



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO DEL ÁCIDO LIPOTEICOICO SOBRE EL
MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN DE LOS
LIPOPOLISACÁRIDOS EN FIBROBLASTOS
GINGIVALES HUMANOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

CD. SILVIA MALDONADO FRÍAS

TUTOR: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

MÉXICO D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

La formación educativa y moral, la forma de actuar y el ser de cada individuo están determinados por las influencias del medio en el que se desenvuelve, así también las acciones de personas que interactúan con él marcan su desarrollo, sin embargo depende del esfuerzo propio y de los valores inculcados, utilizar de manera ética todo lo que se nos proporciona para alcanzar nuestros sueños, nuestras más anheladas metas. A cada una de las personas maravillosas que han influido, trabajado y que se han esforzado porque esta meta se cumpla, mis más profundos, sinceros y sentidos agradecimientos, por que esto es parte de un trabajo que sin su ayuda no podría ser posible..... GRACIAS.

A la UNAM, que me acogió como parte de su alumnado y a la cual considero parte de mi vida, mi hogar, mi pasión; porque es un orgullo para mi pertenecer a esta magnífica institución, GRACIAS por todo el conocimiento que he adquirido, por los profesores, tutores, sinodales, amigos y compañeros que he tenido a lo largo del tiempo que he pasado dentro de ella.

Al tutor.

Conocer un mundo de información infinita e increíble, compartir con personas maravillosas en el laboratorio de bioquímica, el hacer amigos, el aprender sobre la investigación se debe a la oportunidad de integrarme a Bioquímica GRACIAS Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio de bioquímica.

Muchas GRACIAS Rita, Miguel, Perla, Carlitos, Ana, César, Filiberto, Luis y Carolina por su amistad y a, Armandito, Marthita, Carla, Mauricio, Ulises, Carlitos, Nadia, Mary Carmen, Paty, Hiroshi, por todos los momentos que pasamos juntos, gracias a todos por su ayuda, apoyo, por su tiempo y por ser quien son.

Al jurado.

A todos y cada uno de los Doctores que integran el jurado, Gracias infinitas por toda su dedicación y valioso tiempo en la revisión de este trabajo, gracias por dejarme aprender de cada uno de ustedes y por corregir las faltas encontradas y plasmadas en los escritos previos. He aprendió de ustedes no solo académicamente sino también como personas. Gracias.

A la Dra. Elba Rosa Leyva.

GRACIAS por todo el apoyo que me ha brindado a lo largo de este proyecto, gracias por sus palabras de apoyo y aliento y sobre todo por el fabuloso humor y don de gente que ha mostrado para conmigo, gracias por su paciencia y por mediar la paz entre las personas.

Al Dr. Javier de la Fuente Hernández.

La libertad es un don otorgado al nacimiento y el cual nos pertenece; en el andar diario no percibimos la perdida de esa libertad, de ser, de elegir, de expresar, sin embargo existen personas que con una sola frase nos despiertan del adormecedor trabajo rutinario y nos recuerdan ese derecho divino. Muchísimas GRACIAS Dr., que la vida lo llene de bendiciones y de sabiduría.

A DIOS.

GRACIAS sobre todo a ti DIOS, por la vida tan maravillosa que tengo, es perfecta, así como es, con trabajo arduo, pero con muchísimo amor. Porque el elegir también implica renunciar y yo elijo vivir bajo tus enseñanzas.

Finalmente MUCHAS GRACIAS A TODOS.

SILVIA MALDONADO FRÍA

DEDICATORIA.

A Un hombre invaluable.

Mi infancia la marcaste por ser el abuelo de cuentos fantásticos, donde el amor inmenso por los nietos los lleva a un mundo de felicidad infinita.

Tus historias hacían revivir en mi imaginación el México de épocas pasadas, tus aventuras en el alpinismo y en el beisboll, llenaban mi espíritu. Tu junto con mi abuela hicieron que en mi infancia y adolescencia viviera momentos hermosos. Ahora en mi etapa adulta puedo decirte que aprendí tanta cosas de ti, que eres un ejemplo de vida para mí y que tu partida represento la perdida de una gran pilar dentro de mi, sin embargo teniendo en cuenta tus enseñanzas y valor que me infundiste, me erijo bajo esa fuerza que dejaste dentro de mi y tomo el amor que me diste para seguir adelante.

Este trabajo con las horas felices, sus horas amargas, y todo el esfuerzo realizado, te lo dedico a ti, mi querido luchador incansable ganador de mil batallas. A TI ABUELO JOSÉ GUADALUPE MALDONADO MORALES (1928-2008) GRACIAS POR TU AMOR

A mi pequeña Romina.

El tiempo se me hace tan corto cuando estoy contigo hija, y lo disfruto de tal forma que permanece conmigo aun en los momentos que dejamos de vernos. Todo el esfuerzo que implicó alcanzar esta meta, esta basado en el inmenso amor que produces en mí. GRACIAS nena por tu paciencia, por tu ternura y por ser el gran motor junto con tu papi, abuelos, bisabuelo, tíos y primos, que me dan las fuerzas extras para seguir en este camino que elegí.

A mi mejor amigo y amado esposo.

Comprendo ahora que cada momento de nuestra vidas tiene una razón de ser, jamás pensé tener la magnificencia de encontrar aquella persona ideal con la cual compartir mi vida, sin embargo llegaste en el momento preciso y contigo una serie de bendiciones, GRACIAS por tu gran amor, por tu ayuda incondicional, por sentirte orgulloso de mi, porque eres el amigo, el compañero, el esposo y el ser que me cuida y protege con gran delicadeza.....gracias amor por todo.

A mis padres y hermanos.

GRACIAS padre por tu trabajo, dedicación y amor incondicional. Por que aún ahora que somos personas adultas e independientes aun te preocupas como si tuviéramos 2 años, estas pendiente de que nada nos falte y te preocupa de nuestro bienestar. Tu labor diaria y ardua no tiene importancia porque ves remunerado todo tu esfuerzo al ver a tus hijos crecer, desarrollarse, alcanzar sus proyectos de vida y ser felices. Este logro también te pertenece, ya que tus hijos somos una extensión tuya y nuestros éxitos también los son tuyos.

GRACIAS madre por tu amor, tu tiempo, tus enseñanzas y los valores que nos inculcaste.

Hemos compartido muchas aventuras, alegrías y sinsabores juntos, GRACIAS hermanos por su compañía, apoyo y amor

A mi nueva familia.

Muchas gracias a todos y cada uno de los integrantes de la familia de mi esposo por todo su apoyo, comprensión y cariño, especialmente a Nancy, Rosa, Sra, Ave , y Velia por la gran confianza que han infundido en mi para ser capaz de poner en sus manos el más grande tesoro que Dios me ha dado, mi amada hija. Gracias por que sin su apoyo esta meta no hubiera sido posible.

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: **la voluntad**”.*

ALBERT EINSTEIN



ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ABREVIATURAS	6
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	7
4. INTRODUCCIÓN	9
5. PERIODONTO	
5.1 Encía	12
5.2 Ligamento periodontal	23
5.3 Cemento radicular	25
5.4 Hueso Alveolar	29
6. ENFERMEDAD PERIODONTAL	32
6.1 Etiología	33
6.2 Biofilm	34
6.3 Colonización de la placa dentobacteriana.	35
6.4 Clasificación de la enfermedad periodontal.	39
6.5 Patogenia de la enfermedad periodontal.	44
6.6 Procesos patogénicos.	45
6.7 Bacterias periodontopatógenas	46
6.8 <i>Agreggatibacter actinomycetemcomitans</i>	47
6.9 <i>Streptococcus sanguis</i>	52
7. RECEPTORES TLRs.	55
8. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN.	58
9. JUSTIFICACIÓN	62
10. HIPÓTESIS	63
11. OBJETIVOS	63
12. MATERIALES Y MÉTODOS	63
13. RESULTADOS	70
14. DISCUSIÓN	82
15. CONCLUSIONES.	85
16. REFERENCIAS HEMEROGRÁFICAS Y BIBLIOGRÁFICAS	86



ÍNDICE DE FIGURAS

Título	Página
<i>Fig 1. Tejidos que conforman el periodonto.....</i>	<i>12</i>
<i>Fig. 2. Anatomía macroscópica de la encía: la encía libre (FG), la encía adherida (AG), Límite cementoadamantino (CEJ), límite mucogingival (MGJ).....</i>	<i>13</i>
<i>Fig. 3. Encía libre o marginal. Esquema de un corte histológico que describe la composición de la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte y sus estructuras.....</i>	<i>13</i>
<i>Fig. 4. Encía Interdentaria.</i>	<i>14</i>
<i>Fig. 5. Microscopia electrónica de un Fibroblasto.....</i>	<i>15</i>
<i>Fig. 6. Mastocito.....</i>	<i>16</i>
<i>Fig.7. Macrófago.....</i>	<i>17</i>
<i>Fig.8. Granulocitos neutrófilos polimorfonucleares.....</i>	<i>18</i>
<i>Fig. 9. Linfocitos T.....</i>	<i>19</i>
<i>Fig. 10. Plasmocito.</i>	<i>20</i>
<i>Fig. 11. Fibras de colágena.....</i>	<i>21</i>
<i>Fig. 12.Fibras de la encía.</i>	<i>22</i>
<i>Fig. 13. Ligamento periodontal.....</i>	<i>23</i>
<i>Fig. 14. Fibras del ligamento periodontal.....</i>	<i>24</i>
<i>Fig. 15. Cemento.....</i>	<i>25</i>
<i>Fig. 16. Cemento acelular.....</i>	<i>27</i>
<i>Fig. 17. Fibras de Sharpey.....</i>	<i>28</i>
<i>Fig. 18. Microscopia que muestra cemento celular.....</i>	<i>28</i>
<i>Fig. 19. Hueso alveolar.....</i>	<i>30</i>
<i>Fig. 20. Ciclo del biofilm.....</i>	<i>35</i>
<i>Fig. 21. Formación de la placa dentobacteriana.....</i>	<i>36</i>
<i>Fig. 22. Placa supragingival.....</i>	<i>37</i>
<i>Fig. 23.Placa subgingival.....</i>	<i>38</i>
<i>Fig. 24. Procesos patogénicos en la enfermedad periodontal.....</i>	<i>46</i>
<i>Fig.25. Proliferación de Aggregatibacter actinomycetemcomitans.....</i>	<i>48</i>
<i>Fig. 26. Factores de virulencia de A. actinomycetemcomitans (A.a).....</i>	<i>50</i>
<i>Fig. 27. Estructura química del lipopolisacárido.....</i>	<i>52</i>
<i>Fig. 28. Esquematización de una bacteria grampositiva y su pared celular.....</i>	<i>53</i>
<i>Fig. 29. Familia de TLRs.....</i>	<i>56</i>
<i>Fig. 30. Activación de los receptores TLRs por sus ligandos y sus mecanismos de señalización.....</i>	<i>57</i>



ÍNDICE DE TABLAS

Título	Página
<i>Tabla 1. Morfotipos bacterianos.....</i>	<i>9</i>
<i>Tabla 2. Tipos de colágena y localización.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 3. Tipo de colágena y estructura.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 4. Clasificación general de la enfermedad periodontal.....</i>	<i>39</i>



1. RESUMEN

La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por bacterias que colonizan el surco gingival y las cuales se fijan a las superficies dentales. Los microorganismos que colonizan la región gingival, supragingival y subgingival forman la placa dentobacteriana también conocida como biofilm. De manera típica, la colonización de la placa dentobacteriana al inicio, está poblada por bacterias facultativas predominantemente Gram-positivas, posteriormente en etapas subsecuentes de maduración, las especies que predominan son bacterias anaerobias estrictas Gram-negativas. Cuando bacterias específicas en la placa dentobacteriana aumentan en número hasta alcanzar cifras relevantes, producen factores de virulencia que exceden el umbral del control del paciente, de tal manera que, el equilibrio va de la salud a la enfermedad¹.

Los fibroblastos gingivales humanos (HGF), son un tipo celular predominante en la estructura de soporte del diente y son responsables de la remodelación de los tejidos de soporte de los mismos, esto se debe a la producción de citocinas inflamatorias inducidas por el ácido lipoteicoico (LTA) ó lipopolisacárido (LPS), componentes de la pared de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas respectivamente^{1,3}. Estudios recientes han reportado que tanto el LTA como el LPS son reconocidos por receptores tipo toll (TLR) 2 y 4 en fibroblastos gingivales humanos^{5,6}.

En este trabajo se determinó el papel del ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguis* (LTA) sobre la activación de mecanismos de transducción de señales intracelulares y su efecto a la respuesta inducida por el lipopolisacárido de *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* (LPS), en fibroblastos gingivales humanos.

Los resultados indican que tanto el ácido lipoteicoico (LTA) de *S. sanguis* como el lipopolisacárido (LPS) de *A. Actinomycetemcomitans* inducen la expresión IL-1B así como de la cicloxigenasa-2 (COX-2). Así mismo se observó que tanto el LTA y LPS promueven la fosforilación de la proteína I κ B⁻, la translocación de NF- κ B al núcleo, y la fosforilación de las cinasas p38 y ERK 1/2.

Por otra parte se encontró que el tratamiento previo con LTA bloquea la expresión de IL-1B, COX-2, así como la fosforilación de I κ B⁻ y la translocación de NF- κ B al núcleo. Con respecto a la fosforilación de las cinasas p38 y ERK 1/2 el LTA también bloquea las acción inducidas por el LPS.

Finalmente el marcaje con [32Pi] muestra que el ácido lipoteicoico induce la fosforilación del receptor tipo Toll 4 (TLR4) en HGF.



Estos resultados indican que el LTA de *S. Sanguis* actúa como un antagonista del LPS y agonista parcial, en fibroblastos gingivales humanos (HGF), por lo que cantidades reducidas de placa dentobacteriana en una persona sana pueden ser toleradas sin causar enfermedad periodontal o gingival, tal vez debido a la función que desempeñan los pobladores iniciales de la placa dentobacteriana como es el caso de *S. sanguis* que ha reportado estar presente de forma importante en sitios con un mayor nivel de inserción, posterior a la terapia periodontal. Reforzando la idea de que probablemente estas especies funcionen como mecanismos de prevención en la colonización bacteriana de la placa dental.



2. ABREVIATURAS

ARN = Ácido ribonucleico.
ADN = Ácido desoxirribonucleico.
CD14m = Proteína CD14 membranal
CD14s = Proteína CD14 soluble
COX-2 = Ciclooxygenasa-2
DMEM = Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco
ERK1/2 = Proteína quinasa activada extracelularmente 1 y 2
FBS = Suero Bovino Fetal.
HGF= Fibroblastos gingivales humanos.
GADPH = Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.
ICAM-1= Molécula de adhesión intercelular –1
IFN- = Interferón gama
IL-1B= Interleucina 1 beta
IL-6 = Interleucina 6
IL-8 = Interleucina 8
IL-10 = Interleucina 10
Ikb- = Proteína inhibidora Kappa B alfa
LBP= Proteína de unión a LPS
LPS= Lipopolisacárido
LTA= Acido lipoteicoico
MAPK= Proteína quinasa activada por mitógeno
MyD88= Proteína 88 de respuesta primaria para la diferenciación mieloide.
NF-κB= Factor nuclear Kappa B
NO = Óxido nítrico.
PAMPs = Patrones moleculares de asociación a patógenos
PBS = Buffer de fosfatos salino.
PI3K = Fosfatidil inositol 3 cinasa
p38= Proteína p38
pp38= Fosfoproteína p38
mRNA = ácido ribonucleico mensajero.
RT-PCR= Transcriptasa reversa- Reacción en cadena de la polimerasa.
SBF= Suero Bovino Fetal
SDS = Dodecil sulfato de sodio
TBST. Buffer salino astringente.
TIR = Receptor homologo de IL-1B
TLR= Receptor tipo Toll
TLR2 = Receptor tipo Toll 2
TLR4 = Receptor tipo Toll 4
TNF- = Factor de Necrosis tumoral alfa



3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.

En decenios recientes, el conocimiento de la etiología de las enfermedades periodontales experimentó avances notables. A mediados del presente siglo se estimaba que todas las especies bacterianas encontradas en la placa dental poseían igual capacidad para causar enfermedad. También, que la periodontitis podía ser el resultado de la exposición acumulada a la placa dental ¹.

La asociación de determinadas especies bacterianas con la enfermedad surgió a principios del decenio de los sesenta, cuando exámenes microscópicos de la placa revelaron la presencia de distintas especies bacterianas en sitios sanos en términos periodontales contra otros con enfermedad del periodonto. Más tarde, en los decenios de los sesenta y setenta, mejoras técnicas en los procedimientos usados para aislar, cultivar e identificar los microorganismos periodontales produjeron refinamientos en la taxonomía bacteriana y aclararon los grupos específicos de gérmenes presentes con las enfermedades del periodonto ^{1,2}.

La gingivitis y la periodontitis, así como otras enfermedades periodontales menos frecuentes, son infecciones bacterianas crónicas. Los microorganismos patógenos pueden influenciar el curso del proceso patológico elaborando sustancias tóxicas para los tejidos, mediante la invasión directa de los tejidos del huésped y por estimulación de una reacción del mismo. Por lo general, los productos y la invasión bacteriana de los tejidos, dañan al huésped, mas la reacción de éste puede ser de protección o destructiva ^{1,3}.

Las investigaciones que cotejan la microbiota vinculada a las enfermedades periodontales con el estado de salud indican que un número discreto de gérmenes parecen operar como patógenos en el proceso mórbido. En general, las principales bacterias relacionadas con las enfermedades periodontales son microorganismos gramnegativos, facultativos, capnófilos o anaerobios. Algunas de las bacterias más frecuentes relacionadas con el transtorno son *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (antes *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Fusobacterim nucleatum* *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola* y especies *Eikenella*, en vista de sus capacidades patógenas y su mayor cantidad en la enfermedad ^{1,2,4}.

El reconocimiento de patrones moleculares de asociación a patógenos (PAMPs) por el sistema inmune innato, puede iniciar un mecanismo de defensa en contra de patógenos invasivos. Los PAMPs se distribuyen en superficies celulares bacterianas (ácidos lipoteicoicos, peptidoglicanos, lipoproteínas y lipopolisacáridos), e intracelularmente (motivos específicos de ARN y ADN derivados de virus y bacterias). Estudios recientes han demostrado que en mamíferos estos patrones moleculares asociados a patógeno como el ácido lipoteicoico y el lipopolisacárido, son reconocidos específicamente por su respectivos receptores tipo toll (TLRs) ^{5,6}.



La destrucción del tejido periodontal puede ser atribuida a la activación producida por monocitos, linfocitos, fibroblastos y otras células del huésped que en forma conjunta con la acción que desencadenan toxinas bacterianas como el lipopolisacárido o el ácido lipoteicoico, activan mecanismos intracelulares que conllevan a la producción de citocinas que dan lugar a la liberación de enzimas responsables de la destrucción de la matriz extracelular y la resorción del hueso alveolar⁷.

Por otra parte, una característica común de todos los organismos, es la capacidad dinámica de coordinar constantemente su actividad en respuesta a los cambios ambientales. Esta función de comunicación celular con el entorno, se lleva a cabo a través de varias vías o cascadas intracelulares de señalización que reciben y procesan señales externas, no solo del entorno extracelular, sino de distintas regiones de una misma célula. Estas cascadas transmiten señales que resultan en la regulación de funciones celulares determinadas. Esta transferencia de información constituye una parte importante del repertorio celular de mecanismos reguladores. Sin embargo, a medida que el número de componentes y cascadas de señalización identificados aumenta, parece obvio que estas vías no constituyen entidades aisladas sino que forman parte red extensa y finamente regulada^{1,2}.

A pesar de que se ha reportado información con respecto a la enfermedad periodontal, los mecanismos moleculares involucrados en el equilibrio salud-enfermedad asociados a la formación de la placa dentobacteriana, aún no están del todo descritos, por lo que en este trabajo de investigación se caracterizaron en fibroblastos gingivales humanos, las vías de transducción de señales intracelulares (p38, ERK 1/2, IKB , NF-kB, IL-1B y COX-2) implicadas en los mecanismos intracelulares, por los cuales el desplazamiento característico de microorganismos grampositivos a gramnegativos que se suceden en la colonización de la placa dentobacteriana, está reflejado en la transición del estado de salud al desarrollo de la enfermedad periodontal. Así como el papel que tiene el receptor TLR4 bajo la acción de LTA.



4. INTRODUCCIÓN

En la enfermedad periodontal, la interacción huésped-bacteria determina la naturaleza y extensión del trastorno resultante. Los patógenos pueden influenciar el curso del proceso patológico elaborando sustancias tóxicas para los tejidos, mediante la invasión directa de los tejidos del huésped y por estimulación de una reacción del huésped. En la gingivitis y periodontitis el desarrollo de la enfermedad depende de una interacción entre la placa dentobacteriana residente y la reacción del huésped a los productos de la misma^{1,3,8}.

La placa dentobacteriana es un depósito blando que forma una biopelícula que se adhiere a la superficie dentaria, contiene aproximadamente 2×10^{11} bacterias, de tal modo que es posible encontrar más de 325 especies bacterianas. De acuerdo a la posición que tiene en la superficie dental se clasifica en supragingival si se localiza en o por arriba del margen de la encía; si esta en contacto directo con el margen gingival recibe la denominación de placa marginal y si se localiza por debajo del margen de la encía y el tejido del surco gingival se denomina subgingival. La placa marginal posee importancia principalmente en la producción de gingivitis, mientras que la placa subgingival vinculada con el tejido es importante en el rasgo de la destrucción del tejido blando en diversas formas de periodontitis^{1,3}. El desarrollo de la formación de la placa dentobacteriana se da por la adherencia de especies Gram-positivas (*Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*) a la película adquirida que cubre al diente, el crecimiento de estas especies provee lo necesario para que colonizadores secundarios (*Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, especies *Capnocytophaga*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, etc) se adhieran^{9, 10}. En esta sucesión ecológica de la placa dentobacteriana hay una transición de un ambiente aerobio precoz caracterizado por especies Gram-positivas facultativas a otro ambiente notablemente escaso en oxígeno donde predominan gérmenes anaerobios Gram-negativos.^{1,2}

Las diferencias entre salud y enfermedad evidencian especies bacterianas. Las bacterias cultivadas a partir de los sitios con salud periodontal consisten predominantemente de bacilos facultativos y cocos. Este grupo de microorganismos decrece de modo proporcional en la gingivitis y la periodontitis. Estas disminuciones se acompañan con incrementos en las proporciones de bacilos Gram-negativos, en la gingivitis, en la periodontitis juvenil localizada y en la periodontitis avanzada¹.

Tabla 1. Morfotipos bacterianos.

Morfotipos bacterianos	Salud periodontal	Gingivitis	Periodontitis.
Bacilos facultativos y cocos	75%	↓44%	↓10-13%
Bacilos Gram-negativos	13%	40%	64-74%



En general, las principales bacterias relacionadas con las enfermedades periodontales son microorganismos gramnegativos, facultativos, capnófilos o anaerobios. Algunas de las bacterias más frecuentes relacionadas con el trastorno son *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (antes *Actinobacillus actinomycetemcomitans* *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola* y *Eikenella* entre otras^{1,2}.

Se plantea que algunas especies bacterianas protegen o benefician al huésped, entre ellas *S. sanguinis*, *Veillonella párvula* y *C. ochracea*. De manera típica se localizan en cantidades altas en sitios periodontales que no muestran pérdida de la inserción, pero lo hacen en cantidades bajas donde hay destrucción activa del periodonto. Estudios clínicos indican que sitios con valores altos de *C. ochracea* y *S. sanguinis* se relacionan con mayor incremento del nivel de inserción luego del tratamiento periodontal¹.

Un componente importante en la pared celular de bacterias Gram-negativas es el lipopolisacárido (LPS). Este activa potentemente a macrófagos induciendo la expresión y secreción de moléculas tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B y metabolitos del ácido araquidónico^{7,11}.

Los mecanismos de transducción del LPS involucran una rápida fosforilación de tirosinas de diversas proteínas y la activación de diversas proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK)¹²⁻¹⁵.

Por otra parte el ácido lipoteicoico presente en bacterias grampositivas actúa promoviendo la expresión de TNF- α , y la fosforilación de p38, JNK y ERK. También se ha observado que induce la producción de IL-6 e IL-10, así como la activación de NF- κ B, induciendo la producción de óxido nítrico (NO) y la activación de PI3K y Akt¹⁶⁻²¹.

Los receptores tipo Toll (TLRs) juegan un papel importante en los mecanismos de defensa ya que son estos los responsables del reconocimiento de patógenos. Hasta la fecha se conocen 11 miembros de esta familia. Todos ellos son proteínas transmembranales tipo I compuestas de un dominio N-terminal extracelular con repeticiones ricas en leucina involucradas en el reconocimiento de los diferentes ligandos, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático muy parecido al dominio TIR (Receptor homólogo de IL-1)²². Se sabe que los macrófagos usan estos receptores para reconocer a los PAMPs (patrones moleculares de asociación a patógenos) que incluyen a componentes de pared bacteriana, tales como lipopolisacárido o ácido lipoteicoico^{23,24}. Estos receptores se expresan en una variedad de tipos celulares, incluyendo células dendríticas, macrófagos, células endoteliales, linfocitos, células epiteliales y fibroblastos²⁵.



El receptor celular que traduce la señal del LPS, es receptor tipo Toll 4 (TLR4). La unión de LPS a TLR4 requiere de proteínas como CD14, LBP y MD-2 en la región externa de la membrana mientras que en la región interna de la misma requiere al factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y TIRAP²⁶. La activación de TLR4 activa mecanismos de vía abajo que resultan en la activación de I κ B, NF κ B, y de las MAPK. A través de dicha activación se produce también TNF- y la activación de PI3K-AKT^{27,28}.

Por otra parte el TLR 2 es considerado como el receptor esencial de lipoproteínas, peptidoglicanos y ácido lipoteicoico, este receptor forma heterodimeros con TLR1 y TLR6. La activación de TLR 2 induce la activación de NF- κ B, PI3K y AKT^{24-27, 30}.

Las células reconocen y responden a los estímulos extracelulares por programas intracelulares específicos de acoplamiento, tales activan cascadas de señalización que activan a proteínas cinasas mitógeno activadas (MAPKs)³¹. Todas las células eucarióticas poseen múltiples vías MAPK, por las cuales coordinadamente regulan diversas actividades celulares tales como la expresión de genes, mitosis, sobrevivencia, apoptosis y diferenciación celular. Proteínas relacionadas a la vía de las MAPK son activadas río abajo por receptores de membrana y regulan la proliferación y diferenciación celular. ERK generalmente se activa por factores de crecimiento y esteroides de forbol. La vía de c-jun-NH2 terminal cinasas (JNKs) y la MAPK p38 (p38 son generalmente activadas por citocinas proinflamatorias o por estrés ambiental conduciéndose a la apoptosis por lo que han sido llamadas proteínas activas por estrés (SAPKs). La vía de la SAPK también contribuyen a múltiples procesos celulares tales como proliferación, diferenciación y sobrevivencia a en respuesta a estímulos extracelulares^{31,32,33}.

El mayor tipo celular en el tejido conectivo periodontal son los fibroblastos gingivales, estos proveen un mecanismo de anclaje para el diente. Hasta hace poco se creía que este tipo celular no tenía implicación inmunológica. Sin embargo recientemente investigaciones reconocieron su papel activo en la defensa del huésped. Bajo la estimulación con patógenos bacterianos, sus productos y citocinas, los fibroblastos gingivales secretan varios mediadores solubles de la inflamación tales como IFN, PGE2, IL-1, IL-6 y IL-8, además regulan la expresión de HLA-DR e ICAM-1^{14,17,21}. Se piensa que los mediadores derivados de estos fibroblastos y los antígenos de superficie son los responsables de jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria periodontal. Recientemente, los fibroblastos gingivales humanos han demostrado expresar TLRs 2, 4 y 9. Es probable que el incremento de mediadores inflamatorios de HGFs en respuesta a estímulos microbianos ocurra vía activación de TLRs³⁴.



5. PERIODONTO

El periodonto (peri = alrededor, odontos = diente) comprende los siguientes tejidos (Fig. 1):

- E) Encía
- LP) Ligamento periodontal.
- C) Cemento radicales.
- HA) Hueso alveolar.

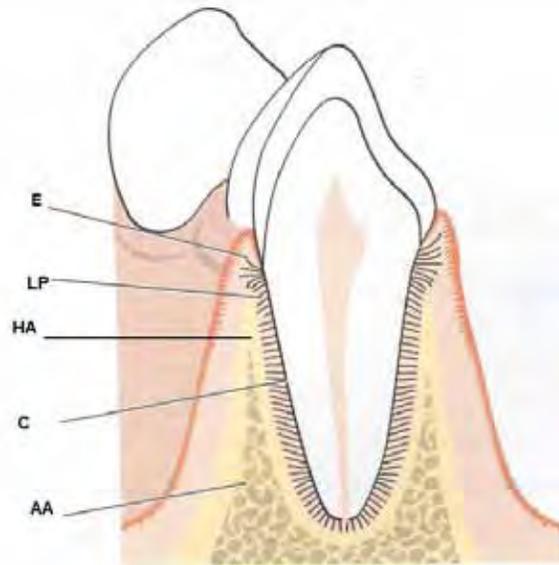


Fig. 1. Tejidos que conforman al periodonto. E: encía, LP: ligamento periodontal, C: cemento radicular y HA: hueso alveolar. El hueso alveolar se divide en HA: Hueso alveolar propiamente dicho y AA: apófisis alveolar. Tomado y modificado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica* Jan Lindhe. (2005)

El periodonto también llamado “aparato de inserción” o “tejido de sostén del diente, establece una unidad funcional, biológica y evolutiva que adquiere su forma y textura finales con la erupción de los dientes, además de experimentar modificaciones con la edad, y sufrir alteraciones morfológicas y funcionales debido al ambiente bucal.^{1,3}

5.1 Encía.

La encía (*en lat. gingiva*) es una fibromucosa formada por tejido conectivo denso con una cubierta de epitelio escamoso queratinizado y es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes.

Anatómicamente la encía está dividida en:

1. La encía libre o marginal.
2. La encía adherida o insertada.
3. La encía interdientaria.



1. Encía libre o marginal. Comprende el tejido gingival y las zonas vestibular y lingual/ palatino de los dientes. En el lado vestibular y lingual de los dientes, la encía libre se extiende desde el margen gingival libre en sentido apical hasta el surco gingival libre que está ubicado en un nivel que se corresponde con el nivel de la unión o límite cemento adamantino y por la parte interna llega hasta el epitelio del surco y el epitelio de unión (Fig. 2)¹.

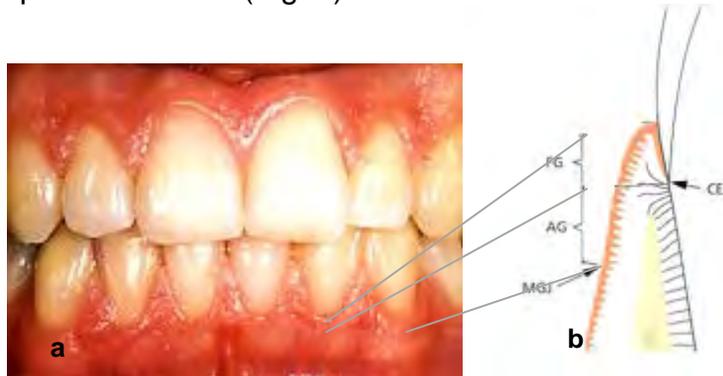


Fig. 2. Anatomía macroscópica de la encía: la encía libre (FG), la encía adherida (AG), límite cemento adamantino (CEJ), límite mucogingival (MGJ). Tomado y modificado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica* Jan Lindhe. (2005). www.coeb.com/saludpublica/perio.htm

El epitelio que recubre la encía libre se diferencia en:

1. Epitelio bucal, el cual mira hacia la cavidad bucal.
2. Epitelio sulcular bucal, que mira hacia el diente sin ponerse en contacto con él.
3. Epitelio de inserción, que permite el contacto entre encía y diente (Fig. 3).

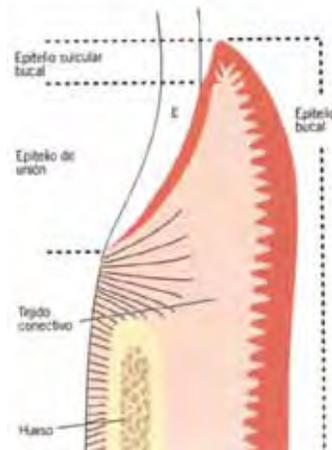


Fig. 3. Encía libre o marginal. Esquema de un corte histológico que describe la composición de la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte y sus estructuras.

Tomado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Jan Lindhe (2005).

2. Encía adherida o insertada. En sentido coronario, está señalada por el surco gingival libre o, cuando ese surco no está presente, por un plano horizontal ubicado en el nivel del límite cemento adamantino. La encía adherida se extiende en dirección apical hacia la unión mucogingival, donde se continúa con la mucosa alveolar.



3. Encía interdientaria (papila interdientaria). Está determinada por las relaciones de contacto entre los dientes la anchura de las superficies dentarias proximales y el curso de la unión cemento-adamantina. En las regiones anteriores de la dentadura, la papila dental tiene forma piramidal, mientras que en las regiones molares las papilas suelen estar más aplastadas en sentido vestibulo-lingual (Fig 4).^{1,3}



Fig. 4. Encía Interdentaria. Las flechas indican la localización de la encía interdientaria. Tomado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Jan Lindhe (2005).

Tejido conectivo.

El tejido predominante de la encía y el ligamento periodontal es el conectivo. Los componentes principales del tejido conectivo son las fibras colágenas (alrededor del 60% (del volumen de tejido conectivo), fibroblastos (alrededor del 5%) vasos, nervios y matriz extracelular (alrededor del 35%). Los tejidos conjuntivos desempeñan las funciones de sostén, relleno, almacenamiento, transporte, defensa y reparación.¹

Los diferentes tipos de células presentes en el tejido conectivo son 1) fibroblastos, 2) mastocitos, 3) macrófagos, 4) granulocitos neutrófilos, 5) linfocitos y 6) plasmocitos.

1) El fibroblasto es la célula del tejido conectivo que más predomina (65% de la población celular total). Es una célula fusiforme o estrellada con núcleo de forma ovalada. El citoplasma contiene un retículo endoplasmático granuloso bien desarrollado con ribosomas. El aparato de Golgi suele tener un tamaño considerable y las mitocondrias son grandes y numerosas. Además, el citoplasma contiene muchos tonofilamentos delgados (Fig. 5).

El fibroblasto está dedicado a la producción de diversos tipos de fibras halladas en el tejido conectivo, como fibras elásticas y colágena, sintetiza también glucoproteínas y glucosaminoglucanos de la sustancia intercelular amorfa. Regulan además la degradación de colágena, e interviene en la síntesis de la matriz de este tejido.¹

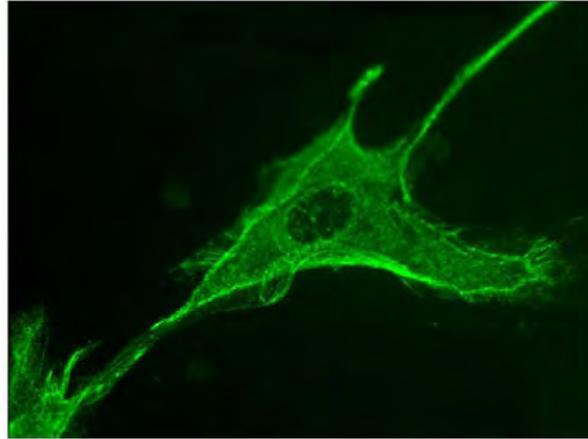


Fig. 5. Microscopía electrónica de un Fibroblasto. Tinción de citoesqueleto mediante marcaje fluorescente.

Tomado de <http://profeblog.es/blog/joseluis/tag/hibernacion-fibroblasto/>

2) Los mastocitos, distribuidos a través del cuerpo, abundan en el tejido conectivo de la mucosa bucal y la encía. Los mastocitos fueron descritos por primera vez por Paul Ehrlich en 1877 y llamados células cebadas o granulares del tejido conectivo por la gran cantidad de vesículas (gránulos). Se encuentran distribuidos extensamente a través del cuerpo en tejido conectivo y en superficies mucosas. Se derivan de células progenitoras de la médula y se dirige a la sangre y posteriormente a los tejidos, donde experimentan la maduración final. La proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la activación de los mastocitos están finamente reguladas. Los mastocitos se han estudiado más extensamente en el contexto de reacciones y de infecciones alérgicas, pero las evidencias actuales muestran evidencia que el mastocito juega un papel importante en la inmunidad innata y adquirida, reparación de tejidos, fibrosis, tumores y enfermedades autoinmunes³⁵

El mastocito produce sustancias vasoactivas, que pueden afectar a la función del sistema microvascular y controlar el flujo de sangre a través del tejido. El citoplasma se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de vesículas de tamaños variables. Estas vesículas contienen sustancias biológicamente activas, como enzimas proteolíticas como la triptasas, quimasas y carboxipeptidasas, contienen también histamina la cual tiene acción vasodilatadora y, aumenta la permeabilidad vascular y la heparina la cual es una sustancia con gran acción anticoagulante³⁵. En el mastocito el aparato de Golgi está bien desarrollado, mientras que son escasas las estructuras reticulares endoplasmáticas granulosas. A lo largo de la periferia de la célula se pueden ver una gran cantidad de pequeñas prolongaciones citoplasmáticas, es decir, microvellosidades (Fig.6).



Fig. 6. Mastocito. Microscopía electrónica de transmisión donde se observa un mastocito (*) en el espacio limitado por las prolongaciones de un macrófago (↑) y numerosas fibrillas de colágeno (◆). Barra: 6µm.

Tomado de http://www.actaodontologica.com/ediciones/2007/2/microvasculatura_vih.asp

3) Los monocitos se produce en la médula pero, bajo la influencia de moléculas quimioatrayentes, emigran a diferentes tejidos del cuerpo en donde se diferencian en macrófagos y otras células del sistema inmune.

Los macrófagos desempeñan los papeles dominantes en la regulación del proceso inmune. Son células implicadas en procesos de reconocimiento y fagocitosis, pero su secreción de mediadores antiinflamatorios o pro-inflamatorios, depende de su propio estado de la activación, por lo cual juegan un papel crucial en la regulación de la actividad del sistema inmune. Las características fenotípicas de macrófago dependen del tejido en el que se diferenciaron y permanecen³⁶.

El núcleo se caracteriza por la cantidad de invaginaciones de variados tamaños. Una zona de condensaciones de cromatina densa aparece a lo largo de la periferia del núcleo. El aparato de Golgi está bien desarrollado hay muchas vesículas de tamaños variados presentes en el citoplasma. A menudo se encuentran restos de material fagocitado en las vesículas lisosómicas denominadas fagosomas. (Fig. 7).

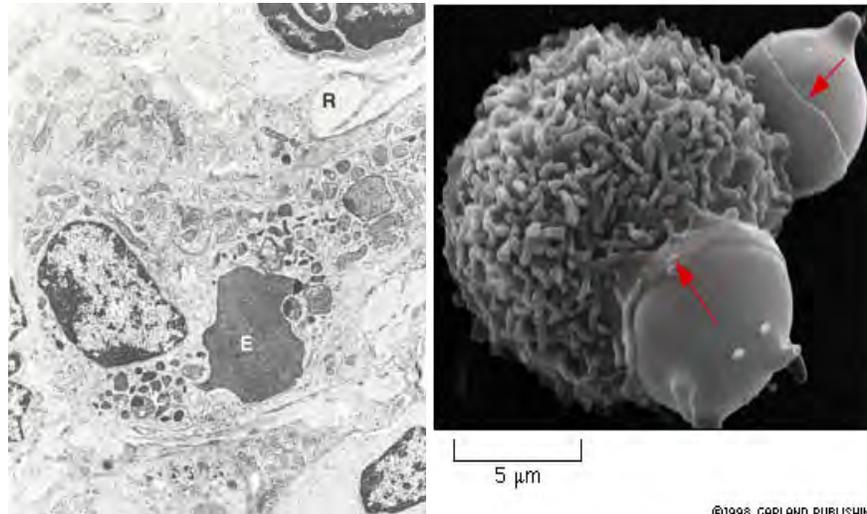


Fig. 7. Macrófago. Del lado izquierdo se muestra un corte histológico en el que un macrófago está fagocitando a una célula sanguínea. Núcleo(N), eritrocito(E), fibras reticulares(R), lisosoma(L) y macrófago(M). Del lado derecho se observa un macrófago fagocitando a células de la sangre. Tomado de http://www.visualhistology.com/Visual_Histology_Atlas/VHA_Chpt3_Connective_Tissue.htm y http://www.zoology.ubc.ca/~berger/B200sample/unit_9_secretion/endocytosis.htm

4). Los granulocitos neutrófilos polimorfonucleares, tiene un aspecto característico. El núcleo es lobulado y en el citoplasma se encuentran numerosos lisosomas, que contienen enzimas lisosómicas. (Fig 8)

Estos glóbulos blancos son abundantes, en una proporción que va desde el 55% al 75% del total. Son considerados las células más importantes de la respuesta inmune del hospedero contra el ataque bacteriano. Los mecanismos de acción de estas células consisten en diferentes pasos: reconocimiento, rodamiento, adherencia primaria a la pared vascular, adherencia firme para la activación del endotelio en la región inflamada, transmigración a través del endotelio, quimiotaxis, contacto con la bacteria, la fagocitosis y finalmente liberación de enzimas hidrolíticas y/o por la producción de sustancias tóxicas tales como radicales libres. Cada uno de estos pasos es controlado por interacciones entre las células y muchos componentes del sistema inmune o mediadores inflamatorios. Estas interacciones generan las señales específicas, importantes para la regulación de la célula. En infecciones periodontales, PMNs del tejido gingival emigra hacia bacterias de la placa dental a lo largo de un gradiente quimiotáctico de los factores específicos producidos por las células del epitelio. Tal gradiente es esencial para conducir PMNs con tráfico molecular³⁷.

Entre varios mediadores inflamatorios, las quimocinas incluyendo IL-8, MIP-2, y KC son los más críticos para tal reclutamiento de los PMNs. Los PMNs se han considerado como células efectoras que matan a bacterias o destruyen tejidos afectados principalmente con la producción de la especie reactiva del oxígeno. Estudios recientes, sin embargo, revelaran que los PMNs están implicados en la producción de quimocinas en respuesta a una variedad de estimulantes incluyendo los LPS, TNF-alfa, e IFN-gamma, de tal modo contribuyen a la



modulación de la respuesta inmune. Estas funciones también son reguladas por los selectinas durante la infiltración en varios sitios³⁸.

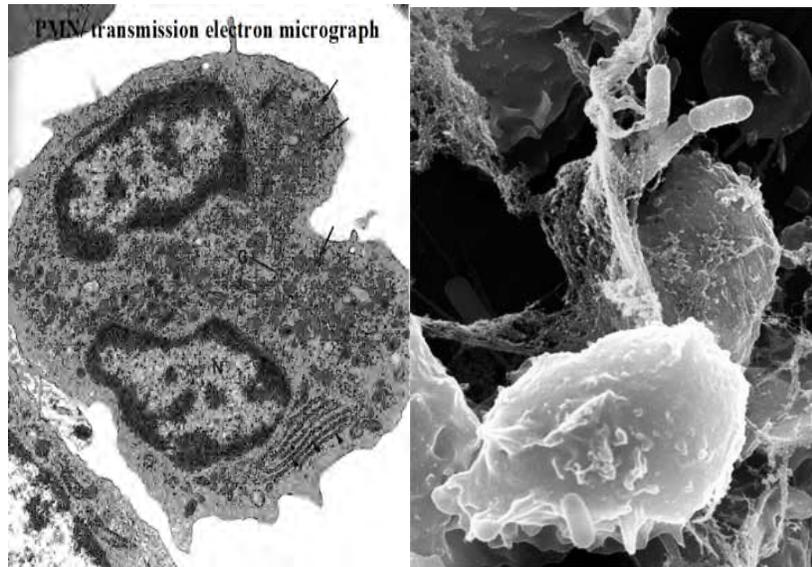


Fig.8. Granulocitos neutrófilos polimorfonucleares. En esta imagen en el lado izquierdo se muestra una micrografía de transmisión electrónica donde se muestra los núcleos del PMN (N) y múltiples gránulos(G). La imagen de la derecha muestra a un PMN fagocitando a una bacteria *shigella* (Imagen del Dr. Volker Brinkmann, Instituto de infecciones biológicas).

Tomado de http://missinglink.ucsf.edu/lm/IDS_101_histo_resource/blood_cells.htm
<http://www.chronicprostatitis.com/inflamm.html>

5). Los linfocitos se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros y se dividen en dos grandes grupos, linfocitos B y linfocitos T, según que estos progenitores linfoides maduren en la médula ósea (B) o en el timo (T), respectivamente. Los linfocitos B están especializados en la producción de anticuerpos. Los linfocitos T son responsables de las respuestas inmunes mediadas por células, así como de funciones de cooperación para que se desarrollen todas las formas de respuestas inmunes, incluida la respuesta de anticuerpos por los linfocitos B. Son las células responsables de las respuestas inmunitarias. Aparte este sistema utiliza sistemas de vigilancia sofisticados para mantener la integridad multicelular del hospedero. El desarrollo central de la respuesta adaptativa es la activación e los linfocitos T y B los cuales al contacto de antígenos experimentan cambios significativos en los estadios de migración y distribución en órganos linfoides secundarios, fenómeno que es controlado en gran parte la sensibilidad a ciertas quimocinas³⁹.

Las subpoblaciones de linfocitos, de las que existen más de 130, se pueden diferenciar por lo que, genéricamente, se denominan antígenos de diferenciación de leucocitos humanos y se designan como CD (*cluster of differentiation*; el término cluster hace referencia al grupo de anticuerpos monoclonales que los detectan).



Los linfocitos se caracterizan por presentar un núcleo esférico que contiene zonas localizadas de cromatina densa electrónicamente. El estrecho borde de citoplasma que rodea al núcleo contiene numerosos ribosomas libres, unas pocas mitocondrias y, en áreas localizadas, un retículo endoplasmático con ribosomas fijos. En el citoplasma también hay lisosomas. (Fig. 9)

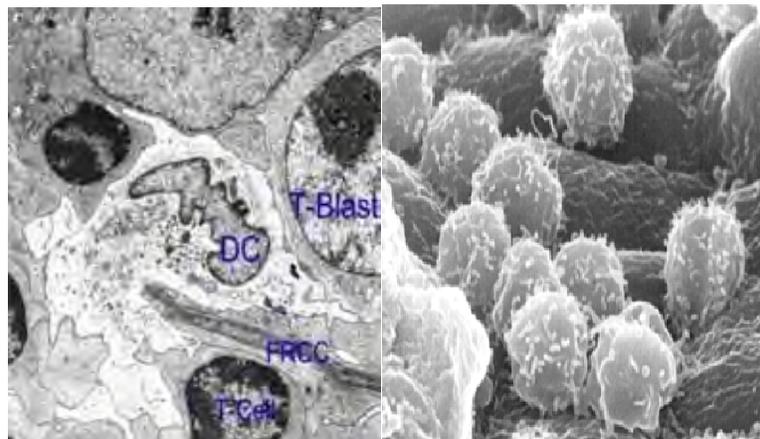


Fig. 9. Linfocitos T. Del lado izquierdo se muestra un corte histológico donde se observa linfocito T (Células T), y célula dendrítica (DC). Del lado derecho se observa una microscopia electrónica que muestra un grupo de linfocitos en la periferia de un vaso endotelial.

Tomado de http://www.geocities.com/artscience/Lymphocyte_Homing/index.html

6). Plasmocitos. Cuando los linfocitos B maduros, ayudados o no por los linfocitos T se ponen contacto con antígenos. Estos se activan, proliferan, y diferencian a los plasmocitos, células del centro germinal y células de memoria⁴⁰. Los plasmocitos forman anticuerpos o inmunoglobulinas contra el antígeno. Los plasmocitos contienen un núcleo esférico ubicado excéntricamente con cromatina densa electrónica desplegada radialmente. El retículo endoplasmático con numerosos ribosomas aparece distribuido aleatoriamente en el citoplasma. Además, el citoplasma contiene numerosas mitocondrias y un aparato de Golgi bien desarrollado (Fig. 10).



Fig. 10. Plasmocito. Micrografía por microscopía electrónica de transmisión de un plasmocito. Se observa un núcleo con material de heterocromatina y euromatina, el citoplasma y las prolongaciones.

Tomado de <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/francais/bindegewebe/kurspraep/EM/f-plasmazelle.php>

Las fibras del tejido conectivo son producidas por los fibroblastos y se les puede dividir en: a) fibras colágenas, b) fibras de reticulina, c) fibras oxitalánicas, y d) fibras elásticas.

a) Las fibras colágenas predominan en el tejido conectivo y constituyen los componentes más esenciales del periodonto (Fig. 11). La unidad menor, la molécula colágena, suele ser conocida como tropocolágena. Una molécula de tropocolágena se compone de tres cadenas de polipéptidos entrelazadas para formar una hélice. La síntesis del tropocolágena se realiza dentro del fibroblasto, desde el cual la molécula será secretada hacia el espacio extracelular.^{1,3}

Tabla 2. Tipos de colágena y localización.

Colágena I (mas abundante)	Abundante en huesos, piel, tendón, etc
Colágena II (menos abundante)	En cartílago
Colágena III	En fibras de reticulina
Colágena IV	En laminas basales (no fibrilar)
Colágena V	Asoc. a células (no siempre fibrilar)
Colágena VII	Fibras de anclaje

Las cadenas alfa pueden ser de dos tipos, alfa I o alfa II, y según su disposición varia el tipo de colágeno.

Tabla 3. Tipo de colágena y estructura.

Tipo de colágeno	Disposición de cadenas alfa
Colágeno I	A1(I)2 A2 (I)
Colágeno II	A1 (II)3



Colágena III	A1 (III)3
Colágena IV	A1 (VI)3 ó A1 (IV)2 A2 (IV) afibrilar
Colágena V	A1 (V)3
Colágena VII	A1 (VII)3

b) Las fibras de reticulina están también formadas por tropocolagena, aun así la fibra reticular es más delgada que la fibra colágena y posee mayor cantidad de hidratos de carbono. Las fibras de reticulina son numerosas en el tejido adyacente a la membrana basal. Sin embargo, también aparecen fibras de reticulina en grandes cantidades en el tejido conectivo laxo que rodea a los vasos sanguíneos. De tal modo, las fibras de reticulina están presentes en las interfases de los tejidos epitelio-conectivo y endotelio-conectivo.

c) Las fibras oxitalánicas están presentes en la encía y en el ligamento periodontal y parecen estar compuestas por fibrillas finas y largas con un diámetro "de aproximadamente 150 A. Están dispuestas en forma axial, insertándose por un extremo en el hueso o cemento y terminando a menudo en la pared de un vaso sanguíneo. Estas fibras son más abundantes en el apoce, donde forman una red y en aquellas zonas del ligamento sometidas a mayores esfuerzos. Estas fibras también llamadas pre-elásticas están constituidas por microfibrillas y por material amorfo. Se cree le dan soporte a los vasos sanguíneos.

d) En el tejido conectivo de la encía y del ligamento periodontal sólo hay fibras elásticas en asociación con los vasos sanguíneos. Sin embargo, son numerosas en el tejido conectivo de la mucosa alveolar (tapizante). La encía en visión coronal del límite mucogingival no contiene fibras elásticas^{1,3}.



Fig. 11. Fibras de colágena. En púrpura una cadena de tropocolagena, la unión de tres de ellas forman colágena. En amarillo fibras de elastina.

Tomado de <http://www.anatomytrains.com/explore/galleries/show/id/56?page=4>

Aunque muchas de las fibras colágenas en la encía y el ligamento periodontal están distribuidas irregular o aleatoriamente, la mayoría tienden a estar dispuestas



en grupos de haces con una clara orientación. De acuerdo con su inserción y curso dentro del tejido, los haces orientados en la encía pueden dividirse en los siguientes grupos:

- Fibras circulares (CF), que son haces de fibras que siguen un curso dentro de la encía libre y rodean al diente como un manguito o anillo.
- Fibras dentogingivales (DGF), que están incluidas en el cemento de la porción supraalveolar de la raíz se proyectan desde el cemento con a configuración de abanico hacia el tejido gingival libre de las superficies facial, lingual e interproximales.
- Fibras dentoperiósticas (DPF), que están incluidas en la misma porción del cemento que las fibras dentogingivales, pero siguen un curso apical sobre la cresta ósea vestibular y lingual y terminan en el tejido de la encía adherida. En el área limítrofe entre la encía libre y la adherida, el epitelio carece a menudo del sostén subyacente de haces de fibras colágenas orientadas. En esta zona es donde suele estar presente el surco gingival libre (GG).
- Fibras transeptales (TF), se extienden entre el cemento supra-alveolar de dientes vecinos. Las fibras transeptales corren a través del tabique interdentario y están incluidas en el cemento de dientes adyacentes. Las fibras transeptales también conectan el cemento supra-alveolar con la cresta del hueso alveolar (Fig. 12)

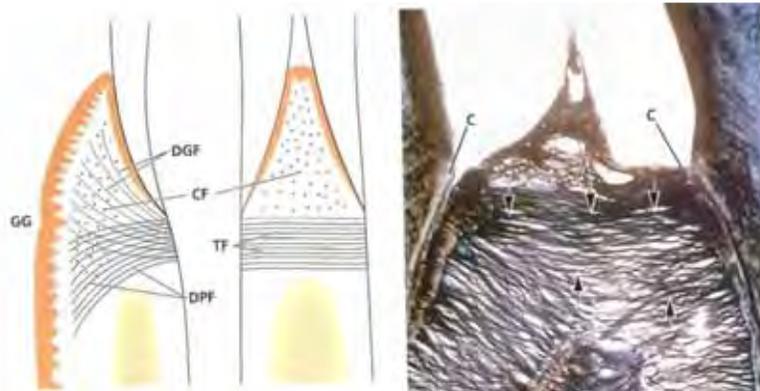


Fig 12. Fibras de la encía. Esquema y de un corte histológico en el que se muestran las fibras de encía. Los significados de cada una de las abreviaturas se describen en el texto. Tomado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Jan Lindhe, Thorkild Karting.

Los cuatro grupos de haces de fibras colágenas refuerzan la papila interdentaria y proveen la resistencia y el tono que son necesarios para mantener su forma arquitectónica y la integridad de la adherencia dentogingival.



5.2. Ligamento periodontal.

El ligamento periodontal es el tejido conectivo blando, muy vascularizado y celular que rodea los dientes y une el cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar propio. En sentido coronario, el ligamento periodontal se continúa con la lámina propia de la encía y está separado de ésta por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta del hueso alveolar con la raíz (fibras de la cresta alveolar)^{1,3}. (Fig. 13)

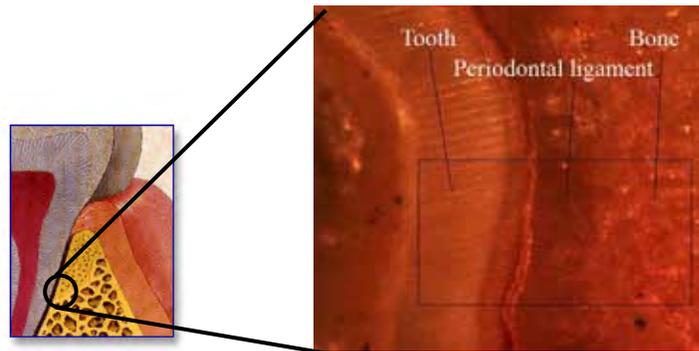


Fig. 13. Ligamento periodontal. Esquema y fotografía en el que se observa la región del ligamento periodontal y estructuras que lo rodean. Se indica la zona del hueso (Bone) y del diente (Tooth) en el ligamento periodontal.

Tomado de http://www.zimmerdental.com/rg_bmTissueRegen.aspx y <http://www.tc.umn.edu/~seong001/research.html>

Composición del ligamento periodontal

El ligamento periodontal y el cemento radicular se desarrollan a partir del tejido conectivo laxo (el folículo) que rodea al germen dentario.

El ligamento periodontal está compuesto por fibras principales divididas en 5 grupos, fibras oxitalánicas y plexos de fibras indiferentes. Las células del ligamento periodontal son: fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos, así como también células epiteliales y células nerviosas. Se observan también pequeños racimos de células epiteliales en el ligamento periodontal. Estas células, llamadas "restos epiteliales de Mallassez", representan restos de la vaina epitelial de Hertwig^{1,3,10}.

El ligamento periodontal se comunica por conductos vasculares (conductos de Volkmann) en el hueso alveolar propio con los espacios medulares del hueso alveolar. El espacio del ligamento periodontal tiene la forma de un reloj de arena, más estrecho a nivel radicular medio. El ligamento periodontal se ubica entre el hueso alveolar propio y el cemento radicular¹.



El diente está unido al hueso por haces de fibras colágenas que pueden ser divididas en los siguientes grupos principales:

1. Fibras de la cresta alveolar (ACF). Van del cemento que se encuentra justo debajo del epitelio a la cresta alveolar. Sus funciones son prevenir la extrusión y resistir los movimientos laterales.
2. Fibras horizontales (HF). Se insertan en el cemento y corren por todo el eje longitudinal del diente hasta fijarse al hueso alveolar
3. Fibras oblicuas (OF). Es el grupo de mayor número. Se insertan en el cemento y se dirigen en dirección coronal oblicua al hueso. Su función es resistir las fuerzas verticales de la masticación transformándolas en tensión que absorberá el hueso.
4. Fibras apicales (APF). Surgen del cemento de la zona del foramen apical y se insertan en el hueso.
5. Fibras Interradiculares. Se despliegan en abanico desde el cemento a la zona de la furca de dientes multirradiculares (Fig. 14)

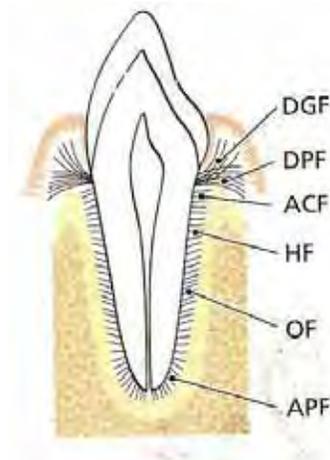


Fig. 14. Fibras del ligamento periodontal. Los significados de cada una de las abreviaturas se describen en el texto.

Tomado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Jan Lindhe, Thorkild Karting. (2005)

Funciones del ligamento periodontal.

1. Sirve para proteger los conductos sanguíneos y nervios de posibles daños por las fuerzas mecánicas.
2. Transmiten las fuerzas oclusales hacia el hueso.
3. Adhieren el diente al hueso.
4. Mantienen los tejidos gingivales en relación con los dientes.
5. Resisten el impacto de las fuerzas oclusales.

Las funciones del ligamento periodontal se dividen en: físicas, formativas y remodelamiento, nutricionales y sensoriales.



Funciones formativas y de remodelación: las células del ligamento periodontal participan en la formación y resorción del cemento y hueso en situaciones de movimiento fisiológico de los dientes y participan también en la adaptación del periodonto a fuerzas oclusales^{1,3}.

El ligamento periodontal se encuentra bajo constante remodelación. Los fibroblastos forman fibras de colágeno, y las células mesenquimales residuales se desarrollan en osteoblastos y cementoblastos.

Funciones sensoriales y de nutrición: el ligamento periodontal le confiere drenaje linfático y riego de nutrientes al cemento, hueso y la encía. El ligamento periodontal se encuentra inervado con fibras sensoriales capaces de transmitir tacto, presión y dolor mediante las ramificaciones del trigémino¹.

5.3 Cemento radicular

El cemento del diente es un hueso es un tejido mineralizado especializado secretado por cementoblastos en la superficie de la dentina radicular y en las coronas de algunos a animales. La formación del cemento comienza cuando las células epiteliales de la vaina epitelial de Hertwig y las células mesenquimales del folículo dental próximas a la formación de la raíz radicular⁴¹. (Fig 15)

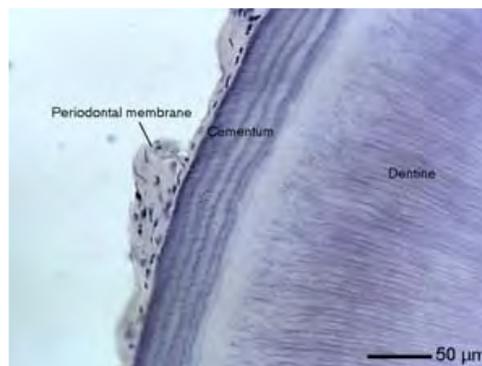


Fig. 15. Cemento. En un corte histológico de un diente se puede observar el cemento que cubre a la dentina. Se muestra la membrana periodontal, cemento y dentina.

Tomado de <http://www.bio.usyd.edu.au/staff/wardle/students/anja/anja.htm>

Composición del cemento.

El cemento tiene muchos rasgos en común con el tejido óseo. Como otros tejidos mineralizados, consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica. Su contenido mineral, principalmente hidroxipatita, es de alrededor del 65% en peso, poco más que el hueso (60%).

El cemento está formado por células y por una matriz extracelular calcificada. Las células principales del cemento son los cementocitos y los cementoblastos. Los cementoblastos se encargan de sintetizar tropocolágena que formara las



fibras colágenas extrínsecas y los proteoglicanos o glucosaminoglucanos que formaran la matriz extracelular⁴².

Los cementocitos (células negras) residen en lagunas del cemento celular. Se comunican entre sí por una red de prolongaciones citoplasmáticas que corren por los canalículos del cemento. Los cementocitos, asimismo, mediante prolongaciones citoplasmáticas, se comunican con los cementoblastos de la superficie. La presencia de los cementocitos permite el transporte de nutrientes a través del cemento y contribuye al mantenimiento de la vitalidad de este tejido mineralizado.

La matriz de cemento y hueso son compuestos biológicos consistentes en agua (32%), minerales (46-50%), y material orgánico (22%) como proteínas colágenas y no colágenas, factores de crecimiento y citocinas. Los componentes minerales consisten principalmente en cristales de hidroxapatita, carbonato de calcio, sodio, potasio hierro, fluoruro, etc.

La matriz esta compuesta principalmente por colágena tipo I la cual tiene una función estructural, morfogénico y de andamio para la formación de cristales en la mineralización, constituye el 90% del total de colágena que esta incluida en esta matriz, mientras que la colágena tipo III con capas de fibras de colágena tipo I constituyen el 5% de la matriz. El cemento contiene dos importantes proteínas no colágenas, sialoproteína ósea y osteopontina. Estas proteínas las cuales son expresadas en fibras extrínsecas de cemento acelular y cemento acelular afibrilar, permanecen unidas a la matriz colágena y ellas poseen propiedades de unión celular a través de una secuencia de arginina-glicina-asparagina. Otras proteínas son fibronectina, osteonectina, osteocalcina y laminina, además de varios polipéptidos que son factores de crecimiento con la habilidad de promover la proliferación y diferenciación de cementoblastos⁴³.

Funciones del cemento.

El cemento en seres humanos consiste en varios tipos que se diferencian a partir uno otro con respecto a la localización, a la estructura, a la función, al índice de formación, a la composición bioquímica proporcional, y al grado de mineralización. Una de las funciones más importantes del cemento es invertir y anclar fibras periodontales principales del ligamento, que atraviesan como a red entre la raíz y el hueso alveolar, a la raíz. Otras funciones del cemento incluyen la participación en mantenimiento de la relación oclusal (adaptación), reparación de los defectos de raíz después de la resorción o de la fractura, y protección de la pulpa⁴⁴.

También controla el ancho del espacio periodontal, permitiendo la orientación de las fibras periodontales y conserva la inserción de dichas fibras durante el movimiento dentario y compensa el desgaste del diente por atrición⁴².

Se reconocen dos tipos distintos de cemento:



1. Cemento primario o cemento acelular, que se forma conjuntamente con la raíz y la erupción dentaria.

Este cemento primario acelular no contiene células y se forma simultáneamente a la dentina radicular y en presencia de la vaina epitelial de Hertwig. En cierto momento de la formación dentaria, la vaina epitelial de Hertwig, que tapiza, la pre dentina recién formada, se quiebra y sus células epiteliales migran al tejido conectivo laxo lateral al germen dentario. Los fibroblastos del tejido conectivo laxo ocupan el área vecina a la pre dentina y producen una capa de fibrillas colágenas orientadas aleatoriamente que hacen contacto, sin penetración, con la dentina recién formada. Los fibroblastos se diferencian como cementoblastos y permanecen en la superficie del cementoide, que es el precursor del cemento.

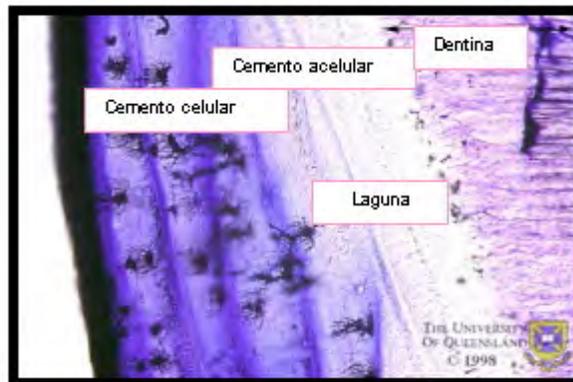


Fig. 16. Cemento acelular. Imagen histológica del cemento dentario, donde se puede apreciar el cemento celular, el cemento acelular y las lagunas en las que quedan atrapados los cementoblastos.

Tomadode http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_22.htm

Las partes de las fibras principales que se insertan en el cemento radicular y hueso alveolar se denominan fibras de Sharpey. Una parte importante del cemento acelular está constituida por haces de fibras de Sharpey que se mineralizan y éstas suelen partir de cerca del límite cemento adamantino. (Fig. 16) En el cemento acelular tienen un diámetro menor y están apretadas más densamente que las del hueso alveolar. Durante la formación continua de cemento acelular, en porciones de las fibras del ligamento periodontal (fibras principales) adyacentes a la raíz van quedando incluidos cristales minerales, es decir, se mineralizan. De tal modo, las fibras de Sharpey en el cemento deben ser consideradas como una continuación directa de las fibras colágenas (fibras principales) del ligamento periodontal y del tejido conectivo supraalveolar. Las fibras de Sharpey forman el llamado sistema fibroso extrínseco del cemento y son producidas por los fibroblastos del ligamento periodontal. El sistema fibroso intrínseco es producido por los cementoblastos y está integrado por fibras orientadas más o menos paralelamente al eje longitudinal de la raíz.(Fig. 17)

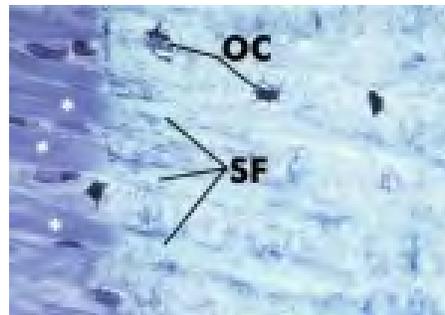


Fig. 17. Fibras de Sharpey. Corte histológico en el que se observan SF: Fibras de Sharpey y OC: osteocitos.

Tomado de <http://www.fosjc.unesp.br/periodontia/F-Ligamento3.htm>

Generalmente, el cemento acelular está más mineralizado que el cemento celular. El cemento acelular a menudo contiene líneas de alimento que reflejan los períodos alternantes de formación de cemento y de inactividad.

2. Cemento secundario o cemento celular, que se forma después de la erupción dentaria y en respuesta a las exigencias funcionales. Sin embargo, sobre la superficie radicular pueden alternar áreas de cemento acelular y celular.

El cemento secundario o cemento celular que, a diferencia del cemento primario, contiene células, se deposita sobre el primario a lo largo del período funcional del diente. Ambos cementos son producidos por cementoblastos que cubren la superficie radicular. Algunas de estas células se incorporan al cementoide, que posteriormente se mineraliza para formar el cemento. Estas células que quedan incorporadas al cemento son denominadas cementocitos. El cemento celular se presenta sólo en la parte intralveolar de la raíz. Algunas veces, solamente se mineraliza la periferia de las fibras de Sharpey del cemento celular y queda sin mineralizar el corazón de la fibra por lo que en el cemento celular, las fibras de Sharpey muestran un núcleo central no mineralizado^{1,3}. (Fig 18)



Fig. 18. Cemento celular. Cementocitos en sus lagunas que se comunican entre sí indicados con las flechas.

Tomado de www.carlosboveda.com/englishsite/dentalquest.htm



En contraste con el hueso, el cemento no contiene nervios ni vasos sanguíneos o linfáticos. El cemento no tiene períodos alternantes de reabsorción y aposición, pero aumenta su espesor durante toda la vida mediante el depósito de sucesivas capas nuevas. Durante este proceso de aposición gradual, la porción precisa de las fibras principales, que se ubica adyacente a la superficie radicular, se va mineralizando. La mineralización se produce por el depósito de cristales de hidroxiapatita, primero dentro de las fibras colágenas, después sobre la superficie fibrosa y, finalmente, en la matriz interfibrilar^{1,3}.

Existe una clasificación del cemento basada en su composición y su disposición³².
Clasificación de Schoroede:

Cemento afibrilar acelular (AAC): no contiene células extrínsecas ni intrínsecas de colágeno. Es producto de los cementoblastos y se encuentra en la parte más coronal con un espesor de 1 a 15 μ m.

Cemento acelular de fibras extrínsecas (AEFC): se compone casi por completo de paquetes que se componen de fibras de Sharpey y carece de células. Es producto de los fibroblastos y cementoblastos y se encuentra en el tercio cervical de las raíces extendiéndose hasta apical. Su grosor es de 30 a 230 μ m.

Cemento estratificado celular mezclado (CMSC): está compuesto por fibras extrínsecas (Sharpey) y fibras intrínsecas, puede contener células. Es un producto de fibroblastos y cementoblastos y aparece principalmente en el tercio apical de las raíces, ápices y furca. Su espesor es de 100 a 1000 μ m.

Cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC): contiene células pero no fibras extrínsecas de colágeno. Es formado por los cementoblastos y rellenan las lagunas producidas por la resorción.

El cemento intermedio está cerca de la unión cementodentinaria. Contiene remanentes celulares de la vaina de Hertwig embebidas en una sustancia calcificada. *carranza periodontología clínica*.

5.4 Hueso alveolar.

La parte de los maxilares que alberga y protege a los dientes es conocida como hueso alveolar. Un límite arbitrario a nivel de los vértices de las raíces de los dientes, separa las apófisis de los alveolares del cuerpo de los maxilares. El hueso alveolar depende, para su existencia y desarrollo, de la presencia de los dientes. Cuando existe una ausencia congénita de éstos el desarrollo del hueso alveolar es escaso⁴⁵. (Fig 19)

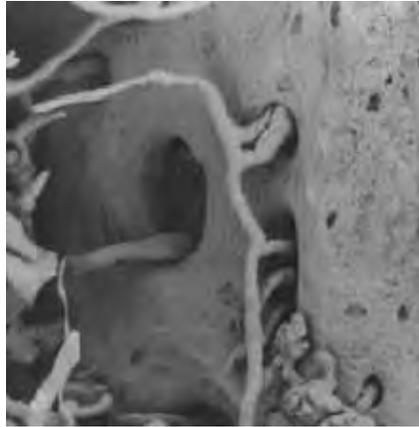


Fig. 19. Hueso alveolar. Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido que muestra la superficie del hueso alveolar en donde destacan los vasos que nutren al hueso.

Tomado de [http://www.forp.usp.br/bdj/bdj12\(3\)/trab4123/t04123.html](http://www.forp.usp.br/bdj/bdj12(3)/trab4123/t04123.html)

La apófisis alveolar, o proceso alveolar, puede ser definida como aquella parte de los maxilares, superior e inferior, que forma y sostiene los alveolos de los dientes. Las paredes de los alveolos están tapizadas por hueso compacto y el área entre los alveolos, incluida la pared ósea compacta está ocupada por hueso esponjoso. Este ocupa la mayor parte de los tabiques interdentarios, pero sólo una porción relativamente pequeña de las láminas vestibular y palatina.

El hueso esponjoso contiene trabéculas óseas, cuya arquitectura y tamaño están en parte determinados genéticamente y en parte son el resultado de las fuerzas a las cuales están expuestos los dientes durante la función.

El hueso que recubre las paredes de los alvéolos se continua con frecuencia con el hueso compacto o cortical de lingual y vestibular de la apófisis alveolar.

La capa de hueso en la cual se insertan las fibras de Sharpey se denomina "hueso fasciculado" (hueso alveolar propio) y constituye la superficie interna de la pared ósea del alveolo. Así, desde un punto -de vista funcional y estructural, este "hueso fasciculado" tiene muchos rasgos en común con la capa de cemento de las superficies radiculares.

Composición del hueso alveolar.

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado. Alrededor del 60% de su peso fresco es materia inorgánica, un 25 % corresponde a material orgánico y un 15 % a agua. En relación al volumen esas proporciones son del 36%, 36% y 28% respectivamente. La parte mineral corresponde principalmente a hidroxapatita que se encuentra en forma de cristales o de finas láminas de 8 nm de grosor y de longitud variable. Alrededor del 90% corresponde a colágena tipo I sin embargo existen pequeñas cantidades de otras proteínas como osteocalcina, osteonectina, osteopontina y proteoglicanos⁹.



Las unidades estructurales básicas del hueso cortical son los osteonas (o sistema haversiano), estructuras cilíndricas longitudinalmente orientadas construidas alrededor de los conductos vasculares (haversianos), Las osteonas son de dos tipos primarios, formadas durante el desarrollo y secundarios, formados después del remodelado del hueso, estos últimos revelan una clara pauta de laminillas.

Las trabéculas del hueso esponjoso también están constituidas por unidades óseas estructurales, paquetes, pegados entre sí por líneas de cemento, lo cual refleja períodos más tempranos del crecimiento o recambio óseo.

Todas las áreas de formación ósea activa en la superficie externa del hueso están tapizadas por el endostio, que tiene muchos rasgos en común con el periostio de la superficie externa del hueso.

Los osteoblastos formadores de hueso o en reposo, incluidos los odontoclastos, que son células multinucleares que participan en la reabsorción ósea, están presentes en las siguientes áreas:

1. En la superficie de las trabéculas óseas del hueso esponjoso.
2. En la superficie externa del hueso cortical que conforma los maxilares.
3. En las paredes alveolares del lado del ligamento periodontal.
4. En la porción interna del hueso cortical del lado de los espacios medulares.

Durante el proceso de maduración y mineralización del osteoide, parte de los osteoblastos quedan atrapados en el osteoide, estas células presentes en el osteoide y, después, en el tejido óseo mineralizado, se denominan osteocitos.

Los osteocitos del hueso mineralizado se comunican, por medio de canaliculos o conductillos, con los osteoblastos en la superficie del hueso. Por otra parte los osteocitos en lagunas óseas, se comunican entre sí y con los osteoblastos supra adyacentes mediante las prolongaciones citoplasmáticas que corren por los canaliculos. El sistema resultante canalicular-lacunar esencial para el metabolismo celular al permitir la difusión de los nutrientes y de los productos de desecho. Es muy grande la superficie entre los osteocitos con sus prolongaciones citoplasmáticas por un lado y la matriz mineralizada por el otro. Esta enorme superficie de intercambio actúa como reguladora, para los niveles de calcio y de fosfato sérico por medio de los mecanismos de control hormonal.

La nutrición del hueso está asegurada por la incorporación de vasos sanguíneos al tejido óseo. Éstos, rodeados por laminillas óseas, constituyen el centro de un osteón. El conducto central recibe el nombre de conducto de Havers. Los vasos sanguíneos de los conductos haversianos están conectados entre sí por anastomosis que corren por los conductos de Volkmann¹.

Función del hueso alveolar.

La apófisis alveolar se desarrolla conjuntamente con el desarrollo y erupción de los dientes y se reabsorbe gradualmente cuando los dientes se pierden. Dicho



proceso óseo está formado en parte por células del folículo dentario (hueso alveolar propio) y por células que son independientes del desarrollo dentario. Junto con el cemento radicular y con el ligamento periodontal, el hueso alveolar constituye el aparato de inserción de los dientes, cuya función principal es distribuir y reabsorber las fuerzas generadas, por ejemplo, por la masticación y por otros contactos dentarios.

El hueso alveolar está en continua renovación en respuesta a las demandas funcionales. Los dientes erupcionan y migran en dirección mesial, durante toda la vida, para compensar la atrición. Ese movimiento de los dientes implica un remodelado del hueso alveolar. Durante el proceso de remodelado, las trabéculas óseas están siendo continuamente reabsorbidas y reformadas y la masa ósea cortical se disuelve y es remplazada por hueso nuevo. Durante la degradación del hueso cortical, se forman conductos de reabsorción para los vasos sanguíneos proliferantes. Esos conductos, que en su centro contienen un vaso sanguíneo, se llenan posteriormente con hueso nuevo por la formación de laminillas dispuestas en capas concéntricas en torno del vaso¹.

La reabsorción del hueso está vinculada siempre a los osteoclastos. Éstas son células gigantes especializadas en la degradación de la matriz mineralizada (hueso, dentina, cemento). La osteólisis es un proceso, celular activo ejercido por los osteoclastos os osteoclastos activos en la reabsorción se adhieren a la superficie del hueso y crean concavidades lagunares denominadas lagunas de Howship.

El osteoclasto reabsorbe por igual las sustancias orgánicas e inorgánicas. La reabsorción se produce por liberación de sustancias ácidas (ácido láctico, etc.), que forman un medio ácido en el cual las sales minerales del tejido óseo comienzan a disolverse. Las sustancias orgánicas restantes serán eliminadas por enzimas y fagocitosis osteoclástica¹.

Tanto el hueso cortical como el esponjoso experimentan continuamente un remodelado (es decir, reabsorción seguida de neoformación), en respuesta al desplazamiento de los dientes y a los cambios en las fuerzas funcionales que actúan sobre los dientes¹.

6. ENFERMEDAD PERIODONTAL

Las enfermedades periodontales son los desórdenes complejos que se han asociado a factores de riesgo múltiples. Los desordenes son activados por la acumulación de la placa dentobacteriana, y los signos clínicos son causa del resultados de la respuesta inflamatoria e inmune.

La destrucción del tejido que define a la periodontitis se ha ligado a la producción excesiva de moléculas proinflamatorias incluyendo metaloproteinasas de la matriz, interleukin-1 beta y la prostaglandina E2⁴⁶. Los factores de riesgo importantes para el periodontitis se pueden agrupar en cuatro categorías: microbiano, sistémico, del



comportamiento y local. Estos factores de riesgo se pueden considerar modificables o no modificable. Controlar los factores de riesgo es importante en el desarrollo de enfermedades crónicas y es una estrategia válida para controlar enfermedades periodontales⁸.

6.1 Etiología.

En los últimos años las opiniones sobre la etiología de la periodontitis han variado mucho. Antaño las bacterias eran consideradas como el único factor determinante. Ciertos microorganismos patógenos fueron relacionados con diversas formas de enfermedades periodontales, así como con la velocidad de su evolución. Sin embargo, la existencia y distribución de bacterias patógenas no siempre se correlacionaba con la aparición y la progresión de la periodontitis. De este modo se pudo demostrar también que las bacterias patógenas en una bolsa no han de ser necesariamente la causa de ésta, sino que el medio de la bolsa ofrece condiciones favorables para el desarrollo y la vida de gérmenes patógenos que, eso sí, pueden estar implicados -en el sentido de un círculo vicioso- en la progresión de la enfermedad¹⁰.

Así pues, continúa vigente el principio: «sin bacterias no hay periodontitis», pero por otra parte también es cierto que las bacterias, incluso las periodontopatógenas, no tienen por qué causar necesariamente una periodontitis.

Además de microorganismos específicos, diversos factores del huésped son determinantes para la evolución de una periodontitis a partir de una gingivitis previa. Entre estos factores se encuentran las respuestas inmunitarias desencadenadas por patógenos y cuyos rasgos fundamentales son bien conocidos. Estas reacciones defensivas pueden ser desproporcionadas (excesivas o deficientes).

No obstante, actualmente se mencionan, además de la reacción inmunitaria determinada genéticamente, gran cantidad de otros factores (de riesgo) individuales responsables de la aparición, la intensidad de la gravedad, y la velocidad de evolución de una periodontitis.

De entre los factores de riesgo, son pocos los que dañan directamente el periodonto, como el tabaquismo, ya que más bien influyen negativamente en el sistema inmunitario. Se altera así sensiblemente el equilibrio de «ataque/desencadenamiento del proceso patológico» (bacterias) y defensa (respuesta del huésped). Lógicamente, las formas de periodontitis más graves, precoces y agresivas aparecen cuando bacterias fuertemente patógenas se encuentran con una respuesta débil (deficiente) del huésped⁴⁸.

La enfermedad periodontal iniciada por la acumulación de la placa dentobacteriana cercana al margen gingival y la cual se extiende dentro de la región subgingival. La placa dental es un biofilm que produce una respuesta



inflamatoria en el tejido, que conduce al incremento de la salida de fluidos de pequeños vasos (capilares) y la movilización de celular inflamatorias agudas (neutrófilos) de la vasculatura en los tejidos y por ultimo en el surco gingival. En etapas tempranas, el epitelio sulcular inicia con una envaginación y esto evidencia los cambios celulares y morfológicos en el tejido conectivo. Cierta cantidad de colágena se pierde en el tejido conectivo y células del sistema inmune (linfocitos) y neutrófilos empiezan a acumularse en el área debajo de epitelio sulcular. En esta etapa, la lesión todavía se define como gingivitis y tiene muestras clásicas de la inflamación, incluyendo el color rojo, edema y el dolor cuando se sondea el tejido. Puesto que no hay cambios en la posición del epitelio de unión o en el hueso subyacente, la periodontitis no está presente. Los mecanismos que son responsables del cambio de gingivitis a periodontitis es caracterizada por un dramático incremento en el número de neutrófilos y células inflamatorias crónicas (macrófagos). Estas células se reclutan en los tejidos como resultado de la unión de bacterias y señalización derivada del hospedero (factores quimiotácticos) que promueven la movilización celular y aumento de la expresión de las moléculas de la adhesión en la células endoteliales. Mientras se incrementen la producción de las moléculas proinflamatorias (citocinas) se puede detectar localmente en el fluido crevicular^{1,3}.

La transición de la inflamación gingival a la enfermedad periodontal destructiva parece ser accionada por la desregulación de la respuesta del huésped, que conduce a una respuesta inflamatoria exagerada. Los macrófagos y otras células constitutivas del periodonto (por ejemplo, fibroblastos) producen enzimas que degradan el tejido conectivo (metaloproteinasas de la matriz). La destrucción del hueso en enfermedad periodontal es mediada sobre todo por el citocina interleukin-1 beta y la prostaglandina E2 metabolitos del ácido araquidónico. Es importante acentuar que la activación de neutrófilos, macrófagos y de células del componente es debido a los efectos de la microflora compleja que abarcan el biofilm subgingival. Además de inducir una inmunorespuesta y el reclutamiento de células inflamatorias en los tejidos, los componentes microbianos tales como lipopolisacárido (de microorganismos gramnegativos) y el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico (ambos de microorganismos grampositivos) pueden estimular la pérdida de la continuidad del tejido que da lugar a la pérdida de tejidos suaves y duros que soportan la dentición⁸.

6.2 Biofilm

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que trabajan juntas y que se desarrollan en una superficie inerte o bien en un tejido vivo. Estas comunidades representan un alto orden de estructura y función que se encuentra cuando las bacterias se crecen tradicionalmente en cultivos. Las comunidades de biofilm son responsables de mucha de la actividad biológica atribuida a las bacterias en la amplia gama de los hospederos ocupados por estos microorganismos bioquímicos complejos⁴⁷. (Fig. 20)



Se adhieren por medio de matrices extracelulares generalmente constituidas por exopolisacáridos. No es difícil encontrar biofilms en la naturaleza estos pueden estar formados por diversos microorganismos (de igual o diferente género) y representan formas de organización supracelulares que les confieren propiedades especiales para su supervivencia, sobre todo cuando las condiciones del medio son hostiles⁴⁸.

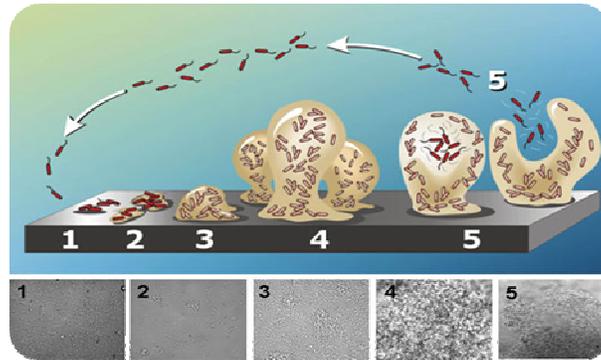


Fig. 20. Ciclo del biofilm. 1. Células individuales se adhieren a una superficie; 2. Sustancia polimérica extracelular es producida y la unión es irreversible; 3 y 4. La arquitectura del biofilm se desarrolla y madura; 5. Células se desprenden del biofilm. En la parte superior se muestra el esquema del proceso de formación del biofilm y en la parte inferior evolución del biofilm visto por fotomicrografía. Tomado de http://www.sterilex.com/biofilm/the_science.asp

Son varios los tipos de infecciones causadas por biofilms. Podemos destacar las siguientes: endocarditis bacteriana, otitis media, prostatitis crónica, fibrosis quística, y en el ámbito de la cavidad oral, la caries y la periodontitis⁴⁹⁻⁵³. El tratamiento de este tipo de infecciones requiere abordaje por medios físicos, antimicrobianos y ecológicos. También se han descrito infecciones en diversos tipos de prótesis: en prótesis totalmente implantadas, como las prótesis valvulares; prótesis parcialmente implantadas, como catéteres endovenosos; y en prótesis no implantadas, como los catéteres urinarios, lentes de contacto y dispositivos intrauterinos. La invasión de estas prótesis por los biofilms obliga a largos tratamientos de combinaciones de antibióticos o incluso a la eliminación de las mismas^{49,53}.

6.3 Colonización de la placa dentobacteriana (biofilm bucal).

Formación de la película dental. La producción de la película dental en la superficie de un diente es la etapa inicial del desarrollo de la placa. Todas las áreas de la boca, entre ellas todas las superficies hísticas así como las dentales y las de restauraciones fijas y removibles, están cubiertas con una película de glicoproteína. Esta proviene de elementos salivales y del líquido del surco, así como de los desechos y productos bacterianos y de las células de los tejidos del huésped.



Las películas operan como barreras de protección, proporcionando lubricación a las superficies e impidiendo la desecación del tejido. Sin embargo, también aportan un sustrato al cual se fijan las bacterias en el ambiente. Dado que las células del tejido epitelial se desprenden de manera continua, la población bacteriana de las superficies hísticas sufre desorganización continua. En comparación, la película presente en las superficies duras que no se desprenden aporta un sustrato donde se acumulan progresivamente las bacterias para formar la placa dental^{1,9}.

Placa supragingival. Se detecta a simple vista cuando alcanza cierto grosor, es amarilla o blanquecina y tiene mayor grosor a lo largo del tercio gingival del diente y áreas interproximales¹.

Su formación inicia con la aposición al esmalte de la película adquirida, la cual es una cubierta heterogénea que se establece por la adsorción selectiva de proteínas y glucoproteínas salivales a la hidroxiapatita. A los pocos minutos de haberse establecido la película adquirida inicia la colonización bacteriana. Las bacterias iniciales que colonizan la superficie dentaria cubierta con la película son de modo predominante microorganismos Gram-positivos como *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguis*. Estos precursores se adhieren a la película mediante moléculas específicas, denominadas adhesinas, presentes en la superficie bacteriana que interactúan con receptores en la película dental. Por ejemplo, las células de *A. viscosus* poseen estructuras proteínicas fibrosas llamadas fimbrias que se extienden a partir de la superficie de la célula bacteriana. Adhesinas proteínicas en las fimbrias se fijan de manera específica a proteínas ricas en prolina que se encuentran en la película dental. Esto causa la fijación de la célula bacteriana a la superficie dental cubierta por la película³. (Fig 21)

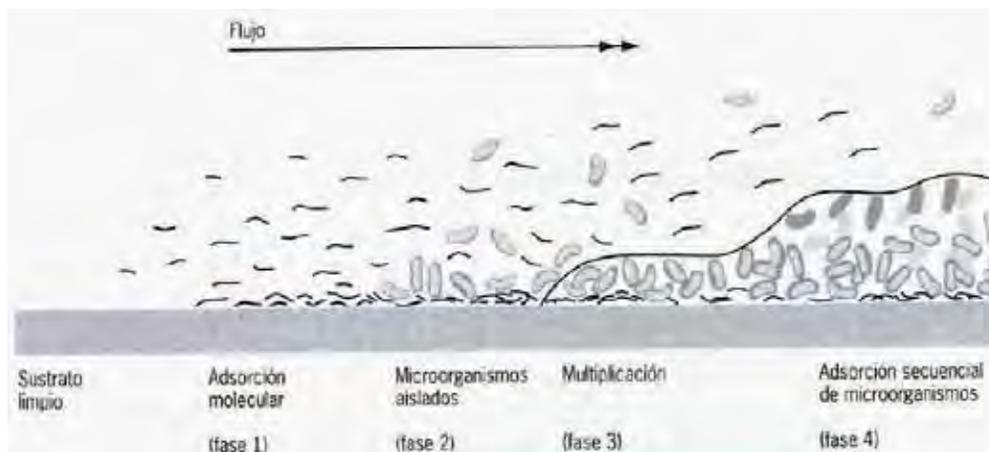


Fig. 21. Formación de la placa dentobacteriana. Etapas en la formación de biopelícula sobre una superficie limpia, dura y no descamante. Fase 1: Adsorción molecular para favorecer la formación de la biopelícula. Fase 2 Adhesión bacteriana, Fase 3: Desarrollo de la matriz extracelular y multiplicación bacteriana. Fase 4: Adsorción secuencial de más bacterias para formar biopelícula más compleja y madura.

Tomado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Jan Lindhe (2005).



En esta sucesión ecológica de la biopelícula hay transición de un ambiente aerobio precoz caracterizado por especies Gram-positivas facultativas a otro notablemente escaso en oxígeno donde predominan gérmenes anaerobios Gram-negativos.

Colonización secundaria y maduración de la placa. Los precursores secundarios son los microorganismos que no colonizaran en un principio superficies dentales limpias, entre ellos *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, especies *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. Dichos gérmenes se adhieren a las células de bacterias ya presentes en la masa de la placa. Extensos estudios de laboratorio documentan la capacidad de diferentes especies y géneros de microorganismos de la placa para adherirse entre sí, en el proceso conocido como coagregación. Este fenómeno sucede de forma primaria mediante la interacción estereoquímica muy específica de moléculas de proteínas y carbohidratos localizados en las superficies de la célula bacteriana, además de interacciones menos específicas resultantes de fuerzas hidrófobas, electrostáticas y de Van der Waals³.

De manera típica, la placa supragingival muestra una organización estratificada de los morfotipos bacterianos. Los cocos Gram-positivos y los bacilos cortos predominan en la superficie dental, en tanto que los filamentos y los bacilos Gram-negativos, así como las espiroquetas, lo hacen en la superficie externa de la masa de la placa madura. Interacciones muy específicas de una célula con otra también son evidentes a partir de las estructuras tipo "mazorca" observadas a menudo. Las formaciones tipo "mazorca" aparecen entre células bacterianas con forma de bastoncillo (p.ej., *Bacterionema matruchotii* o *F. nucleatum*) que constituyen el centro interno de la estructura, y células cóccicas (p.ej., estreptococos y *P. gingivalis*) que se fijan a lo largo de la superficie de las células con forma de bastoncillo^{1,3,9}. (Fig. 22)

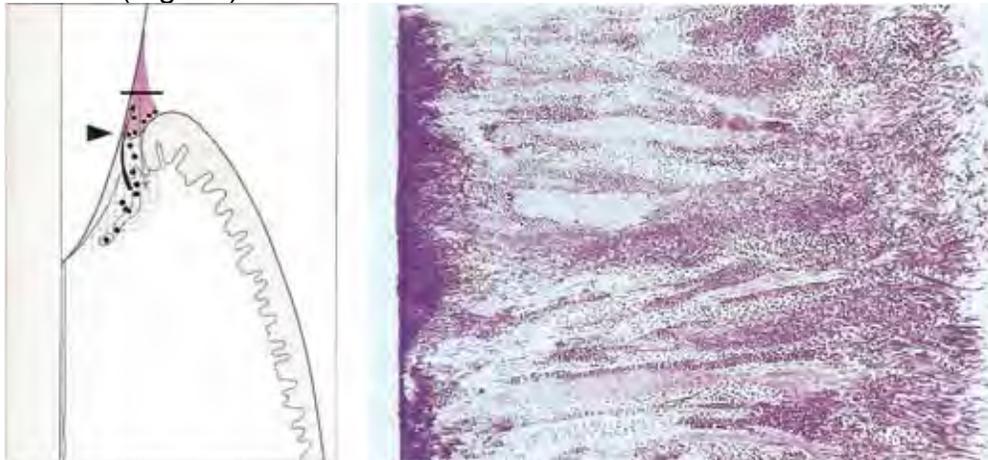


Fig. 22. Placa supragingival. Esquema y microfotografía que muestran la localización y estructura de la placa supragingival de una semana. La flecha en negro indica el surco gingival donde se forma la placa supragingival.

Tomado de Periodoncia. Herbert F. Wolf-Edith M. & Klaus H. Rateitschak. (2005)



Placa Subgingival. Los parámetros ambientales de la región subgingival difieren de aquéllos de la zona supragingival. La circulación de líquido del surco baña al surco gingival o la bolsa. Dicha secreción muchas sustancias que las bacterias pueden usar como nutrientes. Es factible que células inflamatorias y mediadores del huésped tengan una influencia considerable sobre el establecimiento y crecimiento de las bacterias en tal región. Estudios morfológicos y microbiológicos de la placa subgingival revelan distinciones entre las zonas de la placa subgingival vinculadas con el diente y los tejidos^{1,3}.

La placa subgingival es delgada, contenida dentro del surco gingival o bolsa periodontal por lo que resulta difícil su estudio *in situ*. (Fig. 23). En las porciones más próximas al esmalte va a estar influenciada directamente por la placa supragingival, por lo que su composición es muy similar a ésta, con cocos Gram-positivos anaerobios facultativos. La placa no adherida al diente puede estar adherida al epitelio o estar flotante. Las bacterias de la placa flotante comprenden: bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, especies de *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia buccalis* y *Seimonas*. La placa adherida al epitelio esta provista por bacterias que tienen la capacidad de adhesión por medio de fimbrias, como *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogénica*, *Capnocytophaga*, *Seimonas* y *Fusobacterium*^{9, 54-57}.

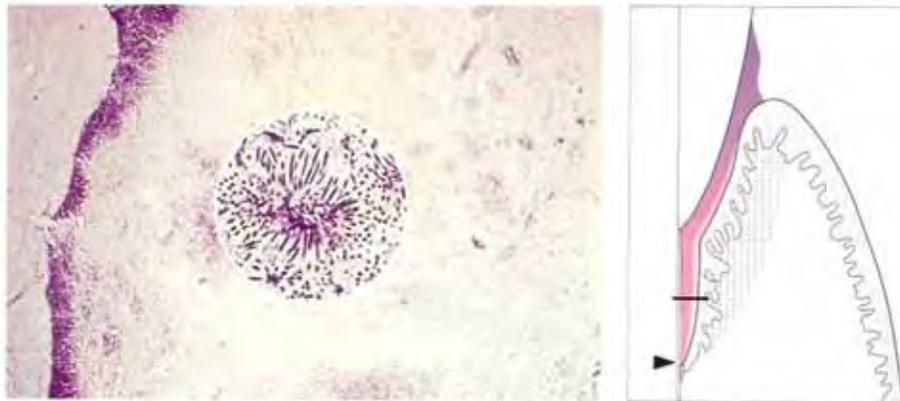


Fig. 23. Placa subgingival. Microfotografía que muestra la flora subgingival de la bolsa periodontal y esquema que indica su localización. La flecha indica la zona de localización de la placa subgingival en el surco gingival.

Tomado de *Periodoncia*. Herbert F. Wolf-Edith M. & Klaus H. Rateitschak. (2005).

Una transición fisiológica en la placa en desarrollo semeja a la transición de gérmenes grampositivos a gramnegativos que se registra en la estructura de la placa dental. Los precursores primarios (p.ej., estreptococos y actinomyces) utilizan oxígeno y abaten el potencial reducción-oxidación del ambiente, que favorece entonces el crecimiento de las especies anaerobias. Las especies grampositivas utilizan azúcares como fuente de energía y saliva como fuente de carbono. Las bacterias predominantes en la placa madura son anaerobias, asacarolíticas y usan aminoácidos y péptidos pequeños como fuentes de energía.



El huésped también funciona como fuente importante de nutrientes. Por ejemplo, las enzimas bacterianas que degradan proteínas del huésped provocan liberación de amoníaco que las bacterias podrían usar como fuente de nitrógeno. El hierro proveniente de la descomposición de la hemoglobina del huésped puede ser relevante en el metabolismo de *P. gingivalis*. Incrementos en las hormonas esteroideas se vinculan con aumentos importantes en las proporciones de *P. intermedia* presente en la placa subgingival. En consecuencia, hay interacciones fisiológicas de diferentes microorganismos en la placa así como entre gérmenes del huésped y la placa. Dichas interdependencias nutricionales pueden ser críticas para el crecimiento y la supervivencia de microorganismos de la placa dental. En parte podrían explicar las interacciones estructurales bastante específicas observadas entre las bacterias presentes en la placa^{1,9}.

6.4 Clasificación de la enfermedad periodontal.

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

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica, destructiva, supurativa e inflamatoria de los tejidos de soporte del diente, se define como la migración del epitelio de unión hacia apical de la unión cemento-esmalte. Clínicamente puede observarse inflamación de la encía dependiendo de las bolsas periodontales, migración apical del epitelio de unión y exposición del cemento radicular al medio ambiente oral, además el diente presenta movilidad, debido a la pérdida del ligamento parodontal. La velocidad de la progresión de esta enfermedad varía considerablemente.^{1,3}

La Academia Americana de Periodoncia AAP, a finales de 1999 en la ciudad de Oak Brook, Illinois, 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. Es importante que esta clasificación se adopte ya que podemos globalizar el conocimiento.

Tabla 4. Clasificación general de la enfermedad periodontal.

I. Enfermedades gingivales.

A. Enfermedades gingivales inducidas por Placa Dental.

1. Gingivitis asociada con Placa Dental únicamente.

- a. Sin otros factores locales asociados.
- b. Con otros factores locales asociados.



2. Enfermedad Gingival Modificada por Factores Sistémicos.

a. Asociada con el Sistema Endocrino.

- 1) Gingivitis Asociada con la Pubertad.
- 2) Gingivitis Asociada con el Ciclo Menstrual.
- 3) Gingivitis Asociada con el Embarazo.
 - a) Gingivitis.
 - b) Granuloma Piógeno.
- 4) Gingivitis asociada a Diabetes mellitus

b. Asociada con Discrasias Sanguíneas

- 1) Gingivitis Asociada con Leucemia.
- 2) Otros

3. Enfermedades Gingivales Modificadas por Medicamentos.

a. Enfermedad Gingival Influenciada por Drogas.

- 1) Agrandamientos Gingivales Influenciados por Drogas.
- 2) Gingivitis Influenciada por Drogas.
 - a) Gingivitis Asociada a Anticonceptivos Orales.
 - b) Otras.

4. Enfermedad Gingival Modificada por Malnutrición

- a. Gingivitis Asociada a Deficiencia de Ácido Ascórbico
- b. Otras.

B. Lesiones Gingivales No Inducidas por Placa

1. Enfermedad Gingival de Origen Bacteriano Específico

- a. Lesiones Asociadas con *Neisseria Gonorrhoeae*
- b. Lesiones asociadas con *Traponema Pallidum*
- c. Lesiones Asociadas a Especies Streptocócicas.
- d. Otros.

2. Enfermedades Gingivales de Origen Viral.

a. Infecciones por el Herpes Virus.

- 1) Gingivoestomatitis Herpética Primaria.
- 2) Herpes Oral Recurrente.
- 3) Infecciones por Varicela Zoster.

b. Otras.



3. Enfermedades de origen Fúngico.

- a. Infecciones por Especies de Cándida.
- b. Eritema Gingival Lineal.
- c. Histoplasmosis.
- d. Otras.

4. Lesiones Gingivales de Origen Genético.

- a. Fibromatosis Gingivales Hereditarias.
- b. Otras.

5. Manifestaciones Gingivales de Condiciones Sistémicas.

a. Desórdenes mucocutáneos.

- 1) Liquen Plano
- 2) Penfigoide.
- 3) Pénfigo Vulgar.
- 4) Eritema Multiforme.
- 5) Lupus Eritematoso.
- 6) Inducidas por Drogas.
- 7) Otras.

b. Reacciones alérgicas.

1) Reacciones a los materiales dentales de restauración.

- a) Mercurio
- b) Níquel.
- c) Acrílico.
- d) Otros.

2) Reacciones atribuidas a

- a) Cremas Dentales.
- b) Enjuagues Dentales.
- c) Aditivos de Gomas de Mascar.
- d) Aditivos de los Alimentos.

3) Otras.

6. Lesiones Traumáticas

- a. Lesiones Químicas.
- b. Lesiones Físicas.
- c. Lesiones Térmicas.

II. Periodontitis crónica.



- A. Localizada.
- B. Generalizada.

III. Periodontitis Agresiva.

- A. Localizada.
- B. Generalizada.

IV. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas.

A. Asociada con Desórdenes Hematológicos

1. Neutropenia Adquirida
2. Leucemia.
3. Otros.

B. Asociados con desórdenes genéticos.

1. Neutropenia Cíclica Familiar.
2. Síndrome de Down.
3. Síndromes de Deficiencia de Adhesión Leucocitaria.
4. Síndrome Papillon-Lefèvre.
5. Síndrome de Chediak-Higashi.
6. Histiocitosis.
7. Enfermedad de Almacenamiento de Glicógeno
8. Agranulocitosis Genética Infantil.
9. Síndrome de Cohen.
10. Síndrome de Ehlers-Danlos.
11. Hipofosfatasa.
12. Otros.

C. Otros no específicos.

V. Enfermedades Periodontales Necrotizante.

- A. Gingivitis Ulceronecrotizante.
- B. Periodontitis Ulceronecrotizante.

VI. Absceso Periodontal.

- A. Absceso gingival.
- B. Absceso Periodontal.
- C. Absceso Pericoronal.

VII. Periodontitis Asociada con Lesiones Endodónticas.

A. Lesiones Combinadas Endo-Periodontales.

VIII. Condiciones o deformidades del desarrollo o adquiridas.

- A. Factores Localizados Relacionados a los Dientes que Modifican o Predisponen a la Enfermedad Gingival Inducida por Placa o Periodontitis.



-
1. Factores Anatómicos Dentales.
 2. Aparatos y Restauraciones Dentales.
 3. Fracturas Radiculares.
 4. Reabsorción radicular cervical y Lágrimas de Cemento.

B. Condiciones y Deformidades Mucogingivales Adyacentes a los Dientes.

1. Resesión de los Tejidos Gingivales Blandos
 - a. Superficies Lingual o Vestibular.
 - b. Interproximal (Papilar)
2. Ausencia de Encía Oueratinizada.
3. Profundidad Vestibular Disminuida.
4. Posición Aberrante de Músculos/Frenillo.
5. Exceso Gingival.
 - a. Seudobolsas.
 - b. Margen Gingival Inconsistente.
 - c. Gran exceso Gingival.
 - d. Agrandamiento Gingival.
6. Color Anormal.

C. Condiciones y deformidades Mucogingivales en Rebordes Edentulos.

1. Deficiencia de Reborde Horizontal y/o Vertical.
2. Ausencia de Tejido Oueratinizado/Encía.
3. Agrandamiento de Tejido Blando/Gingival.
4. Posición Aberrante de músculos/Frenillo.
5. Profundidad Vestibular Disminuida.
6. Color Anormal.

D. Trauma Oclusal.

1. Trauma Oclusal Primario
2. Trauma Oclusal secundario.



6.5 Patogenia de la enfermedad periodontal.

La acumulación de placa microbiana en la superficie dentaria adyacente a los tejidos gingivales pone a las células epiteliales sulculares bucales y de inserción en contacto con los productos de desecho, enzimas y componentes superficiales de las bacterias colonizantes. Al aumentar la carga bacteriana, aumenta la irritación de los tejidos del huésped por estas sustancias. Las sustancias microbianas estimulan a las células epiteliales para que produzcan citoquinas proinflamatorias y otros mediadores químicos de la inflamación. Estos mediadores inician en el seno de los tejidos una respuesta inflamatoria que corresponde a la respuesta inflamatoria clásica^{1,3,9}.

Se produce una tumefacción de los tejidos al acumularse líquido y se genera la gingivitis clínica. En las primeras etapas, los neutrófilos (leucocitos polimorfo nucleares o PMN) predominan debido a la movilidad y flexibilidad de estas células y a los efectos de las moléculas de adhesión sobre los vasos sanguíneos a los que preferentemente se unen los PMN en las etapas iniciales de la inflamación. Además se genera un gradiente quimiotáctico desde la hendidura hacia el tejido conectivo, y de esa forma, los PMN son atraídos hacia la hendidura gingival. Los factores quimiotácticos son proteínas y péptidos como la muy potente formil metionil leucil fenilalanina (FMLP) y factores quimiotácticos del huésped, como las quimioquinas (particularmente, IL-8), moléculas producidas por neutrófilos, como leucotrieno B₄, y moléculas derivadas del desencadenamiento del sistema del complemento (C5a)^{1,3,9}.

De esta manera, los PMN son atraídos a la zona junto con otros leucocitos, como monocitos, macrófagos y linfocitos. Los macrófagos son probablemente el único tipo de célula aparte del neutrófilo que tiene una función útil en la hendidura, es decir, que pueden fagocitar PMN muertos y agonizantes y así retirarlos de la zona. Esto es muy útil para el huésped, pues los PMN agonizantes o sobreactivados son capaces de degranular, es decir, liberar sus enzimas de una manera descontrolada, con lo cual causan más daño e irritación a los tejidos del huésped y una exacerbación posterior de la inflamación. Por lo tanto, la función de limpieza del macrófago es útil para bajar la inflamación. La otra función principal de esta célula, es decir, el papel de presentación del antígeno, no es operativo en la hendidura puesto que no puede regresar a los tejidos y linfáticos del huésped, donde completaría esa función. Esto nos lleva a la conclusión de que el papel de los macrófagos de presentación de los antígenos y las funciones inmunitarias de los linfocitos T y B tienen lugar dentro del tejido conectivo. Estas células inmunitarias pueden ser ancladas a los tejidos por la capacidad de las moléculas de adhesión como la CD44 para que puedan funcionar allí y no se pierdan en la hendidura. Estas moléculas aumentan en número durante la inflamación por diversas citoquinas proinflamatorias producidas por una variedad de células. No es sorprendente que los leucocitos que necesitan permanecer en el tejido conectivo para desempeñar sus funciones posean grandes cantidades de estas moléculas de adhesión a los tejidos, mientras que células como los PMN, que funcionan en



estrecha proximidad con los microorganismos, tengan menos moléculas de adhesión^{1,3,9}.

6.6 Proceso patogénico

Los microorganismos producen la gran variedad de enzimas solubles con el fin de digerir las proteínas extracelulares del huésped. Entre las enzimas liberadas por las bacterias hay proteasas capaces de digerir colágeno, elastina, fibronectina, fibrina y otros componentes de la matriz intercelular de los tejidos epitelial y conectivo. Una proteasa que ha suscitado mucha atención es la Arg-1 proteasa (otros nombres dados a esta molécula son gingivaína y gingipaína), producida por *P. gingivalis*, la cual tiene gran potencia y capacidad para inducir una fuerte respuesta inmunitaria humoral.

Aunque los microorganismos pueden producir múltiples proteasas, la principal actividad de las enzimas en la hendidura gingival procede del huésped y, por tanto: deben mencionarse las proteasas del huésped en el contexto de las proteasas microbianas. Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) de los neutrófilos y células tipo fibroblastos están activas en la hendidura gingival. Los fragmentos de colágeno predominantes hallados en la hendidura son los resultantes de la acción de la proteasa microbiana más que de la del huésped y esto destaca la contribución del huésped a la actividad proteasa crevicular^{1,3}.

El efecto de los productos estructurales, enzimáticos y de desecho es estimular, probablemente de forma perjudicial la producción de citoquina celular del huésped. Las citoquinas así producidas son predominantemente proinflamatorias y poseen efectos múltiples que sirven para reforzar la respuesta inflamatoria. También alientan la actividad de la metaloproteinasa de la matriz, aparte de reclutar leucocitos a esta zona.

Los lipopolisacáridos (LPS) (endotoxinas) de los microorganismos gramnegativos Son capaces de provocar tanto la respuesta inflamatoria e inmunitaria como de interactuar con las células del huésped. Muchas de las funciones atribuidas a los LPS en el pasado eran debidas no sólo a sus acciones estimulantes de las citoquinas, sino además a las muchas moléculas de la membrana externa, proteínas y enzimas unidas a las moléculas de LPS. También se demostró que los LPS tienen efectos profundos sobre el sistema de coagulación sanguíneo y el sistema del complemento, produciendo una alteración de la homeostasis y formación de péptidos proinflamatorios. Las propiedades de los LPS y de los ácidos lipoteicoicos (LTA) de los microorganismos grampositivos son numerosas y, como ya se dijo, pueden deberse a las muchas moléculas asociadas con estas estructuras membranosas externas. Los LPS, LTA y proteínas o polisacáridos específicos producidos y liberados por los microorganismos subgingivales activan a los mediadores químicos de la inflamación para que produzcan permeabilidad vascular e induzcan, mediante acciones quimiotácticas, a las células inflamatorias



a que se muevan hacia los tejidos y provoquen que las células defensivas liberen sustancias proinflamatorias y citoquinas. Las respuestas inmunitarias frente a los microorganismos estarán dirigidas principalmente contra las proteínas y polisacáridos de la membrana externa y contra las enzimas y toxinas liberadas extracelularmente. Estas reacciones inmunitarias tendrán como resultado una mayor liberación de citoquinas y mediadores proinflamatorios, que a su vez aumentarán la inflamación y así serán más nocivos para el huésped. Se piensa que estas moléculas son capaces de inducir una respuesta excesiva de anticuerpos en los pacientes^{1,9}. (Fig 24)

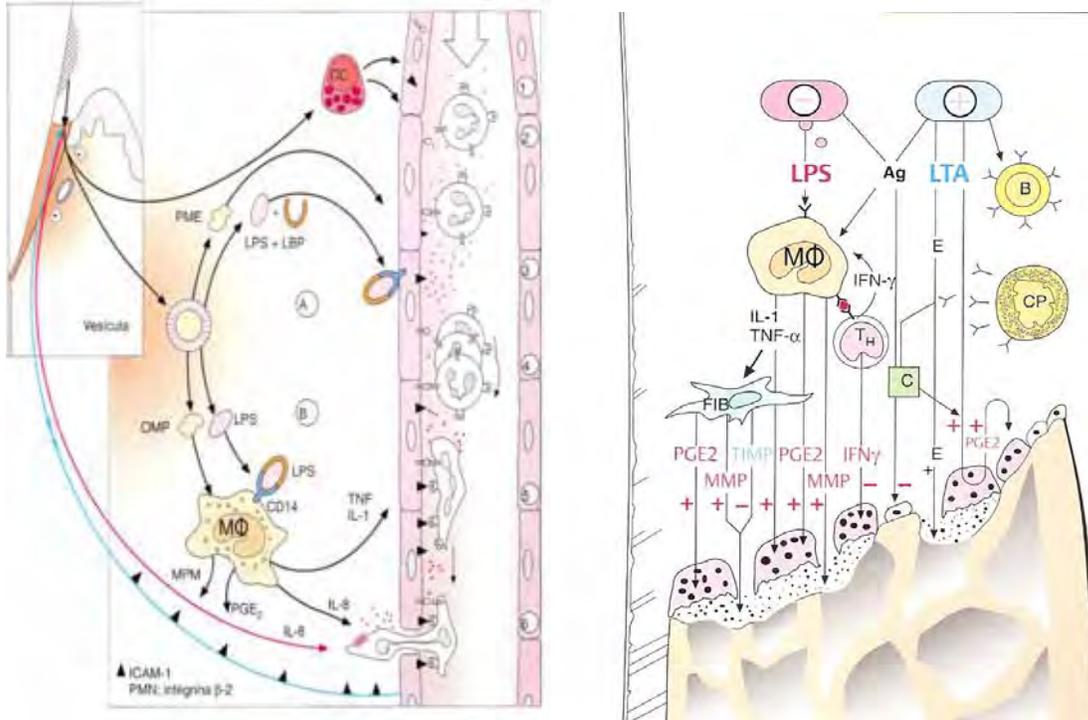


Fig. 24. Proceso patológico en la enfermedad periodontal. En el esquema se observa la interacción de moléculas en el surco gingival. MΦ: macrófago; FIB: fibroblastos; LPS: lipopolisacárido; LTA: ácido lipoteicoico; LBP: proteína de unión al lipopolisacárido; CD 14: molécula de diferenciación 14; PGE2: prostaglandinas tipo 2; IL-8 Interleucina 8; TNF: factor de necrosis tumoral; MPM: metaloproteinasas; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular; Tomado de *Periodoncia*. Herbert F. Wolf-Edith M. & Klaus H. Rateitschak. (2005)

6.7 Bacterias periodontopatógenas

A principios del siglo XX, algunos investigadores como Bass, Smith, Barret consideraron que estaban implicadas en la enfermedad periodontal algunos tipos de amibas, de hecho Bass le llamó *Endoameba buccalis*; otros autores mencionaron espiroquetas, estreptococos, Staphylococos, y al *Bacterioides melanogenicum* como causantes de la enfermedad.¹



En la mitad de los 80's, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Wolinella recta* y otros microorganismos son asociados a la enfermedad periodontal, la lista de los patógenos posibles asociados a la enfermedad continúa creciendo, gracias a los avances de las técnicas de cultivo y de observación.^{1,3}

En conclusión ahora podemos hablar de que las enfermedades periodontales son causadas por bacterias presentes en la placa dental bacteriana, hecho demostrado experimentalmente de diferentes formas: en pacientes con mala higiene dental; o por medio de la terapéutica que incluye una eliminación mecánica de los acúmulos de placa dentobacteriana; o por último debido a estudios in vivo e in vitro en los cuales microorganismos que en el ser humano causan enfermedad periodontal y al ser inoculados en animales también provocan dicha enfermedad.¹

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

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

Entre las especies más mencionadas encontramos: *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Camphylobacter rectus*, *Eubacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus intermedius* y especies de *Treponema*. Ya que su estructura bacteriana, sus componentes extracelulares y sus metabolitos pueden provocar diversos efectos sobre los tejidos del huésped.^{1,3,9,58}

6.8 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Antecedentes.

La bolsa periodontal está densamente poblada con bacterias, haciéndola un sitio importante para la interacción del huésped-microbio. Las bacterias periodontales estimulan la proliferación de las células B, sobre todo a través de una clásica respuesta inmune antígeno específica, pero el estímulo puede también activar a través de células B, superantígenos o a través del sistema inmune innato. Varios patógenos periodontales importantes, incluyendo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*^{59, 60}.

Características generales.

Fue descrito por primera vez en 1912 y se llamó de diferentes formas a lo largo del tiempo. *A. actinomycetemcomitans* fue reconocido como un miembro de la microbiota oral normal en 1950. Se ha encontrado también en primates y otros mamíferos. El hábitat primario no ha sido definitivamente identificado pero es probable que sea la placa dental a nivel de encía cervical. Este organismo es un Gram-negativo, no formador de esporas, no motil, un cocobacilo anaerobio facultativo que crece mejor en un ambiente anaeróbico enriquecido con CO₂ %-



10% a una temperatura óptima de 37.8 °C, en un rango de pH de 7-8.5, capnófilico que crece individualmente, en pares, o en grupos pequeños y que puede ser estimulado por un número de moléculas de bajo peso molecular que incluyen a varias hormonas esteroideas^{60, 62}. Las células son rectas o curvadas con extremos redondeados, de 1.0- 1.5 μm por 0.4- 0.5 μm (Fig 25).⁹

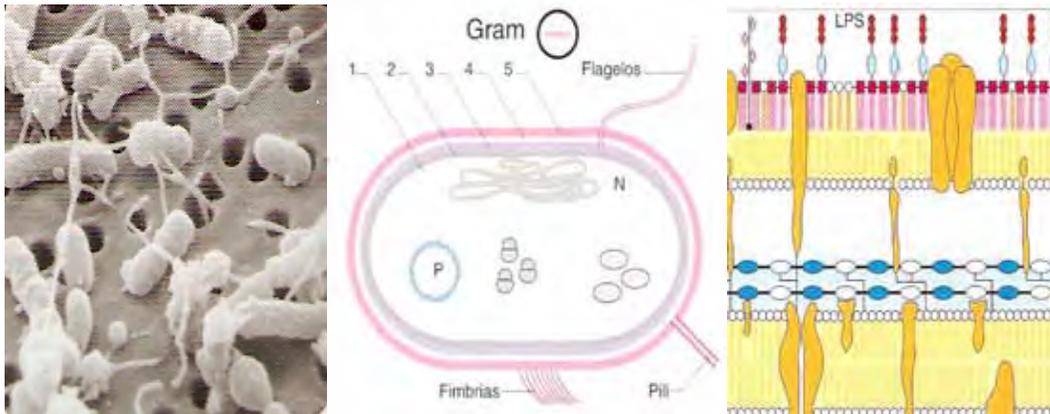


Fig. 25. Proliferación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Microscopía electrónica de barrido donde se muestra a Aa. sobre la superficie de sarro dental y esquematización de una bacteria Gram-negativa y su pared celular.

Tomado de Periodoncia. Herbert F. Wolf-Edith M. & Klaus H. Rateitschak. (2005)

Ha sido implicado en la patogénesis de varias enfermedades infecciosas, como en la endocarditis, meningitis, bacteriemia, pericarditis, septicemia, neumonía, artritis infecciosa, osteomielitis, sinovitis, infecciones de la piel, infecciones del tracto urinario, abscesos y periodontitis^{62,63}.

Las bacterias aisladas (frescamente) son invariablemente frimbriadas y producen en agar pequeñas colonias circulares, adherentes, translúcidas y rugosas (aproximadamente de 1 mm de diámetro después de 2 a 3 días) con un delgado borde irregular. Estas colonias "rugosas/ásperas" tienen una figura interna con una apariencia característica de puros cruzados o semejantes a una estrella cuando es visto con microscopio de baja potencia. Aparecen marcas con orificios debajo de la colonia, y eventualmente se convierte en una colonia embebida en el medio de agar^{61,62}.

Diversidad serológica

Actualmente son reconocidos seis serotipos distintos (a-f) y es sugerido que todos tienen potencial patogénico. Su clasificación es basada en polisacáridos de superficie, de alta masa molecular, localizados en el lado O de las cadenas del lipopolisacárido^{59,60}.



Los polisacáridos O de los serotipos b,c,e y f son el producto de grupos de genes homólogos que contienen entre 10 (serotipo e) y 16 (serotipo b) genes con grupos de genes altamente conservados en las terminaciones proximal y distal y genes centrales siendo únicos a cada grupo y conteniendo una materia de CG bajo. Los grupos de genes que codifican la síntesis de los serotipos a y d no están relacionados estructuralmente con los otros cuatro. El grupo de genes del serotipo d es un fragmento de 13.9 kb localizado a solo 2 kb debajo de los grupos de genes b, c, e y f. El serotipo a, está codificado por un fragmento de 12.9 kb de ADN cromosomal localizado lejos de los otros sitios. El antígeno específico del serotipo consiste únicamente de 6-desoxihexosa, 6-desoxi- D- talosa, el cuál es único en bacterias⁶⁰.

Estudios en la distribución de cepas serotipos a-e de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mostraron que los serotipos a y b son frecuentemente aislados de pacientes con periodontitis agresiva localizada, cepas serotipo e son comunes en infecciones no orales y en gente sana, y cepas serotipo d y e raras en todas las poblaciones. El serotipo b también es encontrado en personas sin ninguna infección bucal.

Invasión a la célula del hospedero

Una característica original de la invasión de células epiteliales por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es que, una vez libre en el citoplasma, esta bacteria se replica en mucho menos de la mitad de tiempo (7.5 veces más rápido) observado in vitro. Otro aspecto inusual de la invasión de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a células epiteliales, es su rápida salida de la célula después de la invasión y su habilidad para moverse de una célula a otra, ambas acciones son dependientes de los microtúbulos de la célula del hospedero⁶³.

La habilidad de moverse de una célula a otra es dependiente de la formación de protrusiones celulares en la célula infectada. Estas protrusiones albergan al *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y puede interconectarse con células adyacentes y de este modo permitir la propagación celular⁶¹.

Factores de virulencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (Fig 26)



Fig. 26. Factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* (Aa).
Tomado de Herbert F. Wolf-Edith M. & Klaus H. Rateitschak (2005).

Lipopolisacárido

EL LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es un componente patogénico reconocido e importante en la iniciación y progreso de la enfermedad periodontal, puesto que estimula células del hospedero para producir citocinas inflamatorias e induce resorción ósea^{1,3,9}.

El LPS bacteriano, es el mayor componente de la membrana externa de todas las bacterias gramnegativas, y actúan como fuertes estimuladores de la inmunidad natural ó innata en diversas especies eucariotas de insectos a humanos.⁶⁴

Los LPS son moléculas estables al calor, compuestas por un componente lipofílico, el lípido A y una región de poli- ó oligosacáridos que está covalentemente unida a su dominio de anclaje de membrana externa bacteriana.

El LPS tiene enormes variantes debido a una diversidad en la composición química de la región de polisacárido, y a las variaciones en la estructura fina del lípido A, el cuál está formado por cadenas de manosa. El lípido A, es el centro inmunoestimulador del LPS, determinando la endotoxicidad en especies mamíferas. De esta forma, es el responsable del efecto del lipopolisacárido, debido a la especificidad y al reconocimiento altamente sensible por numerosos componentes celulares y humorales de la inmunidad innata, vía receptor manosa⁶⁴.

La porción oligosacárido está constituida por dos subregiones: la región central y la cadena O- específica. Ésta última está compuesta por 50 unidades de repetición



y de cadenas ricas en manosa, responsables junto con la porción del lípido A, de la propiedad del LPS como adyuvante en muchas vacunas, ya que aumenta la respuesta inmune.

En la región central del oligosacárido se encuentra el centro externo e interno, los cuales pueden ser distinguidos de acuerdo a la composición predominante de carbohidratos.

La región central externa principalmente está constituida de hexosas semejantes a D-glucosa, D-galactosa, D-glucosamina, N-acetilglucosamina ó N-acetilgalactosamina. La región central interna muestra una variabilidad dentro de la región de polisacáridos y en muchas bacterias Gram-negativas. Consiste en unidades de monosacáridos 3-deoxi-D-mano-ácido octulosónico usualmente también denominado 2-keto-3-ácido deoxioctulosónico y L- ó D-glicero-D-mano-heptosa a menudo transportando sustituyentes aniónicos semejantes a grupos fosfato, difosfato ó difosfoetanolamina.

El azúcar ácido Kdo representa una característica y un componente esencial de la región central interna del LPS bacteriano y es además considerado un marcador de diagnóstico para LPS y blanco en el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos en la inhibición del paso Kdo en la biosíntesis de LPS.

La estructura del lípido A, está caracterizada por una unidad de disacárido unida central β (1 \rightarrow 6), que está compuesta de D-glucosamina (D-GlcN) ó D-2,3-diamino-2,3-dideoxy-glucosa (D-GlcN3N; DAG) en cada combinación homodimérica ó heterodimérica y en la cual en muchos casos es monofosforilada en posiciones 1 y 4',⁶⁴.

El lípido A y el centro interno, contienen muchos grupos aniónicos formando una estructura ó región cargada negativamente, la cual es fuertemente estabilizada por cationes divalentes asociados. Al mismo tiempo es blanco para una amplia variedad de antibióticos catiónicos cargados positivamente en defensa contra el microorganismo. (Fig 27)

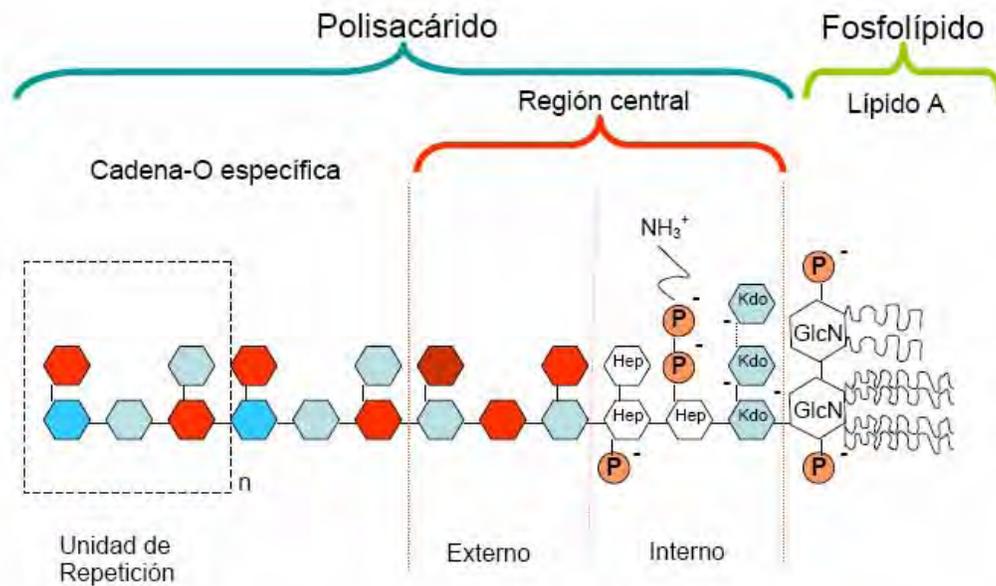


Fig. 27. Estructura química del Lipopolisacárido.

6.9 *Streptococcus sanguis*

Antecedentes

Por mucho tiempo se consideró que estos padecimientos eran ocasionados por bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas* y *Enterococcus*, en particular por los componentes de su pared celular como son los lipopolisacáridos (LPS). Actualmente se sabe que los LPS por sí mismos no pueden producir todas las características del síndrome de disfunción multiorgánica y que se requiere de la participación de bacterias grampositivas, las cuales carecen de LPS. Tal es el caso de *Staphylococcus aureus* que es una Gram-positiva y que a pesar de que carece de LPS está asociada al desarrollo de las siguientes enfermedades: neumonía, meningitis, endocarditis y septicemia, lo que sugiere que esta bacteria presenta otros factores de virulencia⁹.

Características generales.

Streptococcus sanguis, es una bacteria Gram-positiva facultativa, es un habitante normal de la boca de los humanos. Se encuentra especialmente en la placa dental, donde se modifica el medio ambiente para que sea menos hospitalario para otras cepas de *Streptococcus* que causan la caries. Sin embargo, *S. sanguis* pueda tener acceso a la sangre cuando se presenta la oportunidad y colonizar en



las válvulas del corazón, donde es la causa más común de endocarditis bacteriana.⁹ (Fig 28)

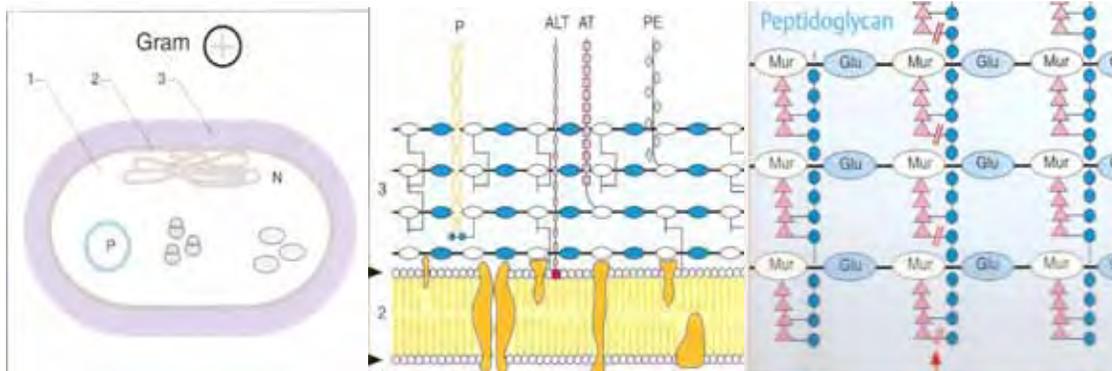


Fig. 28. Esquemización de una bacteria Gram-positiva y su pared celular. Esquema que muestra del lado izquierdo 1. Citoplas de la bacteria; 2. Membrana celular; 3. Pared bacteriana. En el centro y lado derecho se esquematizan las estructuras de la membrana y pared bacteriana. Tomado de Periodoncia. Herbert F. Wolf-Edith M. & Klaus H. Rateitschak.

Ácido lipoteicoico

Los peptidoglucanos y el ácido lipoteicoico (LTA) son dos de los principales componentes de las bacterias Gram-positivas que tienen actividades relacionadas con el desarrollo de la sepsis.

Muchas bacterias grampositivas contienen ambos polímeros, pero el ácido lipoteicoico es el que predomina y su biosíntesis es menos dependiente de las condiciones de crecimiento bacteriano, en comparación con los ácidos teicoicos.

Los ácidos lipoteicoicos son polímeros polianiónicos ubicados en la parte externa de la membrana citoplasmática mediante la unión a lípidos. Están formados por Poli-Gro-P que puede estar modificado en el hidroxilo del carbono 2' y 4' con GlcNac y D-Ala.

Como posibles funciones del LTA se ha propuesto que regula la función de las autolisinas (enzimas que ocasionan pequeños orificios en la pared celular). La naturaleza anfifílica del LTA parece ser muy importante para esta actividad ya que ésta se pierde al tratamiento con detergentes. Se ha demostrado en estudios in vitro que para llevar a cabo esta función es necesaria la formación de micelas.

Otra característica del LTA es su naturaleza polianiónica que le permite tener un papel clave en el mantenimiento del balance catión-divalente sobre la superficie celular, posiblemente, a través de la pared celular, mediante una interacción de intercambio iónico.



Un posible papel del LTA, que comparte con lipoglicanos, es que participan como mediadores de interacciones célula-célula, célula-sustrato, y la consecuente virulencia de la bacteria⁶³.



7. RECEPTORES TLRs

Características generales

Los receptores tipo peaje (o Toll-like receptor TLRs) son una familia de proteínas transmembranales de tipo I que forman parte del sistema inmunitario. En los vertebrados también posibilitan la adaptación del sistema inmune. Descubiertos inicialmente de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) son los responsables del reconocimiento de varias vías de patrones de reconocimiento de patógenos (PAMPs pathogen-associated molecular patterns) expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos. Monocitos, macrófagos y neutrófilos fagocitan patógenos microbianos y estimulan la respuesta de citocinas dando como resultado el desarrollo de la inmunidad innata o natural, la respuesta inflamatoria, y mediar la efectiva inmunidad adaptativa. Su función, en resumen, es el reconocimiento del patógeno y la estimulación de la respuesta inmunitaria contra dichos patógenos.⁶⁵⁻⁷⁰

También han sido encontrados en plantas, teniendo un origen evolutivo muy antiguo; después de las defensinas, pueden ser el componente del sistema inmune más antiguo⁶⁶.

Estructura

Los distintos TLR exhiben varios patrones de expresión. Muchos de ellos, se cree que actúan como homodímeros, aunque heterodímeros también existen. Las proteínas TLR tienen una significativa homología con el receptor IL-1 tipo I. Hasta hoy, alrededor de doce TLR han sido hallados en humanos y en el ratón. Estudios con varios TLRs demuestran que activan la vía del NF- κ B, que regulan la expresión de citocinas, a través de varias moléculas incluyendo el MyD88, TIRAP/Mai y TRF. La activación de la vía del NF- κ B conduce a la iniciación de la respuesta adaptativa inmune por la producción de citocinas inflamatorias tales como al IL-1, IL-8, TNF-alfa, IL-12, y la inducción de moléculas de co-estimulación, tales como la CD80, CD86 y CD40.^{66,67}

Clasificación

La participación de los receptores tipo Toll (TLR) en la respuesta inmunitaria innata se describió por primera vez en un artrópodo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. La proteína Toll de *Drosophila* originalmente se identificó como un factor requerido para el establecimiento de la polaridad dorso-ventral en el embrión en desarrollo. Toll además se reconoció como un receptor transmembranal que activa el factor de transcripción denominado Dorsal (que es homólogo al factor de transcripción NF- κ B en vertebrados) al mediar la degradación de Cactus, una proteína represora de Dorsal. Una vez liberada de Cactus, Dorsal puede trastocarse al núcleo donde activa genes específicos. Debido a la homología de Toll con el receptor de interleucina 1 (RIL1) y a la conservación de los canales de señalización en ambos sistemas, se propuso que Toll estaba involucrado en la regulación de la respuesta inmunitaria, lo cual se corroboró con la demostración de su participación en la inducción de resistencia a



infecciones producidas por hongos. Poco tiempo después, mediante búsquedas en las bases de datos de identificadores de secuencias expresadas (EST), y utilizando secuencias conservadas en el dominio de señalización de Toll/RIL1, se identificó un homólogo del receptor Toll de *Drosophila* en el humano. A partir de dicho hallazgo, y utilizando estrategias similares, se identificó una familia de proteínas estructuralmente relacionada con la proteína Toll de *Drosophila* que colectivamente se les denomina receptores tipo Toll (TLR) y que consiste de 11 miembros: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, y el recién identificado TLR11. Asimismo, se ha indicado que seguramente en un futuro próximo se descubrirán más TLR. Cabe señalar que la familia de TLR de humano se subdivide en cinco subfamilias que, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos, son: TLR3, TLR4, TLR5, TLR2 y TLR9. La subfamilia TLR2 está compuesta de TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10; la subfamilia TLR9 está compuesta de TLR7, TLR8 y TLR9. (Fig 29)^{67,71}.

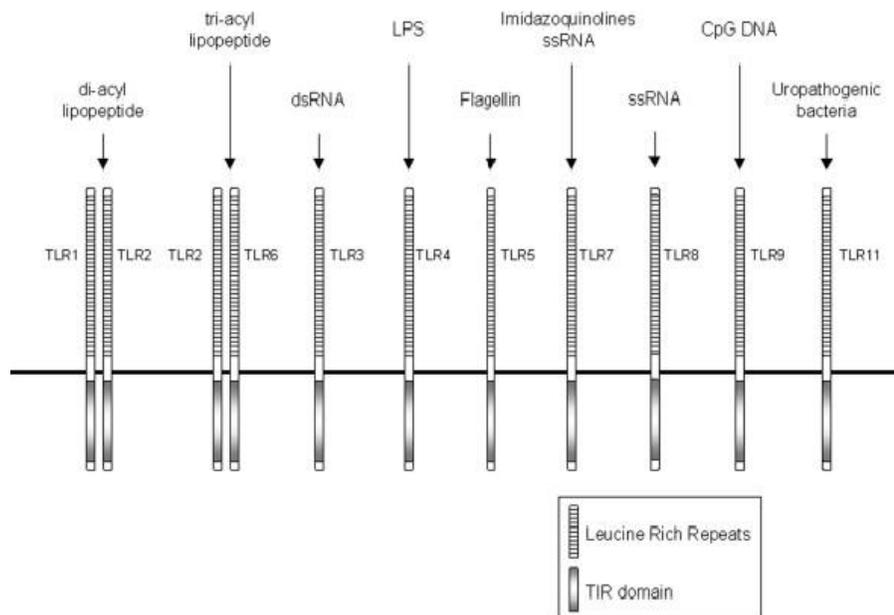


Fig. 29. Familia de TLRs. En el esquema se muestran los diferentes receptores TLR y sus ligandos.

Tomado de <http://www.biochemsoctrans.org/bst/028/0551/bst0280551f02.htm>

TLR2

El TLR2 reconoce diferentes productos bacterianos como lipoproteínas de bacterias gramnegativas peptidoglicano de bacterias grampositivas, ácido lipoteicoico de bacterias grampositivas, glicolípidos de *Treponema maltophilum*, porinas de *Neisseria*, y zymosan de hongos, el TLR2 también reconoce lipopolisacárido (LPS) atípico de *Leptospira interrogans*, y LPS atípico de *Porphyromonas gingivalis*, que sugiere que TLR2 tiene capacidad específica de reconocimiento de los LPS de forma cilíndrica que inducen la producción de citoquinas. Finalmente, TLR2 reconoce la proteína 70 de choque térmico (HSP70)



del hospedero, se asocia con otros TRL incluyendo TRL1 y TLR6, e inicia la activación de genes característicos de una respuesta de tipo Th2. Finalmente, el TLR2, al igual que otros TLR, presenta diferencias en humanos y ratones en la expresión, transcripción, concentración tisular y regulación.^{63,65}

TLR4

TLR4 distingue LPS de bacterias gramnegativas, taxol de plantas, proteína de fusión del virus respiratorio sincitial, proteínas de la cubierta del virus del tumor mamario de ratón y virus de la leucemia murina de Molones, proteína de choque térmico (HSP60) derivada de Chlamydia pneumoniae, HSP6049 y HSP70 del huésped, extradominio A de fibronectina, oligosacáridos del ácido hialurónico del hospedero, fragmentos de polisacárido de sulfato de heparán del hospedero, fibrinógeno del hospedero. Mientras que TLR2 reconoce LPS cilíndrico, el LPS cónico estimula a las células sólo mediante TLR4. La capacidad para diferenciar variaciones en la composición molecular y la conformación tridimensional del lípido A de los LPS explica la activación de los diferentes canales de señalización mediados por los TLR^{25,69-71}.

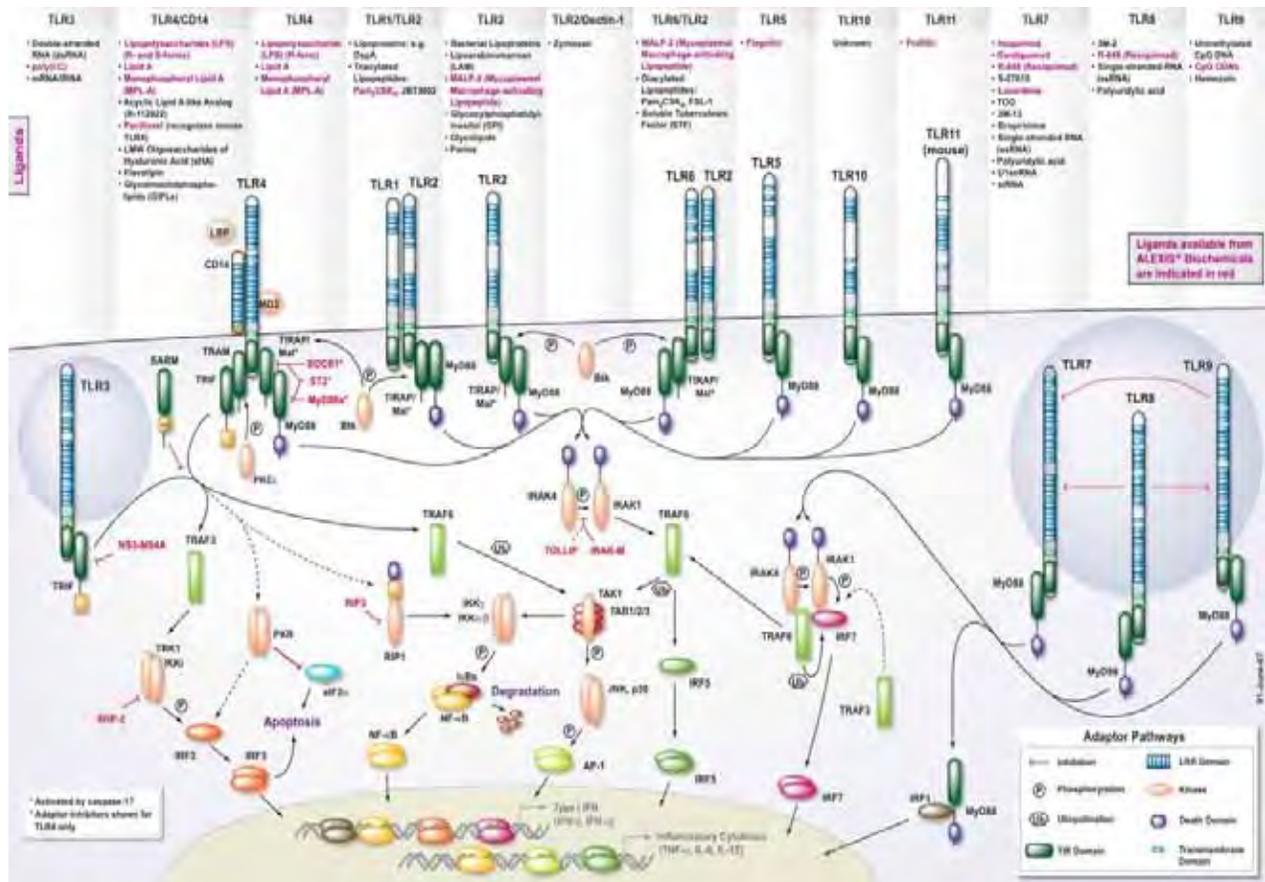


Fig. 30. Activación de los receptores TLRs por sus ligandos y sus mecanismos de señalización.

Tomado de <http://www.sapphirebioscience.com>



8. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN.

El proceso de transmisión de señal afecta a una secuencia de reacciones bioquímicas dentro de la célula que se lleva a cabo a través de enzimas unidas a otras sustancias llamadas segundo mensajero. Cada proceso se realiza en intervalos de tiempo muy pequeños, como milisegundos, o en periodos más largos como algunos segundos²⁹.

En muchos procesos de transducción de señales se implican cada vez más en el evento un número creciente de enzimas y sustancias desde el inicio del estímulo, el cual parte desde la adhesión de un ligando al receptor de membrana, hasta la activación en el receptor, que convierte el estímulo en respuesta, la cual, dentro de la célula, provoca una cadena de pasos (cascada de señalización o ruta del segundo mensajero) cuyo resultado es la amplificación de la señal, es decir, que un pequeño estímulo provoca una gran respuesta celular.

En bacterias y otros organismos unicelulares, los procesos de transducción de señales permiten a las células responder a las influencias del medio ambiente que les rodea. Las células que forman los organismos multicelulares responden a una gran cantidad de estímulos químicos.

La gran variedad de señales físicoquímicas a las que las células pueden responder, haría pensar en una amplia diversidad de mecanismos de transducción de señal. Sin embargo, la evolución ha seleccionado y perfeccionado sólo una serie limitada de cadenas de eventos que son capaces de generar la respuesta apropiada a cada estímulo en diferentes tipos celulares. Esta convergencia en unas pocas cadenas de transducción comunes a plantas y animales ocurre en primer lugar en los receptores celulares.

Los receptores celulares presentan en su estructura dos regiones o dominios funcionales bien diferenciados. Uno de reconocimiento o detección de los estímulos, que presenta una diversidad paralela a la de los estímulos, y otro dominio efector que pertenece a unos pocos tipos fundamentales, por lo que la secuencia de eventos que son capaces de iniciar son limitados pueden inducir una activación de la cascada de proteasas serinas humorales constituyentes del sistema complemento en mamíferos, ya que representa un marcador altamente específico ó modelo molecular asociado a patógenos (PAMP) para la infección por la bacteria Gram-negativa²³.

Vía de transducción activada por LPS.

El reconocimiento del LPS es iniciada por LBP (proteína fijadora del lipopolisacárido), una glicoproteína extracelular de 58 kDa que selectivamente osoniza agregados estructurales de LPS por la subsecuente adherencia



dependiente de mCD14 en la superficie de los fagocitos, ó en la forma soluble sCD14 en el espacio extracelular.²⁵

En humanos, especialmente los mononucleares reaccionan con extrema sensibilidad a las preparaciones de LPS endotóxicamente activas in vitro, pero la hipersensibilización es clave, especialmente causada por el IFN- γ , el cual induce la expresión de mRNA de TLR4 en monocitos y neutrófilos, conduciendo a la secreción de un amplio espectro de mediadores endógenos, entre los cuales se encuentra las citoquinas proinflamatorias TNF- α , factor inhibitorio de migración del macrófago (MIF), citoquinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, el factor estimulador de colonias M-CSF, G-CSF y GM-CSF, mediadores derivados de lípidos semejante al factor activador de plaquetas (PAF), prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2) ó leucotrienos, como bien especies reducidas de oxígeno semejantes al anión superóxido (O₂⁻), radicales hidroxilo (OH) ú óxido nítrico (NO)¹⁴⁻¹⁹.

Adicionalmente, el LPS puede causar una activación intensa y rápida del sistema complemento en vertebrados, por las tres vías: clásica, alternativa y de las lectinas, vía el dominio de lípido A y la región polisacárido respectivamente. La activación del complemento por el LPS ó la bacteria Gramnegativa intacta contribuye a la opsonización mediada por suero y a la muerte de la bacteria invasora. También participar en la inducción de actividades celulares del huésped por la liberación de anafilotoxinas como C3a y C5a.

La forma soluble ó secretada del antígeno CD14, agonísticamente eficiente al LPS, puede activar constitutivamente células CD14 negativas y positivas, como las células dendríticas, células endoteliales, células del músculo liso, células epiteliales y fibroblastos, muchas de las cuales expresan TLR-4.

El mimetismo de los glicoconjugados del huésped por las estructuras de oligosacáridos terminales de LPS contribuye al incremento en la resistencia de la especie bacteriana en particular ó de cepas, a la fagocitosis y actividades bactericidas como el sistema complemento por la vía clásica ó alterna.

Un estado de desensibilización reversible en la reactividad a la endotoxina de acuerdo a la secreción de citoquinas proinflamatorias mayores ha sido observado, la cual puede ser inducido por la exposición previa a la endotoxina a la cual es comúnmente referida como “tolerancia a la endotoxina”. Esta tolerancia puede ser debida a efectos autocrinos de diversos mediadores de fase tardía provocada por la respuesta inicial al LPS tal como la IL-10, TGF- β ó PGE2^{11,13}

La baja regulación del componente de señalización intracelular receptor IL-1 asociado a kinasas (IRAK ó IRAK-1) ha sido implicado en la inducción del estado tolerante a la endotoxina de células mononucleares humanas in vitro. La regulación de la expresión del gen ó el estado funcional de TLR4 como también de la proteína MD-2 asociada a TLR4, contribuyen la inducción de la tolerancia a la endotoxina en células mononucleares in vitro, en presencia de IL-10, IL-4, IL-11,



IL-13, TGF- β , PGE2, glucocorticoides, catecolaminas, camino regulatorio neuronal, y una incrementada neutralización ó eliminación de LPS sistémico⁶⁴.

Vías de transducción activadas por LTA

Al tratamiento con LTA se encuentran activas las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK/p38) y la vía de fosfatidilinositol-3 cinasa gamma (pI3Ky). En la sepsis en humanos la activación de MAPK/p38 está implicada en la granulocitosis y permite de esta forma restaurar la función inmune en sepsis.

Vía Clásica estimulada por ALT Una vez que el ALT se une a su respectivo receptor membranal (TLR2), entonces se activa la fosfatidilcolina, la fosfolipasa C (PC-PLC) y la fosfatidilcolina-fosfolipasa D (PC-PLD) para inducir la activación de PKC, simultáneamente ocurre la activación de cinasas de residuos de tirosina. Estos efectos resultan necesarios para la consecuente fosforilación de las MAPK p42/44 Y p38. La cascada de fosforilaciones descrita resulta en la estimulación de NF- B y la subsecuente expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX2) y liberación de prostaglandina E2.

Recientes estudios han demostrado que utilizando el inhibidor específico de la MAPK/p38 (SB 203580) se interrumpe la expresión de iNOS y la liberación de óxido nítrico (NO) cuando se trata con LTA a la línea celular de macrófagos RAW 264. Estos resultados sugieren que la vía de transducción de las MAPK/p38 se encuentra también involucrada en la producción de nitritos.

También se ha demostrado que PI3K y se activa por receptores acoplados a proteínas G durante procesos inflamatorios. Neutrófilos de ratón deficientes en PI3K y (- -) muestran isquemia, reducción en migración y peritonitis. Así mismo, se muestra también una reducción en la translocación de NF-kB y en la síntesis de TNF- e IL-1B. Estos estudios sugieren que PI3K y juega un importante papel en la activación de neutrófilos.¹⁶

Después del reconocimiento entre TLR2 y el LTA se produce un amplio espectro de señales intracelulares como la activación de la familia de MAPK, de la proteína cinasa B (PKB) Y de la cinasa del inhibidor-KB (IKK). El incremento en la actividad de estas cinasas consecuentemente activa a diversos factores de transcripción como NF -1CB (en particular a los heterodímeros p50 y p65), Jun/Fos, factor de activación de transcripción (ATF), factor de respuesta a suero (SRF), proteína semejante a Ets (ELK), proteína de unión y aumento de CCAAT (C/EBP) y la proteína de fijación del elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB). El primer evento que inicia la cascada de transducción consiste en la colocalización y agrupamiento de receptores y la generación de señales primarias de transducción en la membrana plasmática.

La señalización mediada por AMP cíclico inhibe la activación de la cinasa de respuesta extracelular (ERK), p38, MAPK Y JNK en macrófagos peritoneales y



también inhibe la expresión de TNF-(X, NF-KB Y la expresión de óxido nítrico sintasa inducible en células de Kupffer y monocitos.

En respuesta al tratamiento con Streptococcus B, los receptores TLR2, TLR6 Y CD 14 se agrupan y la primera molécula intracelular reclutada por el complejo es el factor de diferenciación mieloide (MyD88) el cual recluta y activa a la cinasa asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK). IRAK forma multímeros que se autofosforilan y reclutan grandes complejos consistentes en el factor activado por el receptor a TNF (TNFI TRAF6), cinasa activadora del factor de crecimiento transformante B-1 (TAK1), proteína de asociación a TAK1 (TAB1) Y TAB2.

IRAK 4 fosforila a IRAK1, esta fosforilación es indispensable para la activación de la transducción de señales, en contraposición, recientemente se ha descrito que la forma IRAK4 actúa como inhibidor. Así mismo, la activación de TAK1 promueve su liberación del complejo y de esta forma activa a IKK y a la MAP cinasa cinasa 6 (MKK6). La cinasa inductora de NF-KB (NIK) se requiere para la activación de la cinasa de IKB (IKK) que promueve la fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma 26S de I B y la translocación de NF- B al núcleo. La proteína cinasa MAP-B (MKKB) es responsable de la activación de las MAPK, p38 Y la cinasa terminal NNJUN (JNK). En presencia de la proteína adaptadora denominada intermediario conservado evolutivo de la vía de Toll (ECSIT) y MEK cinasa (IMKKI), TRAF6 puede activar a ERK 112. Sin embargo, ERK 112 también puede activarse por un mecanismo independiente de TRAF6, que involucra a la forma atípica de PKC la PKC β , que está asociada a la acumulación de ácido fosfatídico, lo que conlleva a la activación de ERK. Finalmente, se ha demostrado también la activación de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) de una manera dependiente de PKB lo que conduce a la activación de NF B.⁶⁵

Diversos reportes señalan que las células de Kupffer producen interleucina-6 (IL-6) y TNF-a durante el trauma, estas células también sintetizan citocinas anti-inflamatorias como IL-1B en respuesta al tratamiento con LTA. La cinasa PKB que es activada a través de la vía de PI3K, así como la actividad de JAK-2, están involucradas en la expresión de IL-6 e IL-1B, mientras que las cinasas de la familia Src participan en la expresión de TNF- .⁶⁵



9. JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades periodontales son desordenes complejos que están asociados a múltiples factores de riesgos. Es una enfermedad crónica que se caracteriza por un proceso inflamatorio que afecta a los tejidos de soporte del diente. Esta enfermedad está ocasionada por la acumulación de placa dental, y los signos clínicos son el resultado de la respuesta inmune e inflamatoria. La destrucción del tejido que define a la periodontitis se ha ligado a la producción excesiva de moléculas proinflamatorias incluyendo metaloproteinasas de la matriz extracelular, IL-1B y prostaglandina E2⁸.

En la enfermedad periodontal a pesar de que el sistema inmune se activa, no logra eliminar los factores que causan esta enfermedad, ocasionando una respuesta continua y excesiva del huésped llevando a la destrucción tisular debido al reclutamiento de leucocitos y la subsecuente liberación de mediadores y citocinas que juegan un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad periodontal³.

La evolución del tejido periodontal sano a uno con enfermedad, está íntimamente ligado al desarrollo de la placa dentobacteriana ya que cuando bacterias específicas de la placa dentobacteriana aumentan hasta alcanzar cifras relevantes, producen factores de virulencia que exceden el umbral del control del paciente, y el equilibrio va de la salud a la enfermedad. Sin embargo se sugiere que pobladores tempranos como *S. sanguis* benefician al huésped. Es probable que esta especie funcione en la prevención de la colonización o proliferación de microorganismos patógenos¹.

Por lo anterior el estudio de esta enfermedad es importante para poder dilucidar como es que los mecanismos de transducción de señales intracelulares regulan los finos procesos por lo que tanto el desarrollo de la placa dentobacteriana y la respuesta del huésped dan como resultado el establecimiento de la enfermedad periodontal.

Por otra parte, conocer los mecanismos de transducción de señales que se suceden en los procesos inflamatorios crónicos, como es la enfermedad periodontal nos provee de herramientas valiosas para desarrollar fármacos que sean eficaces en el tratamiento de esta enfermedad.



10. HIPÓTESIS.

Si LPS o LTA activan mecanismos de transducción de señales que promueven la fosforilación de proteínas de la vía de las MAPK e inducen la expresión de citocinas proinflamatorias; entonces, LTA bloquea la acción de LPS en fibroblastos gingivales humanos en la enfermedad periodontal en etapas tempranas de formación de la placa dentobacteriana.

11. OBJETIVOS

Objetivo general.

Estudiar el papel del ácido lipoteicoico de *S. sanguis* en la activación de mecanismos de transducción de señales y la inhibición de la respuesta inducida por lipopolisacáridos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en fibroblastos gingivales humanos.

Objetivos específicos.

1. Analizar la expresión del mensajero de IL-1B en fibroblastos gingivales humanos posterior al tratamiento con LPS o LTA.
2. Mediante tratamiento previo con LTA y posterior estimulación con LPS, analizar la expresión del mensajero de IL-1B en fibroblastos gingivales humanos.
3. Determinar patrones de fosforilación de las proteínas ERK 1/ 2, p38 e I κ B⁻, y la expresión de la proteína COX-2, así como la translocación de NF- κ B al núcleo en fibroblastos gingivales humanos al ser tratados con LPS o LTA.
4. Estudiar si el tratamiento previo de LTA desensibiliza la respuesta a LPS para promover la fosforilación de ERK1/2, p38 e I κ B⁻, así como la expresión de la proteína COX-2 y la translocación de NF- κ B al núcleo, en fibroblastos gingivales humanos.
5. Determinar la fosforilación del receptor tipo toll 4 al tratamiento con LTA.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Agitador magnético. (Nuova)

Balanza GA200. (Ohaus)

Baño de agitación. (Precision Scientific)

Baño de temperatura controlada (Fisher)

Cajas de cultivo celular de 6 pozos. (Costar)

Cámara de electroforesis horizontal (GIBCO-Life Technologies)

Cámara de electroforesis vertical. (Hoeffer)



Cámara de transferencia. (Hoeffler)
Campana de flujo laminar (Nuair)
Celdas de cuarzo
Centrífuga (Sorvall)
Digi-Doc
Espectrofotómetro (Perkin Elmer)
Gendarme (Costar)
Gradillas (Nalgene)
Incubadora (Nuair)
Negatoscopio
Microcentrífuga (Sorvall)
Microscopio de objetivos invertidos C22 (Olympus)
Orbit Shaker (Labline)
Pipetas de 10ml y 5 ml (Finnpipette)
Potenciómetro (Equipar)
Portaobjetos
Probetas graduadas
Propipeta (Pepet-aid)
Sonicador (Lab-Line instruments)
Termociclador (Perkin-Elmer)
Timer
Tubos clínicos
Tubos de ensayo
Tubos Eppendorf
Vasos de precipitado
Vortex (Scientific industries)

Reactivos.

Acrilamida (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Agarosa (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Antibiótico-Antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomina, anfotericina B (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.).
Anticuerpo goat polyclonal COX-2. (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca. USA)
Anticuerpo rabbit polyclonal α -tubulina. (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca. USA)
Anticuerpo mouse monoclonal p-ERK 1/2 , goat polyclonal ERK 1/2. (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca. USA)
Anticuerpos mouse monoclonal pp-38(sc-7973), rabbit polyclonal p38 (sc-7149) (Santa Cruz Biotechnology, Ca. USA)
Anticuerpo goat polyclonal. p-IkB- , rabbit polyclonal IkB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca. USA)
Anticuerpo goat polyclonal p50 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca. USA)
Azul de bromofenol (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Bromuro de etidio (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)



Cloruro de sodio (DIFCO)
Desoxicolato de sodio (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Duodecil sulfato de sodio (J.T. BAKER.NJ. USA)
Etanol 75% (J.T. BAKER.NJ. USA)
EDTA (J.T. BAKER.NJ. USA)
Fenol saturado (J.T. BAKER.NJ. USA)
Fosfato de sodio (J.T. BAKER.NJ. USA)
Fluoruro de sodio (J.T. BAKER.NJ. USA)
Fluoroforo (rodamina) (Santa cruz Biotechnology.Ca.USA)
Glicina (J.T. BAKER.NJ. USA)
Glicerol (J.T. BAKER.NJ. USA)
Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology.Ca.USA)
Lipopolisacárido de Salmonella enteritidis (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA))
Luteolina (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Marcador de bases nitrogenadas (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)
Marcador de peso molecular (Santa cruz Biotechnology.Ca.USA. sc-2361)
Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)
Medio de cultivo de Hanks (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)
Membrana PVDF (Amersham Biosciences)
Nonident P-40 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Oligos de IL-1B sense, anti-sense (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)
Ortovanadato de sodio (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Paraformaldehído (DIFCO Laboratories. Mi. USA)
Persulfato de amonio (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Reactivos para RT-PCR (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)
Suero bovino fetal (INVITROGEN Life Technologies. Ca. USA.)
Tiocinato de Guanidina (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Trisma (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Tripsina (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)
Triton 100X (J.T. BAKER.NJ. USA)
Tween (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi.USA)



MÉTODOS.

Población de estudio: fibroblastos gingivales humanos (HGF) de paciente sano que acude a la clínica de cirugía maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La toma de la muestra se realizó durante el tratamiento quirúrgico de extracción de terceros molares. La encía corresponde a la zona que rodea o cubre a los terceros molares. El tamaño de la muestra fue de aproximadamente 0.4 cm². La recolección de la muestra se llevó a cabo mediante el consentimiento informado al paciente.

Criterios de inclusión. El paciente no presentó enfermedades sistémicas, y la muestra de encía se encontró libre de inflamación y/o cualquier otra patología.

Cultivo de fibroblastos gingivales. El tejido obtenido durante el procedimiento quirúrgico se colocó en solución de Hanks (Invitrogen life technologies, Ca, USA) posteriormente se realizaron 5 lavados con solución de Hanks para eliminar sangre proveniente del procedimiento quirúrgico. El tejido gingival se cortó con bisturí en fragmentos de 1 a 2 mm y se centrifugó. El sobrenadante se colocó en cajas con medio Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen life technologies, Ca, USA) suplementado con 2mM L-glutamina (Invitrogen life technologies, Ca, USA), penicilina / estreptomycin / fungizona (Invitrogen life technologies, Ca, USA) 100 g/ml, 100 g/ml y 1 mg/ml respectivamente y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. El cultivo se mantiene en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire y una temperatura de 37°C.

Aislamiento de proteínas totales. Todo el procedimiento se llevó a cabo en baño con hielo a 4°C, en la campana de flujo laminar. Las cajas de 6 pozos, con los HGF adheridos y tratados, fueron retiradas de la incubadora y se aspiró el medio de cultivo con pipeta Pasteur. A cada pozo se le adicionó 500 µl de PBS + Ortovanadato de Sodio 1mM, y se desprendieron las células con espátula de plástico. Se transfirió la suspensión a tubos Eppendorf, los cuales estaban enumerados de acuerdo a las condiciones del ensayo. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se colocaron 20 µl de buffer de lisis, (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 g/ml leupeptina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio). Posteriormente se sonicaron las muestras 1 seg x 30 en baño de hielo.

Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford y se tomaron 30 µg/ml de cada muestra para su hidrólisis con solución azul desnaturante (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; todos los reactivos se obtendrán de SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. MI USA) y se colocaron 5 min en baño seco a 65°C.

Electroforesis desnaturante para proteínas. La separación de las proteínas se llevó a cabo por electroforesis con gel de Acrilamida (SIGMA-ALDRICH



CHEMICAL CO. Mi USA) al 10% a 70 V. Para observar el peso molecular de las proteínas se utilizó un marcador de peso molecular de 100 kDa. (Gibco)

Cambios en la expresión del RNAm de IL-1 β por RT-PCR.

Para determinar el efecto de LPS y LTA sobre la expresión de IL-1 β en fibroblastos gingivales humanos, se realizaron experimentos dosis respuesta con LTA por 48 hrs, o LPS por 24 hrs en concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 μ g/ml, y posteriormente se realizaron experimentos curso temporal a 0, 12, 24 y 48 hrs con LPS 1 μ g/ml o LTA 5 μ g/ml.

Los efectos del ácido lipoteicoico sobre la inducción de IL-1 β que estimuló el LPS en HGF fueron medidos realizando experimentos en las siguientes condiciones: 1. Células sin tratamiento; 2. LPS 1 μ g/ml por 24 hrs; 3. LTA 5 μ g/ml por 24 hrs; 4. Tratamiento con LTA 0.5 μ g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 μ g/ml de LPS durante 24 hrs. 5. Tratamiento con LTA 1 μ g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 μ g/ml de LPS durante 24 hrs. 6. Tratamiento con LTA 5 μ g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 μ g/ml de LPS durante 24 hrs.

Mediante ensayos de RT-PCR se determinó la expresión de IL-1 β .

El RNA total se aisló de HGF. El RNA total (1 μ g) se transcribe en forma inversa (RT) usando el equipo One Step RT-PCR (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos 5'GGCTGCAGTTCAGTGATCGTACAG3', (sentido codificante) y 5'AGATCTAGAGTACCTGAGCTCGCCAGTGAA3' , (Sentido anticodificante) derivado del gene de IL-1 β y 5'TCCCTCAAGATTGTCAGCAA3' (Sentido codificante) y 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' (Sentido anticodificante) derivado del gene de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 15 min. El PCR se efectuó por 35 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda sencilla de pares de bases para IL-1 β y una banda sencilla de pares de bases para gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenada (GADPH) que se usó como control. La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se realizaron dos experimentos por separado de cada tratamiento.

Detección de la fosforilación de la fosfoproteína p38, ERK 1 / 2 e I κ B- y expresión de COX-2 por medio de experimentos de Inmunoelctrotransferencia (Western blot).

Para determinar el efecto de LPS y LTA sobre la fosforilación de p38, ERK 1 / 2 e I κ B- en fibroblastos gingivales humanos, se realizaron experimento curso temporal con 1 μ g/ml LPS y 5 μ g/ml de LTA durante 0,10, 15, 30, 45 y 60 minutos cada uno por separado. Mediante ensayos de Western-blot se determinó la fosforilación de ERK 1 / 2, p38 e I κ B- .

Los efectos del ácido lipoteicoico sobre la fosforilación que estímulo el LPS en HGF para las proteínas ERK 1 / 2, p38 e I κ B- fueron medido realizando experimentos en las siguientes condiciones: 1. Células sin tratamiento; 2. LPS 1



g/ml 1 por 10 min; LTA 5 g/ml por 10 min; 4. Tratamiento con LTA 1 g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 g/ml de LPS durante 10 min. 5. Tratamiento con LTA 5 g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 g/ml de LPS durante 10 min. 6. Tratamiento con LTA 30 minutos y terminado el tiempo 10 g/ml de LPS durante 10 min.

La expresión de COX-2 fue determinada mediante experimentos de tipo curso temporal con 1 g/ml LPS y 5 g/ml de LTA durante 0, 2, 4, 6, 8, y 10 hrs ya que esta proteína se expresa a tiempos largos.

Para determinar el efecto del ácido lipoteicoico sobre la acción del LPS en COX-2, se realizaron experimentos en las siguientes condiciones: 1. Células sin tratamiento; 2. LPS 1 g/ml 1 por 4 hrs; LTA 5 g/ml por 8 hrs; 4. Tratamiento con LTA 1 g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 g/ml de LPS durante 4 hrs. 5. Tratamiento con LTA 5 g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 g/ml de LPS durante 4 hrs. 6. Tratamiento con LTA 10 g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 g/ml de LPS durante 4 hrs.

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^6 células/pozo) se crecieron en cajas de 6 pozos. Después del estímulo, el medio se aspiró y las células se desprendieron ayudadas con espátulas de plástico en buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio, la muestra se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min y la pastilla se colocó con 20 μ l de buffer de lisis. La muestra se sonó (1s x 30) en un baño con hielo. Para el ensayo de Western blot se utilizaron 30 μ g de proteína que se mezclaron con solución azul, la muestra se colocó en un gel al 10% SDS-PAGE y se corrió a 70V por 1:30 hrs. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Biosciences) 1 hr a 0.3 amperes y 5 V. Para verificar que se transfirieron las proteína, las membranas se tiñieron con Rojo de Ponceau (Sigma Chemicals Co.). Posteriormente la membranas se bloquearon con 150 mM NaCl, 100mM Tris- HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de suero albúmina de bovino por 1 hr, se lavaron y se incubaron con el anticuerpo primario. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-fosfo-ERK (tirosina204), anti-ERK 1/2; anti-pp38 (Tyr182), anti-p38, anti-COX-2 y anti-p-IkB- (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se bloquearon con solución al 5 % de Suero albumina bovina en PBS, y se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con TBST y se incubaron durante 2 hrs con el anticuerpo secundario, HRP-conjugado ratón IgG ó conejo IgG ó cabra IgG (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas se revelaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y la autoradiografía se obtuvo después de exponer la película durante 5 min. Para verificar que la fosforilación de las proteínas ERK 1/2, p38 e Ikb- fuera inducida por LPS o LTA y no por existir cantidades mayores o menores de la proteína en las diferentes condiciones, se utilizaron las formas no fosforiladas de estas proteínas para que fuesen un control de carga, de la misma forma para medir la expresión de COX-2 se utilizó como control de carga el anticuerpo α -tubulina. (Santa Cruz Biotechnology). Estos experimento se realizaron en dos ocasiones por separado y la primera condición de los experimentos se tomó como basal y corresponden estadísticamente al 100%. Las imágenes se analizaron con el sistema digital Lab-Works.



Microscopía confocal para la Identificación de la translocación de NF-KB al núcleo por Inmunocitoquímica:

La translocación de NF-kB al núcleo inducida por LTA y LPS fue identificada realizando experimentos en las siguientes condiciones: 1. Células sin tratamiento; 2. LPS 1 g/ml por 10 min; LTA 5 g/ml por 10 min; 4. Tratamiento con LTA 1 g/ml 30 minutos y terminado el tiempo 1 g/ml de LPS durante 10 min.

Las células se crecieron en cubreobjetos con el LPS o LTA a los tiempos y dosis indicados para el ensayo y se fijaron por 30 minutos con 2% de formaldehído en PBS a 4°C y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Posteriormente se permeabilizaron durante 5 minutos con Tritón X-100 en PBS y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Para la visualización NF-kB las células se trataron durante 1 hr con anticuerpo anti-p50 diluidos en PBS, posteriormente se lavaron en cinco ocasiones con PBS. Las células se incubaron durante 30 minutos con anticuerpo IgG acoplado a rodamina (Santa Cruz Biotechnology) se utilizaron en dilución 1:100 en PBS a 4°C. Se hicieron cinco lavados con buffer de fosfato salino y se retiró la lenteja con el cultivo celular. Se colocó una gota de resina en un portaobjetos y se colocó la lenteja. Se cubrieron las muestras con papel aluminio y fueron mantenidas a una temperatura de 4°C. Se observaron las muestras en el microscopio confocal. Los experimentos se repitieron en dos ocasiones por separado. La primera condición de los experimentos se tomó como basal y corresponden estadísticamente al 100%.

Fosforilación del receptor TLR-4 mediante inmunomarcaje.

Con la finalidad de determinar si el LTA tenía interacción con TLR-4 se realizaron experimentos tipo curso temporal a 0, 5, 15, 30, 45 y 60 min con LTA 5 g/ml.

Las células se crecieron en cajas petri hasta confluencia se incubaron en medio Eagle modificado por Dulbecco libre de fosfatos y posteriormente se marcaron con [³²P] (50 Ci) durante tres hrs. Las células se tratan con LTA a diferentes tiempos. Se realizó el Wester blot y se utilizó un anticuerpo anti-TLR-4. El gel fue desecado. La radiografía se obtuvo exponiendo durante 10 min y se reveló. Los experimentos se realizaron por duplicado. La primera condición de los experimentos se tomó como basal y corresponden estadísticamente al 100%.

Análisis de datos y estadístico:

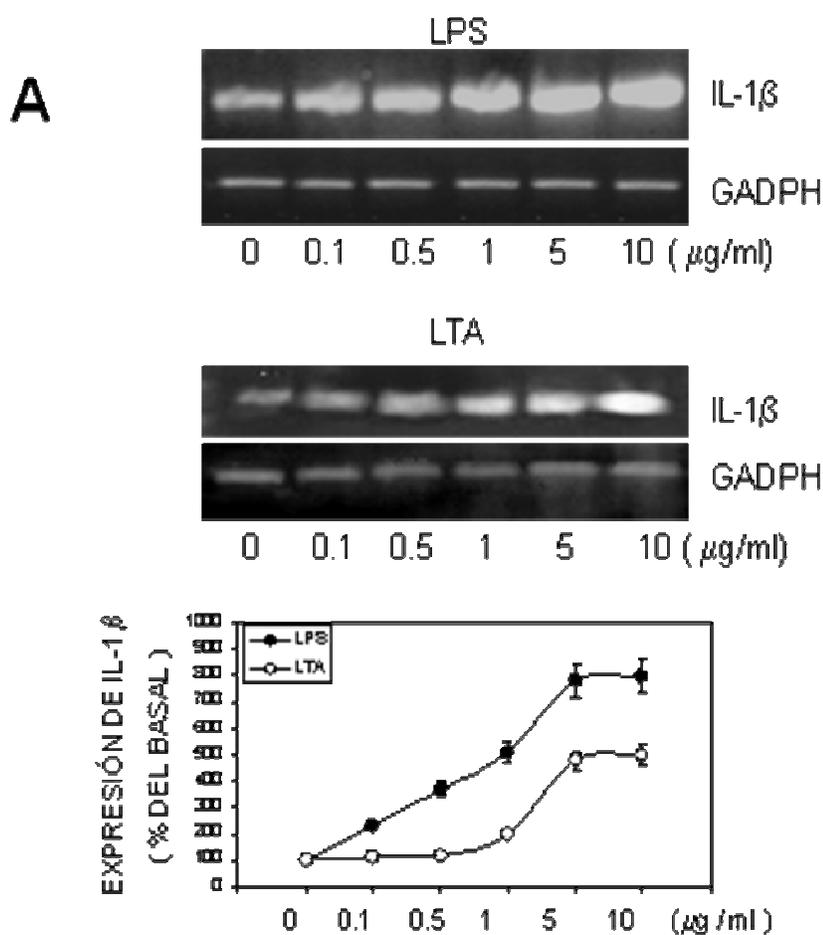
Los experimentos se analizaron con el software Labworks el cual obtiene la densidad óptica. Se obtuvo el promedio de los experimentos y se compararon con el control de cada caso, el cual se tomó como el 100% del basal. Los datos presentados corresponderán a la media \pm error estándar del número de observaciones. Posteriormente se hizo un análisis estadístico tipo t-de Student y se obtuvo la diferencia de cada variable con respecto al control. Las diferencias entre las medias se consideraran significativas cuando $p < 0.05$.



13. RESULTADOS

LTA de *S. sanguis* o LPS de *A. actinomycetemcomitans* estimulan la expresión de IL-1 β en fibroblastos gingivales humanos.

Se observó un aumento en la expresión de IL-1 β al tratamiento con LPS a partir de una dosis de 0.1 μ g/ml para LPS y de 0.5 μ g/ml para LTA (Fig 1A). De la misma forma se observa un aumento en la expresión de IL-1 β a partir de 24 hrs para LPS (1 μ g/ml) y de 12 hrs para LTA (5 μ g/ml) (Fig. 1B). Con la finalidad de determinar si LTA bloquea la expresión de IL-1 β inducida por LPS, se realizó el tratamiento con LTA en diferentes concentraciones por 30 min y posterior a esto se incubó el LPS (1 μ g/ml) durante 24 hrs (Fig 1C). Los resultados demuestran una disminución en la expresión de IL-1 β inhibida por LTA.



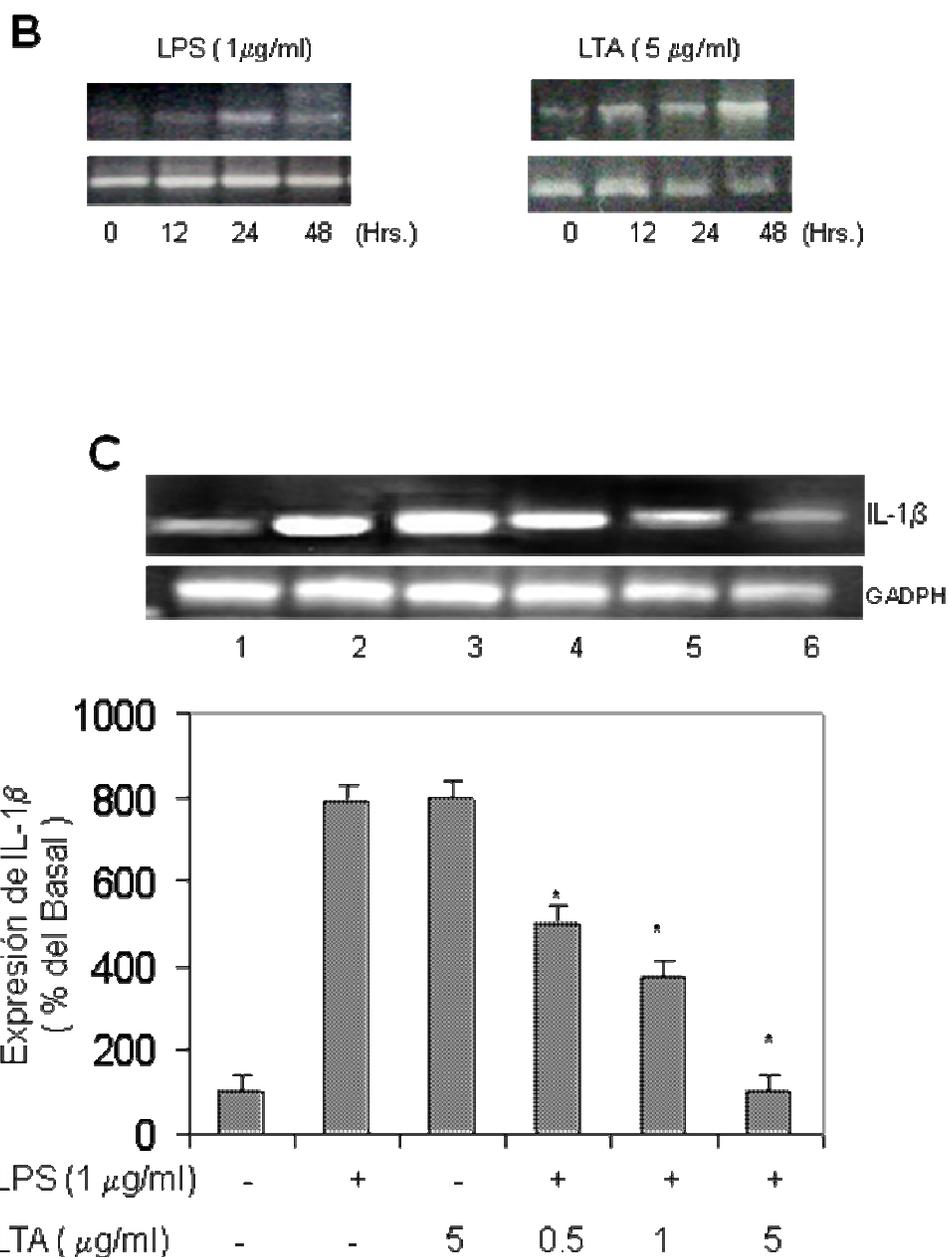
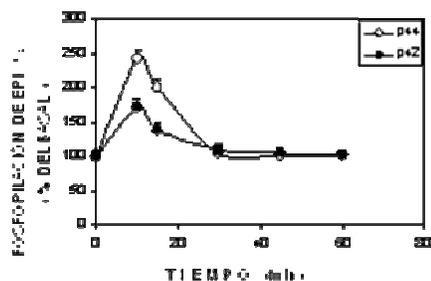
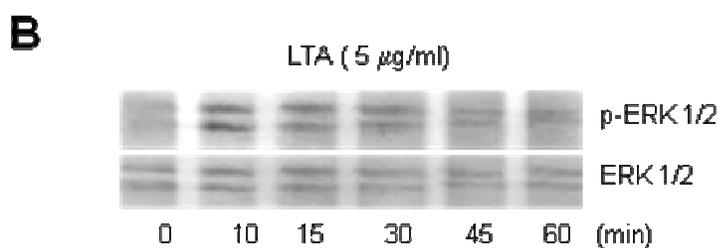
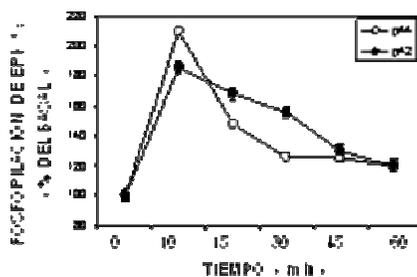
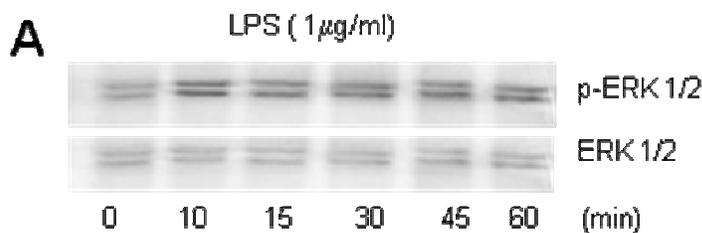


Fig. 1 EFECTO DEL LPS Y LTA SOBRE LA EXPRESIÓN DE IL-1 β . Las células se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la confluencia. A) Se trataron con diferentes dosis de LPS por 24 hrs o LTA por 48 hrs; B) Las células fueron incubadas en presencia de LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) o LTA (5 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos, C) Se incubaron en las siguientes condiciones: 1)Basal, 2) LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) por 24 hrs. 3) LTA (5 $\mu\text{g/ml}$) por 24 hrs 4) Pretratamiento con LTA (0.5 $\mu\text{g/ml}$)por 30 minutos + LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) por 24 hrs; 5) Pretratamiento con LTA (1 $\mu\text{g/ml}$) por 30 min+ LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) por 24 hrs; 6) LTA (5 $\mu\text{g/ml}$) por 30 min +LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 hrs. Al término de la reacción se extrajo el RNAse preparó para la reacción de RT-PCR



LTA de *S. sanguis* o LPS de *A. actinomycetemcomitans* estimulan la fosforilación de ERK 1/2.

Los resultados indican un aumento en el patrón de fosforilación dependiente del tiempo, sostenido a mayor tiempo para LPS. Indicando que tanto el LPS (Fig. 2A) como LTA (Fig. 2B) inducen la fosforilación de ERK 1/2 en fibroblastos gingivales humanos. Para saber si el LTA bloquea el patrón de fosforilación de ERK 1/2 inducido por LPS. Las células se trataron durante 30 minutos con diferentes dosis de LTA al término se incubó con LPS (1 μ g/ml) durante 10 min. Los datos demuestran una disminución en la fosforilación de ERK 1/2 observándose una disminución significativa a partir de una concentración de 1 μ g/ml (Fig. 2C).





C

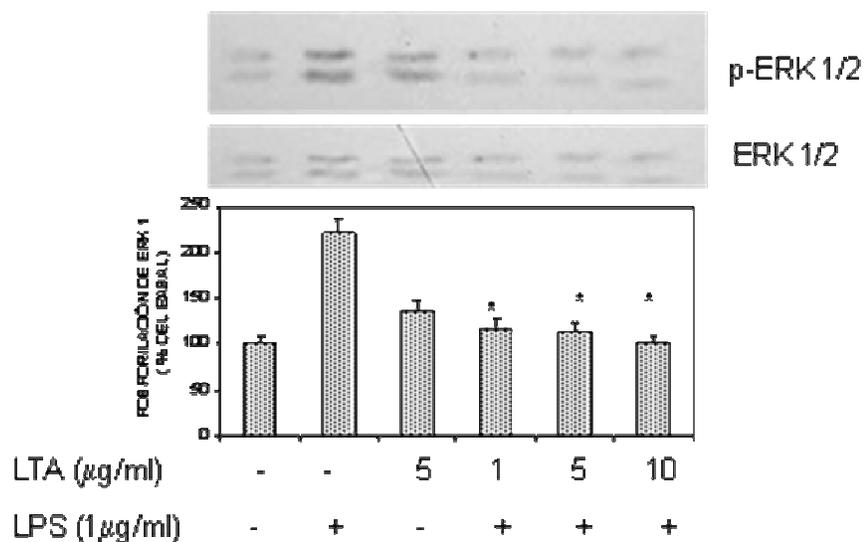


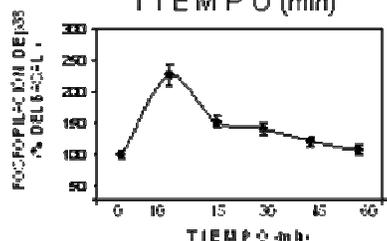
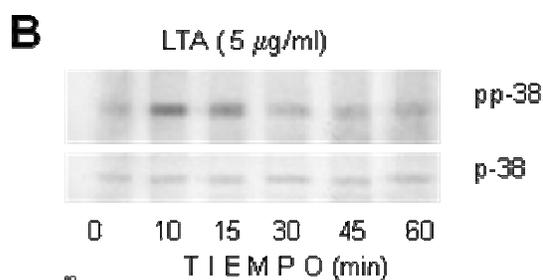
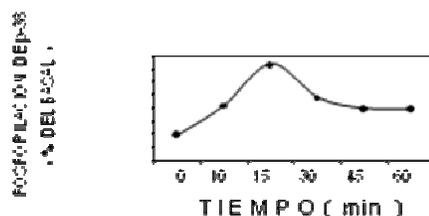
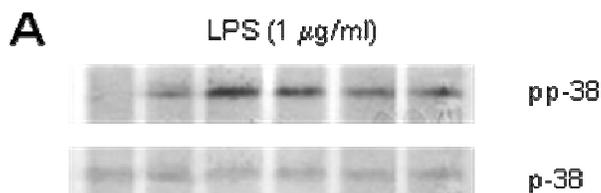
Fig. 2 EFECTO DE LPS Y LTA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE ERK 1/2. Las células fueron incubadas en presencia de A) LPS ($1\mu\text{g/ml}$) o B) LTA ($5\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos C) Las células fueron incubadas con LPS ($1\mu\text{g/ml}$) o LTA ($5\mu\text{g/ml}$) y se realizaron tratamientos con LTA a diferentes concentraciones durante 30 min y terminado el tiempo se adiciono LPS ($1\mu\text{g/ml}$) durante 10 min .



LTA de *S. sanguis* o LPS de *A. actinomycetemcomitans* estimulan la fosforilación de p38.

Los resultados indican un aumento en el patrón de fosforilación dependiente del tiempo. Indicando que tanto el LPS (Fig. 3A) como LTA (Fig. 3B) inducen la fosforilación de p-38 en fibroblastos gingivales humanos.

Para saber si el LTA bloquea el patrón de fosforilación de p-38 inducido por LPS, las células se trataron durante 30 minutos con diferentes dosis de LTA y al término se incubaron con LPS (1 μ g/ml) durante 10 min. Los datos demuestran una disminución en la fosforilación de p38 significativa a partir de una concentración de 1 μ g/ml de LTA (Fig. 3C).



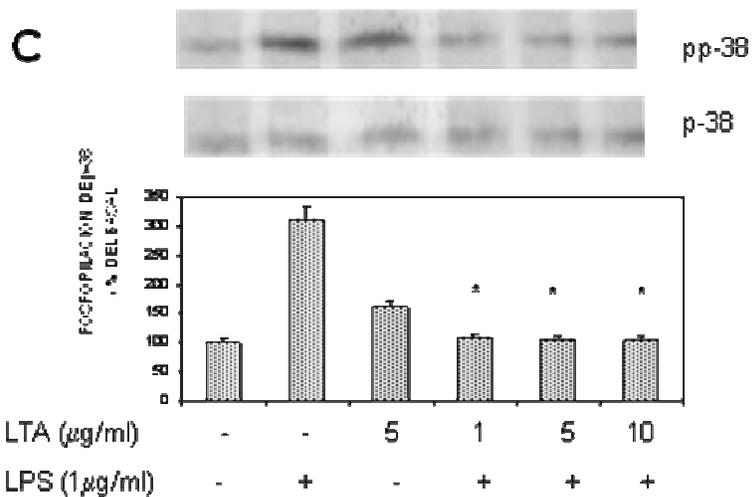


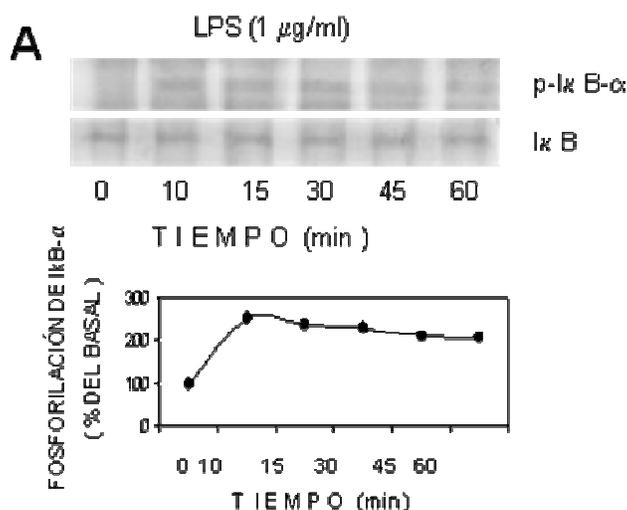
Fig. 3 EFECTO DE LPS Y LTA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE p 38. Las células fueron incubadas en presencia de A) LPS ($1\mu\text{g/ml}$) y B) LTA ($5\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos. C) Las células fueron incubadas con LPS ($1\mu\text{g/ml}$) o LTA ($5\mu\text{g/ml}$) y se realizaron tratamientos con LTA a diferentes concentraciones durante 30 min y terminado el tiempo se adiciono LPS ($1\mu\text{g/ml}$) durante 10 min .

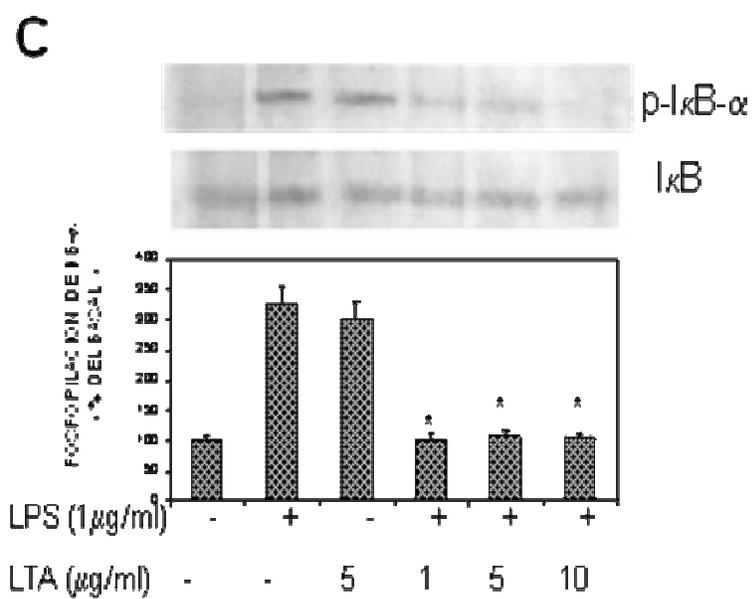
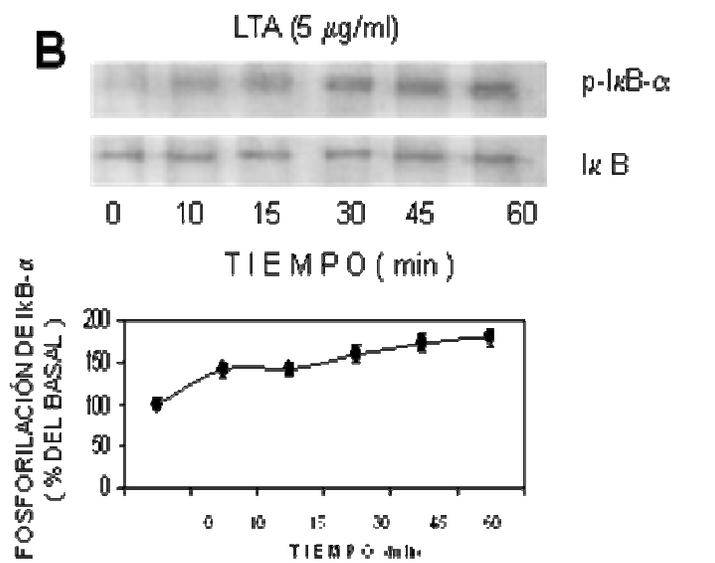


LTA de *S. sanguis* y LPS de *A. actinomycetemcomitans* estimulan la fosforilación de I κ B- α y la translocación de NF- κ B al núcleo.

Los resultados indican un aumento en el patrón de fosforilación dependiente del tiempo. Indicando que tanto el LPS (Fig. 4A) como LTA (Fig. 4B) inducen la fosforilación de p-I κ B en fibroblastos gingivales humanos. Sin embargo la cinética de fosforilación es distinta a lo encontrado en la fosforilación de ERK 1/2 y p38, ya que en este caso el LTA mantiene un patrón de fosforilación a tiempos mayores. Para saber si el LTA bloquea el patrón de fosforilación de p-I κ B inducido por LPS. Las células se trataron durante 30 minutos con diferentes dosis de LTA al término se incubó con durante 10 min (1 μ g/ml).

Los datos demuestran una disminución en la fosforilación de p-I κ B- observándose una disminución significativa a partir de una concentración de 1 μ g/ml (Fig. 4C). Para determinar si LTA Y LPS inducen la translocación de NF- κ B al núcleo se estimulo con LPS y LTA. Para determinar el efecto de LTA sobre la acción del LPS se incubaron las células con LTA 30 minutos y posteriormente 10 min con LPS 1 μ g/ml. Los resultados demuestran que LTA bloquee los efectos de translocación de NF- κ B inducidos por LPS. (Fig. 4D)







D) NF- κ B

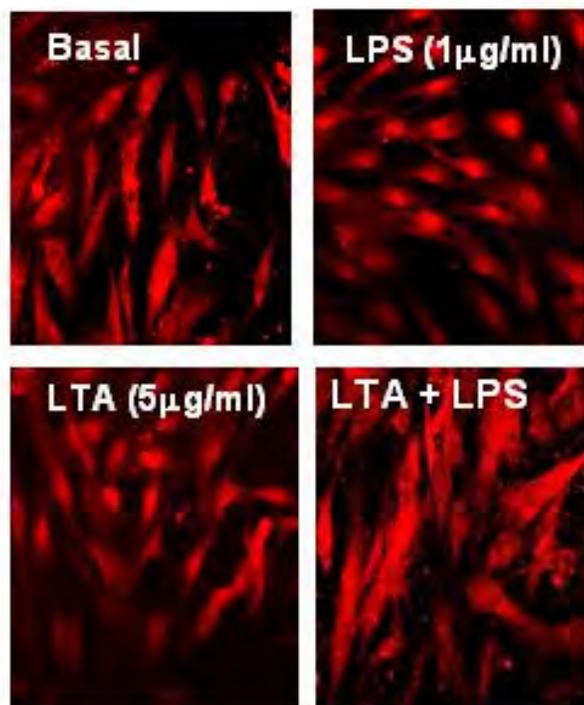


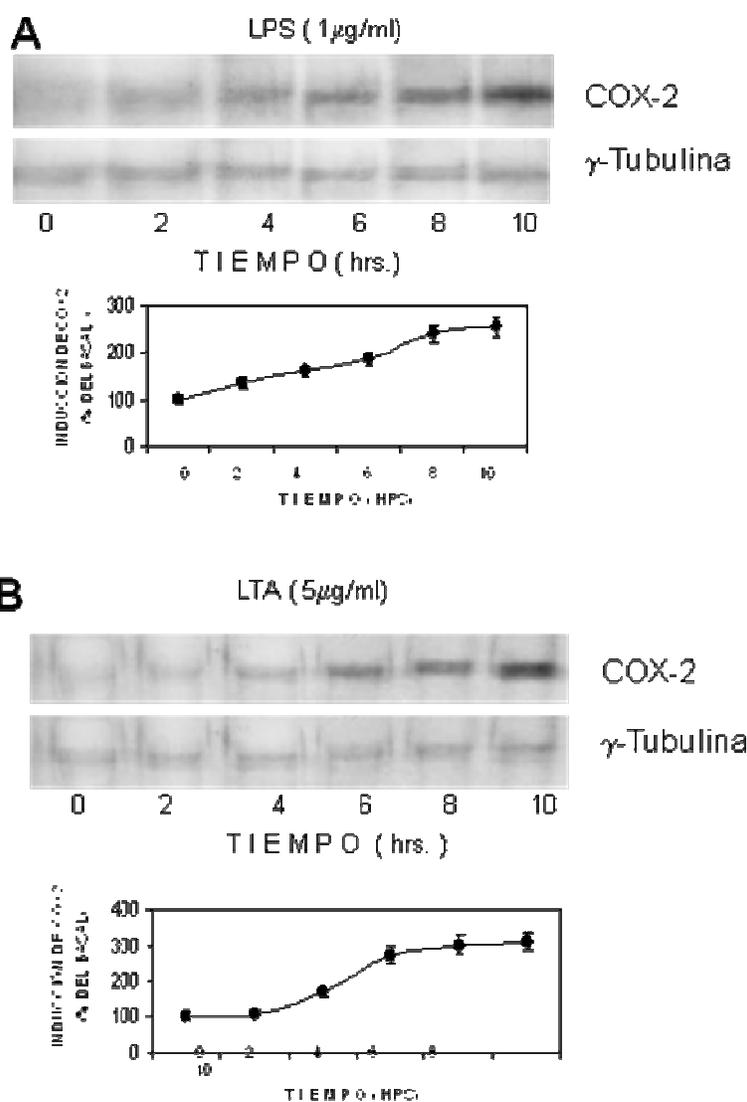
Fig. 4 EFECTO DE LPS Y LTA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE I κ B- α y TRANSLOCACIÓN DE NF- κ B. Las células fueron incubadas en presencia de A) LPS (1 μ g/ml) y B) LTA (5 μ g/ml) a diferentes tiempos. C) Las células fueron incubadas con LPS (1 μ g/ml) o LTA (5 μ g/ml) y se realizaron tratamientos con LTA a diferentes concentraciones durante 30 min y terminado el tiempo se adiciono LPS (1 μ g/ml) durante 10 min. D) Las células se crecieron y trataron para observar de NF- κ B (p50). Basal: En ausencia de tratamiento; LPS (1 μ g/ml) por 10 minutos, LTA (5 μ g/ml) durante 10 minutos, LTA + LPS) Tratamiento con LTA (5 μ g/ml) por 30 minutos + LPS (1 μ g/ml) por 10 minutos.



LTA de *S. sanguis* y LPS de *A. actinomycetemcomitans* estimulan la expresión de COX2 en fibroblastos gingivales humanos.

Los resultados indican un aumento en la expresión de COX-2 dependiente del tiempo. LPS induce su expresión a las 4 hrs de tratamiento, mientras que LTA lo hace a las 8 hrs. Indicando que tanto el LPS (Fig. 5A) como LTA (Fig. 5B) inducen la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos.

Con la finalidad de determinar si LTA inhibe la expresión de COX-2 inducida por LPS, se realizó el tratamiento con LTA en diferentes concentraciones por 30 minutos y posterior a esto se incubo el LPS durante 4 horas. Los resultados (Fig. 5C) demuestran que LTA bloquea la expresión de COX-2 a partir de una concentración de 1 μ g/ml.



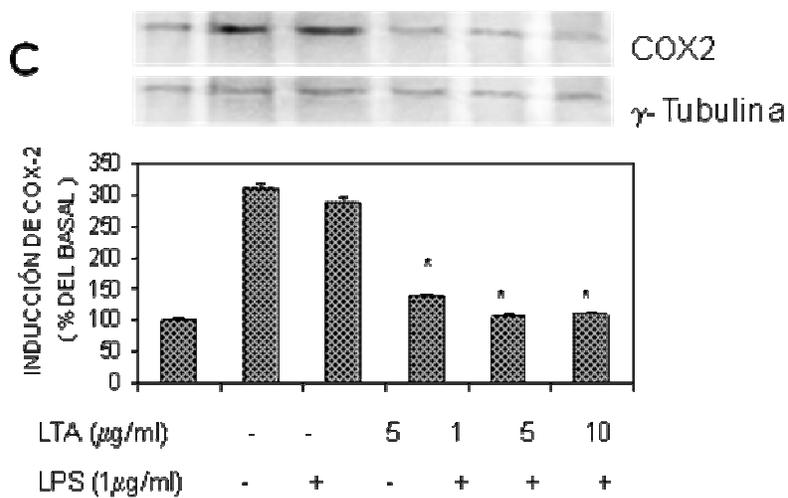


Fig. 5 EFECTO DE LPS Y LTA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA-2. Las células fueron incubadas en presencia de A) LPS ($1\mu\text{g/ml}$) y B) LTA ($5\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos C) Las células fueron incubadas en ausencia de agente o con LPS ($1\mu\text{g/ml}$) o LTA ($5\mu\text{g/ml}$) Las células se pretrataron con diferentes dosis de LTA por 30 minutos y posteriormente con LPS ($1\mu\text{g/ml}$) por 4 hrs.



LTA de *S. sanguis* estimulan la fosforilación de TLR4 en fibroblastos gingivales humanos.

Los TLRs son una familia de receptores que están asociados al reconocimiento de patógenos. TLR 2 reconoce a LTA y se ha reportado que TLR4 reconce a LPS. Para determinar el efecto LTA sobre TLR4 se efectuó el tratamiento con LTA 5mg/ml, a 5,15, 30, 45 y 60 minutos.

Los resultados muestran que el LTA propicia la fosforilación del receptor TLR4 de manera dependiente del tiempo (Fig. 6).

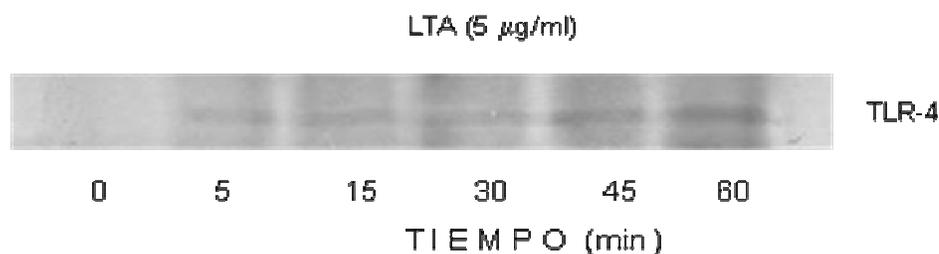


Fig 6. FOSFORILACIÓN *IN VIVO* DEL RECEPTOR TLR-4. Las células se crecieron en cajas petri, hasta confluencia se marcaron con [³²P] (50 µCi) durante 3 hrs. A) Las células se incubaron a diferentes tiempos con LTA (5µg/ml) B) Las células se crecieron en lantejas se trataron con LTA (5µg/ml) por 30 minutos y se procesaron con anticuerpo TLR-4.

14. DISCUSIÓN



La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica en la cual los efectos nocivos de los productos bacterianos repiten un ciclo interminable agente causal-enfermedad, ya que es la inflamación producida por los productos bacterianos, la responsable de la activación de proteínas que remodelan el tejido periodontal y promueven la resorción ósea, dando como consecuencia perdida de la inserción del ligamento periodontal, a los órganos dentarios y también la perdida de soporte de estos.^{1,3,4,9,43}

Las principales bacterias relacionadas con las enfermedades periodontales son microorganismos gramnegativos, facultativos, capnófilos o anaerobios, que están asociados a una placa madura. Y por otra parte, estudios clínicos indican que sitios con valores altos de *C. ochracea* y *S. sanguinis* se relacionan con mayor incremento del nivel de inserción luego del tratamiento periodontal. Estas especies son grampositivas y se encuentran en etapas tempranas en la formación de la placa dentobacteriana.¹

Las propiedades de los LPS de Gram-negativos y de los ácidos lipoteicoicos (LTA) de los microorganismos Gram-positivos son numerosas. Se ha demostrado que los TLRs son los responsables del reconocimiento de estructuras bacterianas en macrófagos, fibroblastos gingivales humanos y neutrófilos, ya que el sistema de defensa del huésped emplea a estos receptores como receptores de reconocimiento a patógenos, desencadenando una serie de cascadas de señalización intracelular que tiene como productos la expresión de IL-1B, TNF, etc.^{5,6,13}

En investigaciones anteriores se ha reportado que el ácido lipoteicoico actúa como un antagonista del lipopolisacárido dependiente de CD14 en fibroblastos gingivales humanos y monocitos, disminuyendo la expresión de IL-8³⁴.

En esta investigación decidimos estudiar el efecto del LTA de *Streptococcus sanguis* en fibroblastos gingivales y determinar si este ligando inhibe la respuesta inducida por el LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en HGF. Nosotros demostramos en este estudio que el LTA tiene efectos antagónicos sobre los mecanismos de transducción del LPS.

La activación de la familia de las MAPK es una de las más rápidas repuestas celulares que estimulan diferentes mecanismos, entre ellos la expresión de IL-1B. Esta incrementa los niveles de prostaglandinas y estimula la producción de COX2.

Entre los genes que se expresan por ligandos como el LTA o LPS en diversos tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células epiteliales, células Kupffer y HGF se encuentran citocinas proinflamatorias como IL-1B y PGE2^{11,13,16}.

Por otra parte la ciclooxigenasa es una enzima reguladora de la biosíntesis de prostanoídes y existe una isoforma constitutiva COX-1, responsable de los niveles fisiológicos de prostaglandinas y una isoforma inducible COX-2 expresada de forma rápida y temprana inducida después de un estímulo proinflamatorio, COX-2



es expresada por células inflamatorias y es la responsable de los altos niveles de prostaglandinas en enfermedades inflamatorias crónicas¹¹. Nosotros encontramos que estas moléculas se inducen al estimular HGF con LTA y LPS y que el LTA bloquea la expresión de estas moléculas cuando las células se incuban en previamente con este y posteriormente con LPS.

Una de las vías implicadas en procesos de proliferación, apoptosis y diferenciación celular es la vía de MAPK. ERK1/2 se distribuyen en toda la célula, pero bajo un estímulo, una población significativa de ERK1/2 tiende a acumularse en el núcleo. Mientras que los mecanismos implicados en la acumulación nuclear de ERK1/2 siguen siendo inciertos, la retención nuclear, la dimerización, la fosforilación, y el incremento citoplasmático, ha demostrado tener una función. Los mecanismos de señalización de ERK1/2 tienen efectos sobre la regulación de la proliferación de celular^{15,16}.

La cinasa p38 perteneciente a la familia de MAPK, muestra estar tanto en el núcleo como el citoplasma de la célula. Algunas evidencias sugieren que después de la activación p38 esta se transloca del citoplasma al núcleo, pero otros datos indican que p38 tiene actividad en el citoplasma. p38 participa en quimiotaxis, exocitosis granular, adherencia y apoptosis entre otras funciones. Algunas investigaciones, señalan que el ácido lipoteicoico induce la activación de ERK 1/2 y p38.^{16,18,19} Nosotros mostramos por primera ocasión que el LTA de *S. sanguis* activa estas cinasas en HGF. La cinética de activación de estas cinasas por el LTA es similar a lo que ocurre en otros tipos celulares^{19,32}.

NF- κ B esta predominantemente localizado en el citoplasma, esta en forma de complejo unido a un miembro de la familia de I κ B (inhibidor de NF- κ B), I κ B puede regular la actividad de NF- κ B. El incremento de NF- κ B derivado del desacoplamiento de la proteína I κ B es un paso importante en expresión eficiente de NF- κ B, este es un factor de transcripción implicado en la sobrevivencia celular, y la modulación en la expresión de COX2, TNF y MMP-9^{26,27,28}. Nuestros resultados demuestra que LTA y LPS promueven la fosforilación de de I κ B- y la translocación de NF- κ B al núcleo, eventos que se ven bloqueados por el previo tratamiento de LTA sobre la acción de LPS.

Los receptores tipo toll (TLRs) han sido estudiados ampliamente y se siguen reportando su papel en al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos. Una característica de estos receptores es que pueden formar dímeros. Se sabe que LPS tiene como receptor a TLR4 y que LTA tiene como receptor a TLR2^{5,6}. Un blanco importante en la enfermedad periodontal son los fibroblastos gingivales humanos, los cuales han demostrado expresar TLRs 1,2,3,4,5,6 y 9, de los cuales el TLR-4 reconocer al LPS y el TLR-2 a LTA, activando una series de cascadas de señalización que promueven la remodelación de tejidos y la resorción ósea³¹.

Tratando de investigar el efecto que tiene el LTA sobre los receptores TLR-4 se marcaron fibroblastos gingivales humanos con [32Pi] y se trataron con LTA a diferentes tiempos. Observamos un patrón de fosforilación de manera dependiente



del tiempo, sin embargo se deberán realizar un mayor número de experimentos para corroborar estos datos.

Finalmente la forma en la que los mecanismos de transducción que se activan como respuesta del huésped en la enfermedad periodontal requieren de finos mecanismos regulatorios que están influenciados de forma multifactorial. De tal modo que el estudio estas cascadas de señalización proveen de herramientas necesarias para entender dichos mecanismos y desarrollar nuevos fármacos que sean eficaces en el tratamiento de la enfermedad periodontal.



15. CONCLUSIONES.

En conclusión en este trabajo se determinó que tanto el ácido lipoteicoico como el lipopolisacárido inducen la expresión de IL-1B y ciclooxigenasa-2 (COX-2). También se observa la fosforilación de ERK 1/2, p38, I κ B- y la translocación de NF- κ B al núcleo. Por otra parte el tratamiento previo con LTA, bloquea los eventos de fosforilación que desencadena el lipopolisacárido tanto para la fosforilación de las cinasas ERK 1/2, p38, I κ B- , así como la translocación de NF- κ B al núcleo.

Por otra parte en experimentos realizados marcando con [32 Pi] se observa que el ácido lipoteicoico induce la fosforilación del receptor Toll tipo-4 de una forma rápida y sostenida.

De acuerdo a lo anterior se demostró que el LTA de *S. sanguis* actúa como antagonista y agonista parcial de LPS de *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* en fibroblastos gingivales humanos.



16. REFERENCIAS HEMEROGRÁFICAS Y BIBLIOGRÁFICAS.

1. Carranza FA, Neuman MG, Takei HH. Periodontología Clínica. 9ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004. 18-425.
2. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Good IJ, Smith EP, Ranney RR, Palcanis KG. Variation in Periodontal Floras. *Infect Immun*. 1984; 46(3):720-6.
3. Lindhe J. Periodontología clínica e implantología odontológica. 4ª. Ed. México: Médica Panamericana; 2005. 103-204.
4. Fujise O, Wang Y, Chen C. Adherence of *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* via serotype-specific polysaccharide antigen in lipopolysaccharides. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 226-33
5. Majewska M, Szczepanik M. The role of toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation. *Postepy Hig Med Dosw*. 2006; 60: 52-63
6. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in Human Gingival Fibroblasts. *J Dent Res*. 2007; 86 (3):249-254
7. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, and Cunha FQ. Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. *J Dent Res*. 2007; 86(4):306-319
8. Ira B. Lamster. Antimicrobial mouthrinses and the management of periodontal diseases: Introduction to the supplement. *J Am Dent Assoc*. 2006;137:5-9
9. Wolf HF, Rateitschak-Pluss E, Rateitschak KH. Color Atlas of Periodontology. Barcelona España. Ed Masson,S.A. 3ª ed. 2005; 27-59.
10. Rose LF, Mealey BL, Genco RJ, Cohen W. Philadelphia USA. Ed Elsevier Mosby, Inc. 2004. 30-97
11. Cutler CW, Jotwani R. J Dendritic Cells at the Oral Mucosal Interface. *J Dent Res*. 2006; 85(8):678-689.
12. Caivano M, Rodríguez C, Cohen P, and Alemany S. 15-Deoxy.D 12,14-prostaglandine J2 regulates endogenous cot MAPK kinase 1 activity induced by lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2003; 278(52):52124-30.
13. Peng T, Lu X, Lei M, Feng Q. Endothelial nitric-oxide synthase enhances lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha expression via cAMP-mediated p38 MAPK pathway in cardiomyocytes.. *J Biol Chem*. 2003; 278(10):8099-105.
14. Zhao Q, Shepherd EG, Manson ME, Nelin LD, Sorokin A, Liu Y. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2005; 280(9):8101-8.
15. Chanteux H, Guisset AC, Pilette C, Sibille Y. LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinases- and Sp1-dependent mechanisms. *Respir Res*. 2007; 8:71.
16. Schröder NW, Pfeil D, Opitz B, Michelsen KS, Amberger J, Zähringer U, Göbel UB, Schumann RR. Activation of mitogen-activated protein kinases p42/44, p38, and stress-activated protein kinases in myelo-monocytic cells by *Treponema lipoteichoic acid*. *J Biol Chem*. 2001; 276(13):9713-9.



17. Dahle MK, Øverland G, Myhre AE, Stuestøl JF, Hartung T, Krohn CD, Mathiesen Ø, Wang JE, Aasen AO. The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is activated by lipoteichoic acid and plays a role in Kupffer cell production of interleukin-6 (IL-6) and IL-10. *Infect Immun.* 2004;72(10):5704-11.
18. Hsiao G, Huang HY, Fong TH, Shen MY, Lin CH, Teng CM, Sheu JR. Inhibitory mechanism of YC-1 and PMC in the induction of iNOs expression by lipoteichoic acid in Raw 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(7):1411-9.
19. Kao SJ, Lei HC, Kuo CT, Chang MS, Chen BC, Chang YC, Chiu WT, Lin CH. Lipoteichoic acid induces nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages. *Immunology.* 2005;115(3):366-74.
20. Lee CW, Chien CS, Yang CM. Lipoteichoic acid-stimulated p42/p44 MAPK activation via Toll-like receptor 2 in tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(5):L921-30
21. Arndt PG, Suzuki N, Avdi NJ, Malcolm KC, Worthen GS. Lipopolysaccharide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation in human neutrophils: role of phosphatidylinositol 3-Kinase and Syk-mediated pathways. *J Biol Chem.* 2004;279(12):10883-91.
22. Hsu LC, Park JM, Zhang K, Luo JL, Maeda S, Kaufman RJ, Eckmann L, Guiney DG, Karin M. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature.* 2004;428(6980):341-5.
23. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor as adjuvant receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1589(1):1-13.
24. Nishiya T, DeFranco AL. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem.* 2004;279(18):19008-17.
25. Rhee SH, Jones BW, Toshchakov V, Vogel SN, Fenton MJ. Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22506-12.
26. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 2002;420(6913):324-9.
27. Putnins EE, Sanaie AR, Wu Q, Firth JD. Induction of keratinocyte growth factor 1 Expression by lipopolysaccharide is regulated by CD-14 and toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2002;70(12):6541-8.
28. Li X, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Rhodes CJ, Harlan JM. Phosphoinositide 3 Kinase Mediates Toll-Like Receptor 4-Induced Activation of NF-kb in Endothelial Cell. *Infect Immun.* 2003;71(8):4414-20.
29. Matsuguchi T, Masuda A, Sugimoto K, Nagai Y, Yoshikai Y. JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS-mediated JNK activation. *EMBO J.* 2003;22(17):4455-64.
30. Strassheim D, Asehounne K, Park JS, Kim JY, He Q, Richter D, Kuhn K, Mitra S, Abraham E. Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in



inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. *J Immunol.* 2004;172(9):5727-33.

31. Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie.* 2006; 88(9):1091-8.

32. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):320-44.

33. Molina-Holgado E, Ortiz S, Molina-Holgado F, Guaza C. Induction of COX-2 and PGE (2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. *Br J Pharmacol.* 2000;131(1):152-9.

34. Mahanonda R, Sa-Ard-lam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, Pichyangkul S. IL-8 andIDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol.* 2007;178(2):1151-7.

35. Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv Immunol.* 2007;95:167-255.

36. Smith MR, Standiford TJ, Reddy RC. PPARs in Alveolar Macrophage Biology. *PPAR Res.* 2007;2007:23812.

37. Del Fabbro M, Francetti L, Pizzoni L, Rozza R, Weinstein RL. Neutrophil physiology: role and mechanism of action in the immune response at gingival level. 2000;49(5):227-48.

38. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 2008;13:2400-7.

39. Haynes NM. Follicular associated T cells and their B-cell helper qualities. *Tissue Antigens.* 2008;71(2):97-104.

40. Igarashi K, Ochiai K, Muto A. Architecture and dynamics of the transcription factor network that regulates B-to-plasma cell differentiation. *J Biochem.* 141(6):783-9.

41. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol.* 2001;45(5-6):695-706.

42. Gómez de Ferraris M. Campos Muñoz A: *Histología y embriología bucodental.* 1ª. Ed. Madrid: Editorial Panamericana, 1999.

43. Grzesik WJ, Narayanan. Cementum and periodontal woundhealing and regeneration. *AS Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(6):474-84.

44. Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype?. *J Dent Res.* 2005;84(5):390-406.

45. Berkovits KB, Holland GR *Atlas en color y texto de anatomia oral histlogía y embriología.* Ed Elsevier. España 1995.

46. Havemose-Poulsen A, Holmstrup P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):217-36.

47. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.

48. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-22



49. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000.2002;28:12-55..
50. Landa AS. Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Adv Dent Res* 2004; 11:528-38.
51. Baehni PC. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis* 2003; 9 Suppl 1:23-9.
52. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
53. Chen C. Periodontitis as a biofilm infection. *J Calif Dent Assoc* 2001;29:362-9.
54. Liébana Ureña J. *Microbiología Oral*. Edit. Mc. Graw- Hill Interamericana. México 1997.
55. Slots Jorgen and Taubman A. Martin. *Contemporary oral and Immunology*. Mosby Year Book, USA .1992. 20-213
56. Okeson. J.P. *Tratamiento de oclusión y Afecciones Temporomandibulares 4ª.Edición*. Madrid España. Editorial. Harcourt Brace/Mosby. 2003.10-77
57. Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis subgingival presence, species-specific serum immunoglobulin G antibody levels, and periodontitis disease recurrence. *J Periodontal Res.* 2006;41(3):228-34.
58. Burrell RC, Walters JD. Distribution of Systemic Clarithromycin to Gingiva. *J Periodontol.* 2008; 79(9): 1712-18.
59. Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. Actinobacillus actinomycetemcomitans. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51: 1013–1020
60. Johansson A, Buhlin K, Koski R, Gustafsson A. The immunoreactivity of systemic antibodies to Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in adult periodontitis. *Eur. J Oral Sci.* 2005; 113: 197-202
61. Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen Ac tinobacillus Actinomycetemcomitans. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003; 57: 29-55
62. Alexander C, Rietschel E. Bacterial Lipopolysaccharides and Innate Immunity. *J Endot Reser* 2001; 7(3): 167-202.
63. Gloria Gutiérrez Venegas y Patricia Cardoso Jiménez. Ácido lipoteicoico: receptores y mecanismos de transducción. *REB.* 2006; 002: 41-49
64. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 2008;118(2):413-20.
65. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2007;86(3):249-54.
66. Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(4):637-46.
67. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.*2005; 77(6):886



-
68. Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* 2002;3(8):3011.1-6
 69. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):12-9.
 70. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovani A. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(5):563-6.
 71. Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(2):199-207