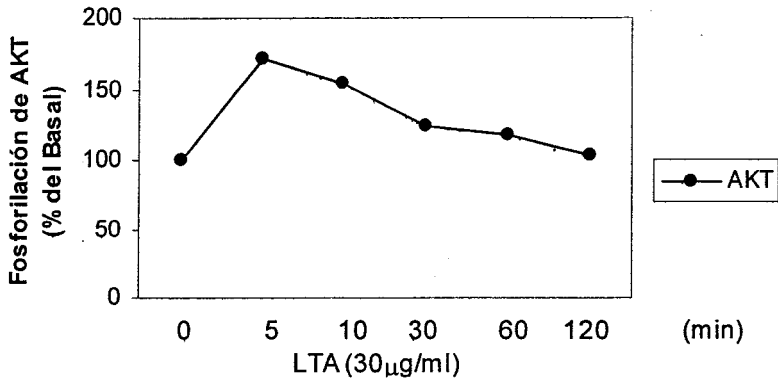


Fig. 18 Curso temporal para la fosforilación de AKT en fibroblastos gingivales humanos tratados con ácido lipoteicoico.

- Las células se trataron con 30 µg/ml de ácido lipoteicoico a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60 y 120 minutos respectivamente)
- Análisis gráfico sobre la fosforilación de AKT proveniente del experimento curso temporal ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos. EL control (0) se tomó como el 100% del basal tomando en cuenta la densidad óptica de la banda obtenida por el programa *Labworks*.



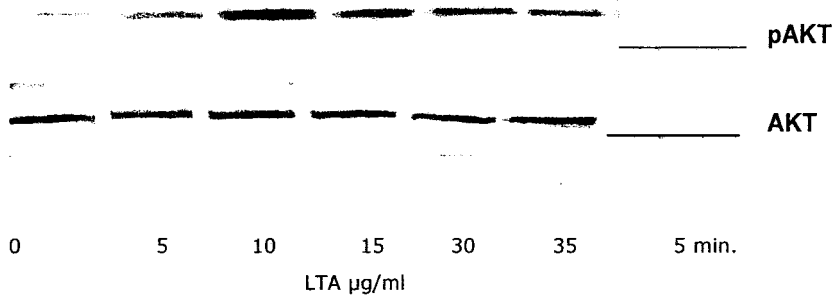
Dosis Respuesta De La Fosforilación De AKT Por La Acción De Ácido Lipoteicoico En Fibroblastos Gingivales De Pacientes Diabéticos

Como se mencionó anteriormente, la activación de la cinasa AKT juega un papel central en funciones celulares fundamentales tales como la proliferación y supervivencia celular a través de la fosforilación de una variedad de sustratos.³⁵

Para caracterizar la fosforilación de AKT a diferentes dosis con un tiempo de 5 minutos de tratamiento, se utilizaron diferentes dosis de ácido lipoteicoico, desde 5 µg/ml hasta 35 µg/ml. Se observó la fosforilación de AKT comenzando con una dosis de 5 µg/ml, la mayor fosforilación se presentó con una dosis de 10 µg/ml que continuó hasta una dosis de 35 µg/ml. Lo anterior sugiere que el ácido lipoteicoico es capaz de inducir la fosforilación de AKT, dependiendo de de la dosis, por lo que se procedió a estudiar el patrón específico para cada uno de los miembros de las MAPK: ERK, P38 y JNK.



A



B

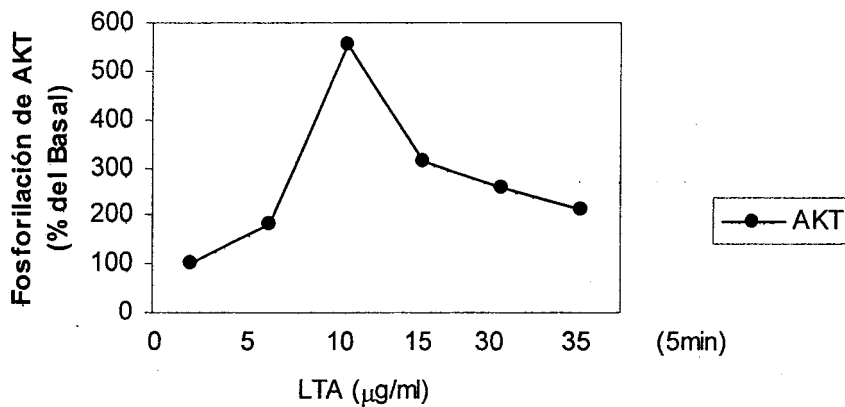


Fig.19 Dosis respuesta de la fosforilación de AKT en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos tratados con ácido lipoteicoico.

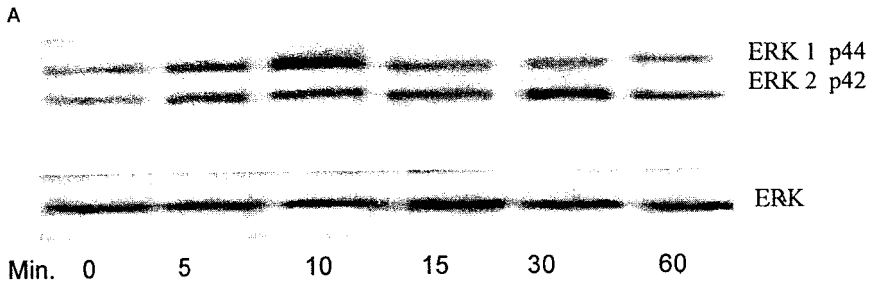
- A. Las células se trataron con dosis desde $5\mu\text{g/ml}$ hasta $35\mu\text{g/ml}$ durante 5 minutos.
- B. El análisis grafico sobre la fosforilación de AKT proveniente del experimento dosis respuesta del tratamiento con ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales humanos de pacientes diabéticos. El control (0) se tomó como el 100% del basal tomando en cuenta la densidad óptica de la banda obtenida por el programa *Labworks*.



Curso Temporal De La Fosforilación De ERK 1/2 Por Efecto Del Ácido Lipoteicoico En Fibroblastos Gingivales De Pacientes Diabéticos

La cascada de transducción de señales de las MAP cinasas es un mediador vital de un número importante de funciones celulares, que incluyen el crecimiento, la proliferación y la supervivencia, entre otros³⁶. La cascada de cinasas PI3K/AKT también controla la apoptosis y puede fosforilar muchas de las proteínas reguladoras de la apoptosis y del ciclo celular³⁷.

Para caracterizar la fosforilación de ERK 1/2, se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de ácido lipoteicoico de 5 µg/ml, utilizando tiempos desde 5 hasta 60 minutos. Desde los 5 minutos de tratamiento se observó la fosforilación de ERK 1/2 (los cuales tienen un peso molecular de 41 y 42 kDA, respectivamente). Se puede observar en ERK 1 la mayor inducción, que se produce a los 10 minutos de tratamiento. La fosforilación comienza a disminuir a los 15 minutos de tratamiento. En ERK 2 la mayor inducción se produce a los 30 minutos mientras que la fosforilación comienza a disminuir a los 60 minutos. Lo anterior nos sugiere que el ácido lipoteicoico es capaz de inducir la fosforilación de ERK 1/2 dependiendo del tiempo, por lo que se pretende caracterizar el patrón de fosforilación de otra proteína perteneciente a la misma familia de MAP cinasas: p38.



B

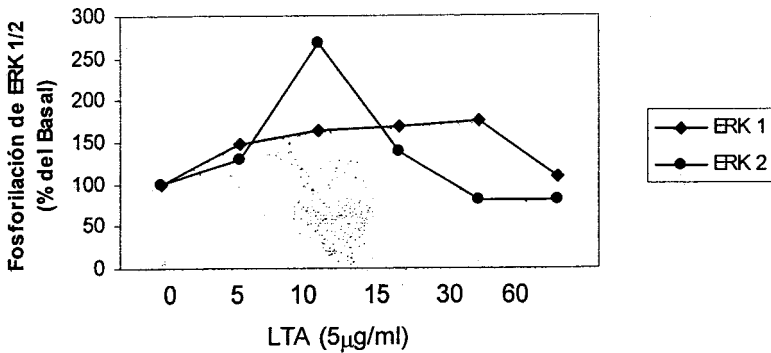


Fig. 20 Curso temporal de la fosforilación de ERK 1/2 en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos tratados con ácido lipoteicoico.

A. Las células se trataron con 5 µg/ml de ácido lipoteicoico a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 minutos, respectivamente).

B. Análisis gráfico del experimento curso temporal con ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos sobre la fosforilación de ERK 1/2. El control (0) se tomó como el 100% del basal tomando en cuenta la densidad óptica obtenida por el programa *Labworks*.



Dosis Respuesta De La Fosforilación De ERK 1/2 Por La Acción De Ácido Lipoteicoico En Fibroblastos Gingivales De Pacientes Diabéticos

La cascada de cinasas Raf/MEK/ERK es esencial en la transmisión de señales desde los receptores de membrana hasta los factores de transcripción que controlan la expresión genética, culminando en la regulación de la progresión del ciclo celular. Esta cascada puede prevenir la muerte celular a través de la activación y fosforilación de ERK2 y las proteínas reguladoras de la apoptosis y del ciclo celular.³⁷

Para caracterizar la fosforilación de ERK 1/2 a diferentes dosis con un tiempo de 5 minutos de tratamiento se utilizaron diferentes dosis de ácido lipoteicoico desde 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 35 $\mu\text{g/ml}$. Se observó la fosforilación de ERK 1/2 desde una dosis de 5 $\mu\text{g/ml}$, la mayor inducción se produjo a una dosis de 15 $\mu\text{g/ml}$ que continuó hasta una dosis de 35 $\mu\text{g/ml}$. Lo anterior sugiere que el ácido lipoteicoico es capaz de inducir la fosforilación de ERK 1/2 dependiendo de la dosis. Por lo que se pretende caracterizar el patrón de fosforilación de otra proteína perteneciente a familia de MAPk: p38

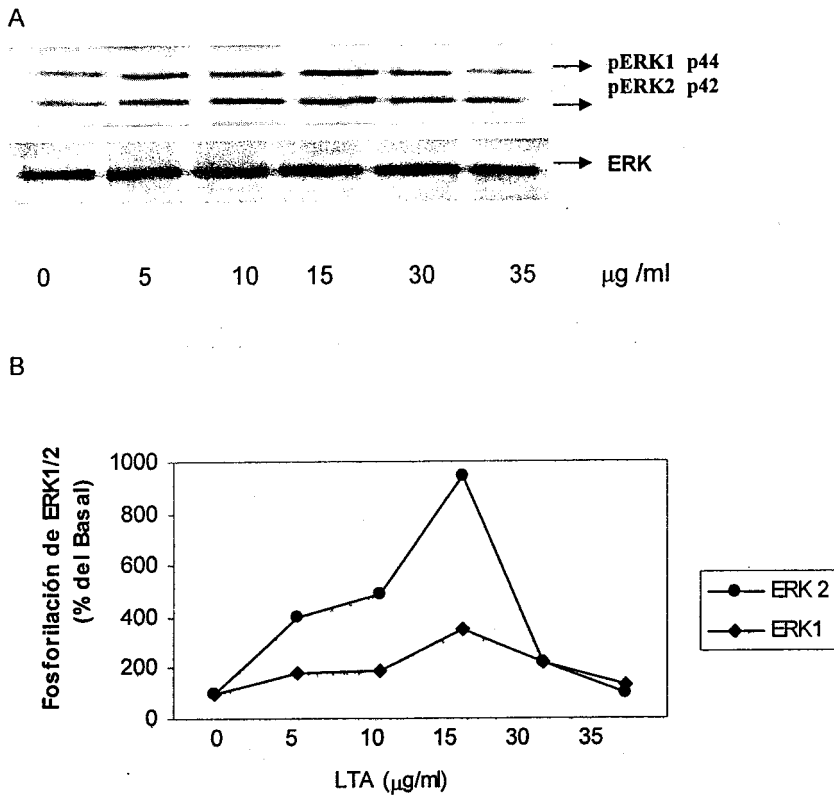


Fig. 21 Dosis respuesta de la fosforilación de ERK 1/2 en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos tratados con ácido lipoteicoico.

- A. Las células se trataron con dosis de 5, 10, 15, 30 y 35 $\mu\text{g/ml}$ durante 5 minutos.
- B. Análisis gráfico del experimento dosis respuesta de ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos sobre la fosforilación de ERK 1/2. el control (0) se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el programa *Labworks*.



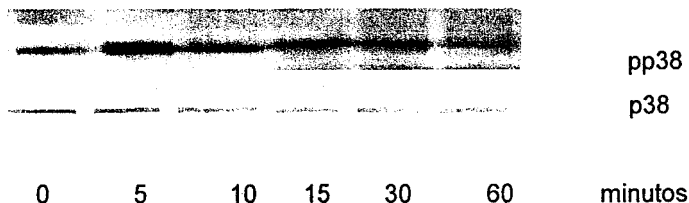
Curso Temporal De La Fosforilación De p38 Por La Acción De Ácido Lipoteicoico En Fibroblastos Gingivales De Pacientes Diabéticos

Las señales captadas desde varios receptores de la superficie celular y las señales ambientales convergen en las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), las cuales eventualmente fosforilan y activan varios factores de transcripción y otros factores moleculares. Miembros de la familia de las MAPK, p38, que reaccionan a las citocinas proinflamatorias y al estrés celular, se activan característicamente por una la fosforilación en serie y la activación progresiva de cinasas (en dirección opuesta a la transcripción) denominada cascada de MAPK.³⁸

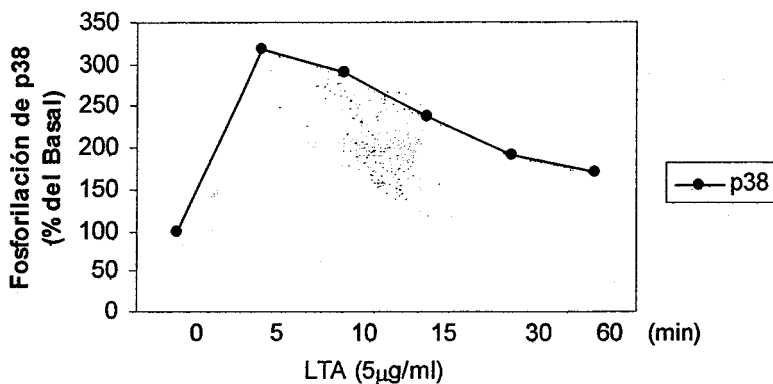
Para caracterizar la fosforilación de p38 se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de ácido lipoteicoico de 5 $\mu\text{g/ml}$, utilizando tiempos desde 5 hasta 60 minutos. Desde los 5 minutos de tratamiento, se observa la fosforilación de p38 con un peso molecular de 40 KDa y se presenta también la mayor inducción en ese tiempo y la fosforilación comienza a disminuir a los 10 minutos de tratamiento, manteniéndose hasta los 60 minutos de tratamiento. Lo anterior sugiere que el ácido lipoteicoico es capaz de inducir la fosforilación de p38 dependiendo del tiempo. Por lo que se pretende caracterizar el patrón de fosforilación de la última proteína perteneciente a la familia de las MAPK: JNK



A



LTA 5 µg/ml



B

Fig. 22 Curso temporal de la fosforilación de p38 en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos tratados con ácido lipoteicoico.

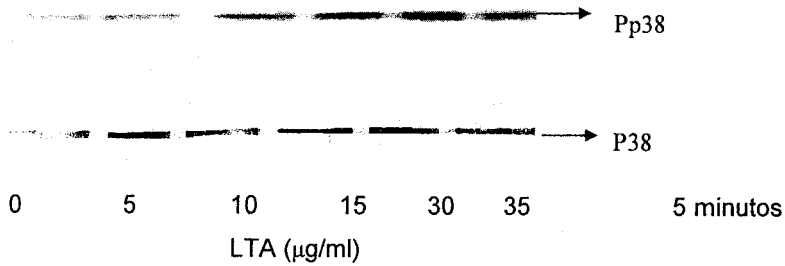
- Las células se trataron con 5 µg/ml de ácido lipoteicoico a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos).
- Análisis gráfico del experimento curso temporal del tratamiento con ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos sobre la fosforilación de p38. el control (0) como el 100% del basal tomando en cuenta la densidad óptica de la banda obtenida por el programa *Labworks*.



Dosis Respuesta De La Fosforilación De p38 Por La Acción De Ácido Lipoteicoico En Fibroblastos Gingivales De Pacientes Diabéticos

La proteína cinasa p38 está involucrada en varias respuestas celulares, incluyendo la estimulación por lipopolisacárido en monocitos, dando como resultado la producción de citocinas proinflamatorias tales como el TNF-alfa.³⁹

Para caracterizar la fosforilación de p38 a diferentes dosis con un tiempo de 5 minutos de tratamiento, se utilizaron dosis de ácido lipoteicoico desde 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 35 $\mu\text{g/ml}$. Observándose la fosforilación de p38 desde una dosis de 5 $\mu\text{g/ml}$ y una mayor fosforilación con una dosis de 15 $\mu\text{g/ml}$, que continuó hasta los 35 $\mu\text{g/ml}$. Estos datos sugieren que el ácido lipoteicoico es capaz de inducir la fosforilación de p38 de manera dependiente de la dosis. Por lo que se pretende caracterizar el patrón de fosforilación de la última proteína perteneciente a la familia de las MAPK: JNK



B

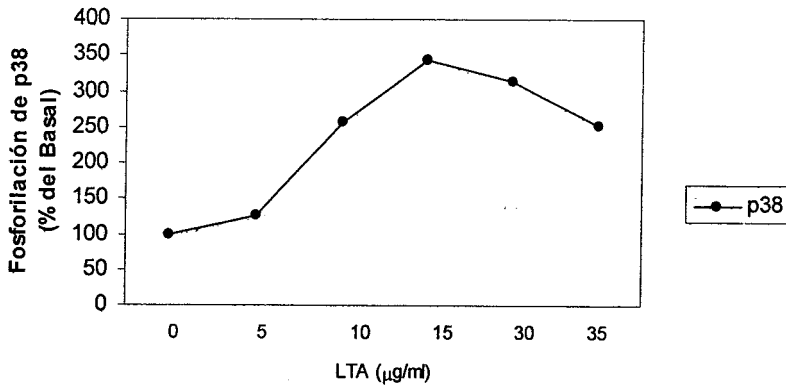


Fig. 23 Dosis respuesta de la fosforilación de p38 en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos tratados con ácido lipoteicoico.

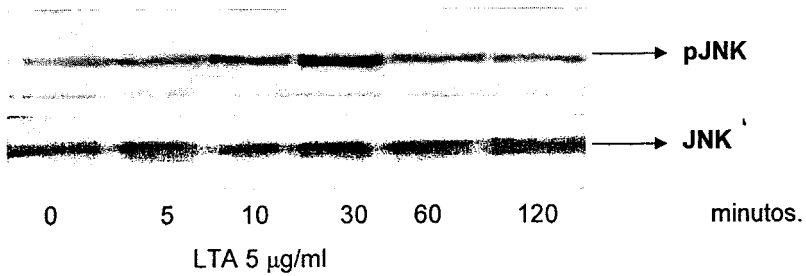
- Las células se trataron con una dosis de 5, 10, 15, 30 y 35 µg/ml durante 5 minutos.
- Análisis gráfico del experimento dosis respuesta del tratamiento con ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos sobre la fosforilación de p38. EL control (0) se tomó como el 100% del basal tomando en cuenta la densidad óptica de la banda obtenida por el programa *Labworks*.



Curso Temporal De La Fosforilación De JNK Por La Acción De Ácido Lipoteicoico En Fibroblastos Gingivales De Pacientes Diabéticos

De los sistemas de señalización celular, el enfoque recae en tres cascadas principales de señalización que están implicadas en la proliferación celular, supervivencia y respuesta al estrés celular. Éstas cascadas son, respectivamente, la cinasa de la proteína activada por mitógeno (MAPK), la cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K) y la cinasa N terminal Jun (JNK).⁴⁰

Para caracterizar la fosforilación de JNK se realizaron ensayos de tipo curso temporal con una dosis de ácido lipoteicoico de 5 $\mu\text{g/ml}$, utilizando tiempo desde 5 hasta 120 minutos. Observándose la fosforilación de JNK con un peso molecular de 45 KDa. Desde los 5 minutos de tratamiento, la mayor inducción se produce a los 30 minutos de tratamiento y la fosforilación comienza a disminuir a los 60 minutos de tratamiento. Estos datos sugieren que el ácido lipoteicoico juega un papel importante como agente para promover la fosforilación de las proteínas pertenecientes a la familia de las MAPK como lo es JNK.



B

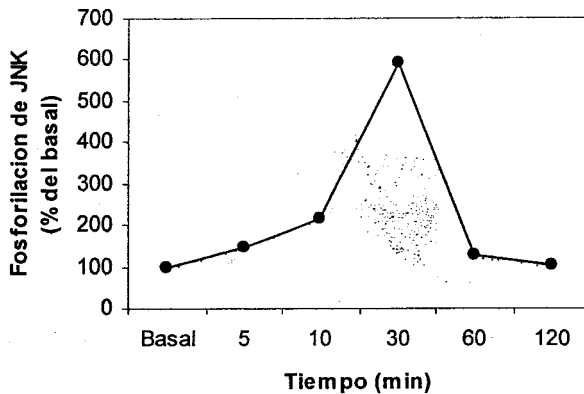


Fig. 24 Curso temporal de la fosforilación de JNK en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos tratados con ácido lipoteicoico.

- Las células se trataron con 5 µg/ml de ácido lipoteicoico a diferentes tiempos (5, 10, 30, 60 y 120 minutos, respectivamente).
- Análisis grafico del experimento curso temporal del tratamiento con ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos sobre la fosforilación de JNK. EL control (0) se tomó como el 100% del basal tomando en cuenta la densidad óptica de la banda obtenida por el programa *Labworks*.



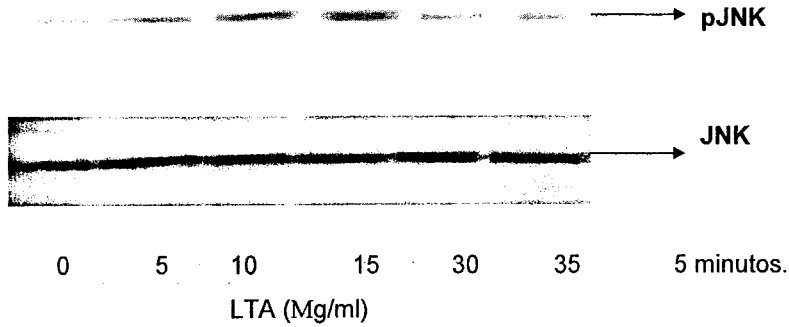
Dosis Respuesta De La Fosforilación De Jnk Por La Acción De Ácido Lipoteicoico En Fibroblastos Gingivales De Pacientes Diabéticos

Los componentes de las vías de señalización de las MAPK pueden juntarse en complejos que son co-ordenados por proteínas reguladoras incluyendo proteínas de soporte. Existe una creciente evidencia que estas proteínas: (i) mantienen la especificidad de la señalización y facilitan la activación de los componentes de las vías, (ii) localizan componentes de las vías en sitios subcelulares particulares o en blancos específicos, y (iii) sirven como un punto de reintegración de la señalización para permitir la regulación de las vías de las MAPK por otros eventos de señalización en la célula. Una familia de proteínas de soporte que regula la señalización por activación de estrés de las MAPK son las proteínas JIP [proteínas en interacción con la JNK (cinasa c-Jun N-terminal)]. Éstas a su vez han demostrado formar complejos con cinasas JNK específicas.⁴¹

Para caracterizar la fosforilación de cinasas JNK a diferentes dosis con un tiempo de 5 minutos de tratamiento, se utilizaron dosis de ácido lipoteicoico desde 5 $\mu\text{m}/\text{ml}$ hasta 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se observa la fosforilación de JNK desde una dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la mayor inducción se produce a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que continúa hasta una dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Estos datos sugieren que el ácido lipoteicoico juega un papel importante como agente para promover la fosforilación de las proteínas pertenecientes a la familia de las MAPK como JNK dependiendo de la dosis.



A



B

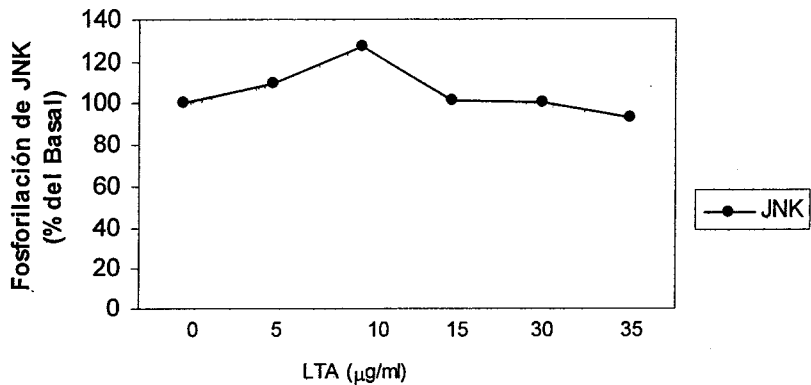


Fig. 25 Dosis respuesta de la fosforilación de JNK en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos tratados con ácido lipoteicoico.

- Las células se trataron con dosis desde 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 35 $\mu\text{g/ml}$ durante 5 minutos.
- Análisis grafico del experimento dosis respuesta del tratamiento con ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales de pacientes diabéticos sobre la fosforilación de JNK. EL control (0) se tomó como el 100% del basal tomando en cuenta la densidad óptica de la banda obtenida por el programa *Labworks*.



12. Conclusiones

- El ácido lipoteicoico induce la fosforilación de fosfoproteínas ERK, JNK y p38 en fibroblastos gingivales humanos de pacientes diabéticos.
- El ácido lipoteicoico incrementa rápidamente la fosforilación de un gran número de proteínas cuando se tratan 10 minutos y desde las dosis de 30 mg. En los ensayos de western-blot utilizando anticuerpos, el aumento en la fosforilación de estas proteínas es discreto.
- El incremento en la fosforilación es detectable desde los 5 minutos y permanece hasta los 60 minutos.
- Observándose la fosforilación de ERK1/2 con un peso molecular de 41 y 42 kDa respectivamente, desde los 10 minutos de tratamiento, la mayor inducción se produce a los 10 minutos de tratamiento y la fosforilación comienza a disminuir a los 15 minutos la fosforilación de ERK1/2 desde una dosis de 10 μ g y una mayor fosforilación con una dosis de 15 μ g que continua hasta los 30 μ g.
- Durante la fosforilación de JNK con un peso molecular de 45 kDa, desde los 5 μ g de tratamiento la mayor inducción se produce a los 10 μ g de tratamiento y la fosforilación comienza a disminuir a los 15 μ g.
- El ácido lipoteicoico induce la fosforilación de las proteínas ERK1 y ERK2 en fibroblastos gingivales humanos en pacientes diabéticos.
- La fosforilación de p38 con un peso molecular de 40 kDa, desde los 5 minutos de tratamiento la mayor inducción se produce a los 10 minutos de tratamiento y la fosforilación comienza a disminuir a los 30 minutos una mayor fosforilación con una dosis de 5 μ g.
- Nuestros resultados muestran que la fosforilación de estas proteínas se produce de forma muy rápida a los 5 minutos de tratamiento y desde dosis de 5 μ g mostrando su máxima expresión a los 15 μ g.



13. Discusión

En el presente trabajo se ha desarrollado una amplia investigación de una enfermedad que concierne a la salud de los mexicanos: la diabetes mellitus, particularmente en lo que concierne a uno de los tejidos blandos de la boca y al grupo celular más abundante en las encías: el fibroblasto. Las encías están expuestas por diversos factores a padecer enfermedad periodontal, también conocida como periodontitis. Una de las principales causas de la enfermedad periodontal es la falta de aseo bucal, lo que conduce a una acumulación excesiva de bacterias altamente patógenas que comienzan a destruir a los tejidos duros y blandos de la boca. Dentro de la gran cantidad y diversidad de bacterias que se localizan en esta área que comienzan su proceso de desarrollo y colonización, se encuentra el grupo bacteriano de nuestra investigación: las bacterias gram positivas; las cuales poseen ácido lipoteicoico como un componente fundamental en la superficie de sus membranas, este ácido, es una toxina altamente nociva para las células humanas y para todo el organismo en general, pues está totalmente demostrada la participación de esta toxina como uno de los principales agentes causantes del shock séptico en caso de infecciones bacterianas severas.^{26, 27}

Las últimas cifras del Instituto Nacional de Nutrición⁵¹ indican que México ocupa el segundo lugar en el mundo con personas obesas, solo después de los Estados Unidos de América. En México, aproximadamente el 50% de la población sufre problemas de sobrepeso, y, del total de la población, aproximadamente entre un 24 a un 30% padece algún grado de obesidad. A su vez, la obesidad acarrea un gran número de padecimientos, entre ellos la diabetes mellitas. A nivel mundial, México también ocupa un lugar importante respecto a este padecimiento, pues se localiza en el cuarto lugar en la escala de países con mayor gente que sufre esta enfermedad debido a que más de 6 millones de mexicanos la padecen. Además, un



grave problema al que se enfrenta el país para controlar este padecimiento, aunado al de los malos hábitos alimenticios, es el hecho de que cerca de más de 1 millón de personas ignoran que sufren esta enfermedad, pues no les ha sido diagnosticada. Esto convierte a la diabetes en una de las principales causas de mortalidad en nuestro país, pues 3 de cada 10 fallecimientos se deben a este padecimiento o a sus complicaciones, ocupando el tercer lugar en las principales causas de muerte en los mexicanos.⁵⁰⁻⁵⁴

Tan sólo los resultados del censo de 2004 del Instituto Mexicano del Seguro Social mostraron un total de 2, 334,340 pacientes diabéticos en esta institución. De estos pacientes, el 40.4% padecían obesidad y 39.6 sufrían problemas de sobrepeso.⁵¹ La población de diabéticos en el Seguro Social es un número importante como marco de referencia dentro del total de pacientes que sufren esta enfermedad. Entre los factores más importantes en la prevalencia de la diabetes se encuentran: la genética, la edad, el nivel de educación, un índice elevado de masa corporal y un perímetro abdominal por encima de los valores normales.⁵²

La diabetes tipo 2 se asocia con una elevada morbilidad cardiovascular; alrededor del 50% de los pacientes tienen manifestaciones de enfermedad aterosclerosa al momento del diagnóstico, y aproximadamente dos terceras partes morirán por esta causa.⁵⁰ La cardiopatía isquémica y la diabetes mellitus son dos de las principales causas de muerte en México desde el año 2000.⁵³

Es aceptado generalmente que la obesidad se asocia con algunos otros factores de riesgo, como el padecer enfermedades tales como la hipertensión, la hiperlipidemia, la diabetes mellitus tipo 2 y las enfermedades periodontales. El número de gente obesa se incrementa rápidamente en todas las regiones del mundo. Los adipocitos hallados en



el tejido adiposo de los individuos obesos producen grandes cantidades de moléculas biológicamente activas tales como leptina, una importante molécula en la regulación del gasto de energía y el peso corporal. Estos derivados provenientes de los adipocitos activan a moléculas llamadas adipocitocinas y a citocinas pro inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), y se ha encontrado que en los pacientes obesos existe una concentración mayor de esta citosina en la sangre. Se ha visto, igualmente, que esto actúa como un factor de riesgo en la inflamación periodontal. Adicionalmente, un factor muy importante para que se produzca la liberación de esta citosina es la sensibilidad a la insulina en pacientes obesos y diabéticos.⁵⁴

Los tres diferentes clases de proteína JNK son activados por múltiples tipos celulares por señales apoptóticas y mitogénicas, esta proteína JNK posee funciones distintas en la regulación celular por regulación diferencial de la vía c-Jun, la cual es un regulador crítico en el progreso del ciclo celular. La ausencia de JNK, el regulador positivo de c-Jun, conduce a un decremento en la proliferación de los fibroblastos. Varios tipos celulares, incluyendo los fibroblastos, muestran un incremento en la tasa de proliferación JNK en contraste con JNK1 que es un regulador negativo de la proliferación celular en múltiples tipos celulares.⁵⁵

La vía de la proteína cinasa p38 es activada por varios factores de estrés potencialmente importantes para el crecimiento y apoptosis celular. Se ha examinado la expresión de la MAPK p38 en los glomérulos durante la nefropatía diabética. La actividad de p38 glomerular se incrementa en la neuropatía diabética, esta activación de p38 en los glomérulos diabéticos juega un papel fundamental en la patogenia de la hipertrofia temprana y la acumulación de matriz extracelular.⁵⁶



La vía de la MAPK p38 es activada por varios factores de estrés. Esta vía es potencialmente importante para el crecimiento celular y la apoptosis. Poco se sabía acerca del patrón de activación de la vía en un glomérulo durante el curso de la nefropatía diabética. Sin embargo, ahora se sabe que la actividad glomerular de la cinasa p38 se incrementa en fases tempranas de nefropatía diabética, esta activación de la vía MAPK p38 en los glomérulos de diabéticos, puede tomar parte en la hipertrofia temprana y en la acumulación de matriz extracelular.⁶¹

La diabetes mellitus es un importante factor de riesgo en el incremento de fallas en la cicatrización de las venas después de un *bypass*. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares se encuentran relacionados con el desgaste de los vasos en este tipo de población. Reportes recientes⁵⁷ han sugerido que la remodelación de los vasos pudiera ser mediada por inducción y activación de las MAPK. Existen datos que sugieren que la diabetes está asociada con una significativa alteración en la habilidad de la vena cava para activar la vía de las MAPK y la apoptosis.⁵⁷

Se han reportado descubrimientos que sugieren que la vena cava inferior entre animales normales y diabéticos exhibe diferencias entre una inducción mayor y regulación de las MAPK y la apoptosis. Estos datos que sugieren que la inducción en la vena cava de los no diabéticos está asociado con la fosforilación de las MAPK: ERK1, ERK2, p38 α , p38 γ , JNK1, JNK2, JNK3.⁵⁷

La diabetes está asociada con alteraciones en la regulación de las MAPK en la vena cava. En células de mamíferos, las vías de MAPK: ERK, JNK y p38 son las tres mayores cascadas de señalización que comprende el sistema de señalización de MAPK.⁵⁸



Recientes estudios muestran un resultado que la diabetes está asociada con los cambios en como la vena cava regula la vía de señalización de las MAPK. Cuando se compara la vena cava de los no diabéticos, la vena cava diabética exhibe un alto contenido de las MAPK: p44, p38, JNK1, y JNK3 y una disminución en la cantidad de la MAPK p38y.⁵⁷ Ahora se sabe que la expresión fosforilación basal de la MAPK p38 es mayor en la vena cava diabética.⁵⁷

Estudios previos han investigado los efectos del incremento de la glucosa o la influencia de la diabetes sobre los niveles de proteína MAPK, sin embargo, ambos han sido confusos. Además, varios estudios no han demostrado un efecto específico,⁵⁹ mientras que otros han sugerido que esas condiciones tienden a incrementar la expresión de esas proteínas.^{60, 61, 62}

Las proteínas MAPK contribuyen a la alteración de funciones y crecimiento celular en una variedad de enfermedades. Tienen participación en las complicaciones endoteliales en la diabetes mellitus. Los niveles altos de glucosa incrementan la actividad de p38 fosforilado y total, lo mismo sucede con las MAPK p42 y p44. Estos altos niveles de glucosa que inducen un incremento en la fosforilación de p38 son reversibles en la presencia del anticuerpo neutralizante TGF-beta. Los niveles altos de glucosa incrementan la actividad de las cinasas p38 y p42/44 en células endoteliales humanas, pero sólo la cinasa p38 participa en la respuesta antiproliferativa de crecimiento a través de los efectos de TGF beta.⁶²

La vía de señalización de la MAP cinasa p38 es importante en la inmunidad, en la activación de macrófagos y la apoptosis. Desde que fue asociada a la destrucción de las células beta durante el descubrimiento de la diabetes tipo 1 se ha encontrado que p38 es un mediador clave que



activa la insulinitas, de benigna a destructiva, en el desarrollo de la diabetes tipo 1.⁶³

Se han realizado estudios para determinar si la diabetes esta asociada con la fosforilación de la cinasa JNK, encontrándose que JNK activado se asocia primariamente con mecanoreceptores, que en diabetes se ve incrementada la cinasa JNK.⁶⁴

Además de las clásicas enfermedades cardiovasculares, los altos niveles de glucosa en sangre interfieren directamente con los cardiomiocitos. Existen reportes⁶²⁻⁶⁵ de estudios para la expresión de la MAPK p38 donde se ha visto que la glucosa causa un incremento en la formación de radicales, y en la expresión de la fosforilación de p38. La diabetes mellitus influye directamente en la activación de un grado de señalización prominente de moléculas y la función contráctil de los cardiomiocitos del ventrículo adulto, lo cual lleva a una viabilidad a desarrollar cardiomiopatía diabética.^{62, 65}

Las deducciones que aquí se muestran definen la participación de las cinasas derivada de los diferentes estímulos producidos en respuesta al ácido lipoteicoico en un grupo específico de células del tejido conectivo de la encía. Las tres principales familias de cinasas: ERK, JNK y p38 se fosforilan en respuesta al tiempo y a la dosis del ácido lipoteicoico.

En consecuencia, la transducción de señales se activa en los fibroblastos gingivales, los cuales activan el mecanismo de inflamación, y liberan mediadores, así, el proceso se generaliza en todo el tejido y posteriormente en el desarrollo de la enfermedad periodontal.



A través de nuestros resultados podemos comprobar nuestra hipótesis, pues se activa la fosforilación en la familia de las MAP cinasas, en las células de pacientes diabéticos.

La presente investigación puede servir como referencia para la comparación entre los fibroblastos en tejido sano y los afectados por la diabetes mellitus, pues los diabéticos tienden a padecer con mayor facilidad enfermedad periodontal. Lo anterior nos permitirá descubrir en un futuro mayores diferencias entre los tejidos sanos y los afectados por la diabetes y así contribuir al desarrollo de investigación en fármacos que actúen a nivel celular inhibiendo ciertas vías de la inflamación antes de que esta se presente, principalmente la vía de las MAP cinasas, que como hemos visto, afecta en gran medida a los tejidos afectados por la diabetes.

El siguiente paso en el desarrollo de esta investigación será el estudio de inhibidores específicos que bloqueen la cascada de las respectivas cinasas antes de su activación, por lo tanto, evitando esta activación, se impedirá también el desarrollo de cascadas que están directamente involucradas con el proceso inflamatorio, y por consiguiente, impedir también el desarrollo de la enfermedad periodontal.



14. Bibliografía

1. LINDHE JAN. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Editorial Médica Panamericana. España. 2000.
2. GENCO J. ROBERT. *Periodoncia*. Editorial Interamericana. Mc-Graw-Hill. México. 2004.
3. CARRANZA FERMÍN A. NEWMAN MICHAEL G. *Periodontología Clínica*. Editorial Interamericana. 9ª.ed. Mc-Graw-Hill. México. 2002.
4. GLICKMAN I. *Periodontología clínica*. 7ª ed. México: Ed. Interamericana; 1993.
5. SIMPSON, R., KAST, S. *Management of gestational diabetes with a conservative insulin protocol*. Med. J. Aust. 2000 172 (II):537-540
6. ZACHARIASEN, R. *Diabetes Mellitus and periodontal disease*. 1991 compend Cont. Educ. Dent. XII:5
7. ROSE, L.; KAYE D. *Medicina interna en odontología*. Tomo II. Editorial Salvat. 1997 España pp1375-1427
8. RAMZI, S. COTRAN, VINAY KUMAR, TUCKER COLLINS. *Robbins Patología estructural y funcional*. 6 edición. Edit. Mc Graw Hill Interamericana. 2000
9. CORMACK, DAVID E. *Histología de HAM*. 9 Edición editorial Oxford University Press 1988
10. K. MURALI AND K. RAO. *MAP Kinase activation in macrophages*. Jorurnal Leuk. Biol. 2001; 69: 3-10.
11. J. M. ENGLISH AND M. H. COBB. *Pharmacological inhibitors of MAPK pathways*. TREDNS in Pharmacological Sciences. 2002; 23 (1): 40-44.
12. S. BEINKE AND S. C. LEY. *Functions of NF-kB1 and NF-kB2 in immune cell biology*. Biochem. Soc. 2004; 382: 393-409.
13. COHEN B; *Morphological Factors In The Pathogenesis Of Periodontal Disease*. Br Dent Joournal. 1959; 107:31.



14. AINAMO J, LOE H: *Anatomical Characteristics of Gingiva. A Clinical And Microscopic Study Of The Free And Attached Gingiva.* Journal Periodontology 1996; 11:182
15. AVERY JK, RAPP R: *Pain Conductin In Human Dental Tissues.* Dent Clin North Am 1959; July : 489.
16. GUTIÉRREZ VENEGAS GLORIA, KAWASAKI CÁRDENAS PERLA et.al. *Los Lipopolisacáridos: Estructura, receptores y transducción de señales.* Simposium de Transducción de Señales. Universidad Nacional Autónoma de México. Julio 2002. pp31-38.
17. KAWASAKI CÁRDENAS PERLA. *Efecto de los lipopolisacáridos sobre la vía de transducción de tirosin-cinasa en fibroblastos gingivales humanos..* México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003. pp. 21-24
18. GARCÍA-SAINZ JESÚS ADOLFO. *Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular.* La ciencia para todos. México. 1997.
19. ALBERTS BRUCE. DENNIS BRAY. et. al. *Biología molecular de la célula.* Ediciones Omega, S.A. Barcelona.1996.
20. BERRIDGE J. MICHAEL. *The Molecular Basis of Communication within the cell.* Sci.Am. 253:124-134.
21. TARO MATSUMOTO, KOUTARO YOKOTE, et.al. *Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration.* J. Bio.Chem.1999; 274:13954-13960
22. YUKIHIKO ARAMAKI, RYOZOU MATSUNO. *Involvement of p38 MAP kinase in inhibitory effects of phosphatidylserine liposomes on nitric oxide production from Macrophages stimulates with LPS.* Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001; 280: 982-987.
23. JIANG Y, ULEVITCH RJ. *The signal transduction of cell activation by LPS: the studies from CD14 to p38 MAPK.* Cell Res 2002;12 (5-6):331-7.
24. STELMACH JE, LIU L, PATEL SB, PIVNICHNY JV, SCAPIN G, SINGH S, HOP CE, WANG Z, et.al. *Design and synthesis of potent,*



- orally bioavailable dihydroquinazolinone inhibitors of p38 MAP kinase. *Shock*. 2002; 18 (5):401-6
25. KAN WH, YAN WS, JIANG Y, WANG JZ, QIN QH, ZHAO KS. *Role of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in human endothelial cells*. *Glia* 2002; 40(2):175- 183.
 26. *Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia—United States, 1979–1987*. *Morb Mortal Wkly Rep* 39:31–34, 1999.
 27. SOLOMKIN JS: *Antibiotic resistance in postoperative infections*. *Crit Care Med* 29:N97–N99, 2001. Fluit AC.
 28. JONES ME, SCHMITZ FJ, ACAR J, GUPTA R, VERHOEF J: *Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998*. *Clin Infect Dis* 30:454–460, 2000.
 29. VINCENT JL, BIHARI DJ, SUTER PM, BRUINING HA, WHITE J, NICOLAS-CHANOIN MH, WOLFF M, SPENCER RC, HEMMER M: *The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study*. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 274:639–644, 1995.
 30. RICHARDS MJ, EDWARDS JR, CULVER DH, GAYNES RP: *Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States*. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 27:887–892, 1999.
 31. GARTNER LESLIE P. HIATT JAMES L. *Histologia*. 1era edicion. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 1997
 32. THORTENSSON H, HUGOSON A. *Periodontal disease experience in adult long- duration insulin- dependent diabetics*. *J Clin Periodontol* 1993; 20:352
 33. BROOKS GEO, BUTEL JANET, MORSE STEPHEN. *Microbiología médica de Jawets*. 18 edicion. Editorial el manual moderno. 2005.



34. MARTELLI AM, NYAKERN M, TABELLINI G, BORTUL R, TAZZARI PL, EVANGELISTI C, COCCO L. *Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. Leukemia.* 2006 Jun;20(6):911-28.
35. OSAKI M, OSHIMURA M, Ito H. *PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis.* 2004 Nov; 9(6):667-76.
36. LEE JT JR, MCCUBREY JA. *The Raf/MEK/ERK Signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. Leukemia.* 2002 Apr; 16(4):486-507.
37. SHELTON JG, STEELMAN LS. *Effects of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signal transduction pathways on the abrogation of cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. Oncogene.* 2003 Apr 24;22(16):2478-92.
38. ASHWELL JD. *The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. Nat Rev Immunol.* 2006 Jul;6(7):532-40.
39. SCHAFFER PH, WANG L. *T cell activation signals up-regulate p38 mitogen-activated protein kinase activity and induce TNF-alpha production in a manner distinct from LPS activation of monocytes. J Immunol.* 1999 Jan 15; 162(2):659-68.
40. CHAN A. *Teaching resources. Ras-MAPK pathways. Sci STKE.* 2005 Feb 15; 2005(271):tr5.
41. WHITMARSH AJ. *The JIP family of MAPK scaffold proteins. Biochem Soc Trans.* 2006 Oct;34(Pt 5):828-32.
42. VAN AMERSFOORT ES, VAN BERKEL TJ, KUIPER J. *receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. Clin Microbiol Rev.* 2003 Jul; 16(3):379-414.
43. MORATH S, VON AULOCK S, HARTUNG T. *Structure/function relationships of lipoteichoic acids. J Endotoxin Res.* 2005; 11(6):348-56.



44. MORATH S, GEYER A, HARTUNG T. *Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus.* J Exp Med. 2001 Feb 5;193(3):393-7 2001 Feb 5;193(3):393-7.
45. HENNEKE P, MORATH S, UEMATSU S. *Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus.* J Immunol. 2005 May 15; 174(10):6449-55.
46. SCHWANDNER R, DZIARSKI R, WESCHE H. *Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2.* J Biol Chem. 1999 Jun 18; 274(25):17406-9.
47. HAN SH, KIM JH, MARTIN M. *Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2.* Infect Immun. 2003 Oct; 71(10):5541-8.
48. HATTAR K, GRANDEL U, MOELLER A, FINK L. *Lipoteichoic acid (LTA) from Staphylococcus aureus stimulates human neutrophil cytokine release by a CD14-dependent, Toll-like-receptor-independent mechanism: Autocrine role of tumor necrosis factor-[alpha] in mediating LTA-induced interleukin-8 generation.* Crit Care Med. 2006 Mar; 34(3):835-41.
49. LOTZ S, AGA E, WILDE I, VAN ZANDBERGEN G, HARTUNG T. *Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2.* J Leukoc Biol. 2004 Mar; 75(3):467-77. Epub 2003 Dec 12.
50. ISRAEL LERMAN GARBER, CARLOS AGUILAR-SALINAS, FRANCISCO J GÓMEZ-PÉREZ. *El síndrome metabólico Posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, obre la definición, fisiopatología y diagnóstico. Características del síndrome metabólico en México.* Revista de Endocrinología y Nutrición Vol. 12, No. 3 Julio-Septiembre 2004 pp 109-122.
51. Division Tecnica de Informacion Estadistica en Salud. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2006 Jul-Aug; 44(4):375-82.
52. VAZQUEZ-MARTINEZ JL, GOMEZ-DANTES H, FERNANDEZ-CANTON S. *Diabetes mellitus in an adult population of the IMSS (Mexican Institute of Social Security). Results of the National Health*



Survey 2000. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2006 Jan-Feb;44(1):13-26.

53. ECHAVARRIA-PINTO M, HERNANDEZ-LOMELI A, ALCOCER-GAMBA MA, MORALES-FLORES H, VAZQUEZ-MELLADO A. *Metabolic syndrome in adults from 20 to 40 years old in a rural Mexican community.* Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2006 Jul-Aug; 44(4):329-35.
54. NISHIMURA F, IWAMOTO Y, MINESHIBA J, SHIMIZU A, SOGA Y, MURAYAMA Y. *Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor-alpha in a 2-way relationship.* J Periodontol. 2003 Jan; 74(1):97-102.
55. SABAPATHY K, WAGNER EF. *JNK2: a negative regulator of cellular proliferation.* Sabapathy Cell Cycle. 2004 Dec;3(12):1520-3. Epub 2004 Dec 18.
56. KANG SW, ADLER SG, LAPAGE J, NATARAJAN R. *p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli.* Kidney Int. 2001 Aug; 60(2):543-52.
57. KEVIN M RICE,#1,3 DEVASHISH H DESAI,#1 SUNIL K KAKARLA. *Diabetes alters vascular mechanotransduction: pressure-induced regulation of mitogen activated protein kinases in the rat inferior vena cava.* Cardiovasc Diabetol. 2006; 5: 18. Published online 2006 September 8. doi: 10.1186/1475-2840-5-18.
58. KYOSSEVA SV. *Mitogen-activated protein kinase signaling.* Int Rev Neurobiol. 2004; 59:201-220.
59. HO FM, LIU SH, LIAU CS, HUANG PJ, LIN-SHIAU SY. *High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3.* Circulation. 2000; 101:2618-2624.
60. GLOGOWSKI EA, TSIANI E, ZHOU X, FANTUS IG, WHITESIDE C. *High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1.* Kidney Int. 1999; 55:486-499. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00284.x.



61. KANG SW, ADLER SG, LAPAGE J, NATARAJAN R. *p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli*. *Kidney Int.* 2001;60:543-552. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.060002543.x.
62. MCGINN S, SAAD S, PORONNIK P, POLLOCK CA. *High glucose-mediated effects on endothelial cell proliferation occur via p38 MAP kinase*. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E708-17
63. ANDO H, KURITA S, TAKAMURA T. *The specific p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor FR167653 keeps insulinitis benign in nonobese diabetic mice*. *Ando. Life Sci.* 2004 Feb 20; 74(14):1817-27.
64. MIDDLEMAS AB, AGTHONG S, TOMLINSON DR. *Phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in sensory neurones of diabetic rats, with possible effects on nerve conduction and neuropathic pain: prevention with an aldose reductase inhibitor*. *Diabetologia.* 2006 Mar;49(3):580-7.
65. WENZEL S, SOLTANPOUR G, SCHLUTER KD. *No correlation between the p38 MAPK pathway and the contractile dysfunction in diabetic cardiomyocytes: hyperglycaemia-induced signalling and contractile function*. *Pflugers Arch.* 2005 Nov;451(2):328-37. Epub 2005 Jul 23.