

11A
2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

LA ADHERENCIA DE *Actinobacillus actinomycetemcomitans* INDUCE LA ACTIVACION DE SEÑALES INTRACELULARES EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANA DENTISTA
PROGRAMA DE TITULACION POR ALTO PROMEDIO
P R E S E N T A :
CARLA PORTILLO GARCES

TUTOR: DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS
ASESORES: DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON,
DR. JOSE MOLINA LOPEZ



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

SIN

PAGIMACION



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

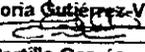
La presente investigación se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología. UNAM
Bajo la Dirección de la Dra. Gloria Gutiérrez-Venegas.

Proyecto Financiado por D.G.A.P.A. proyecto IN224398

Asesor del Tema:


Dra. Gloria Gutiérrez-Venegas.

Sustentante:


Carla Portillo Garcés

"La adherencia de Actinobacillus actinomycetemcomitans induce la activación de señales intracelulares en fibroblastos gingivales humanos".

Con el siguiente Jurado:

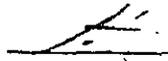
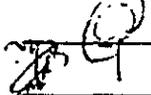
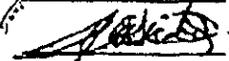
PRESIDENTE : Q.F.B. FERNANDO FRANCO MARTINEZ

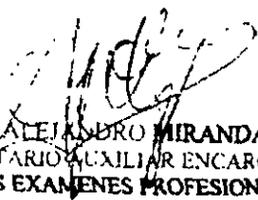
VOCAL : DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS

SECRETARIO : C.D. LUZ DEL CARMEN GONZALEZ GARCIA

SUPLENTE : M.C. JAIME ESQUIVEL SOTO

SUPLENTE C.D. MARIA DE LOURDES SUAREZ ROA


MTRO. ALEJANDRO MIRANDA GOMEZ
SECRETARIO AUXILIAR ENCARGADO DE
LOS EXAMENES PROFESIONALES

AGRADECIMIENTOS

- A La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (D.G.A.P.A) proyecto IN224398 por el apoyo financiero brindado para la realización de este proyecto.
- A los alumnos del laboratorio de Bioquímica Patricia Román y QFB. Luis Arturo Contreras por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.
- A los compañeros del Laboratorio de Bioquímica; en especial a Filiberto Hernández, Mauricio Peña y José Molina por su ayuda y compañerismo.
- A mi familia: A mi papá, a mi mamá, a mi hermana y a mi abuelo por su apoyo y paciencia. También le doy las gracias a mi tío Fidel por su ejemplo.
- Muy especialmente a la Dra. Gloria Gutiérrez por sus enseñanzas, por sus consejos y su amistad.

Í N D I C E

1. RESUMEN
2. ANTECEDENTES.
3. INTRODUCCIÓN.
 - 3.1 Periodonto
 - 3.1.1. Encía
 - 3.1.2. Cemento
 - 3.1.3. Ligamento periodontal
 - 3.1.4. Hueso alveolar
 - 3.2 Enfermedad periodontal
 - 3.2.1. Etiología
 - 3.2.2. Clasificación
 - Periodontitis del adulto
 - Periodontitis incipiente precoz
 - Periodontitis prepuberal
 - Periodontitis juvenil
 - Periodontitis rápidamente progresiva
 - Periodontitis refractaria
 - 3.3. Estructura y metabolismo bacteriano
 - 3.4. Adhesión bacteriana
 - 3.4.1. Estructura y metabolismo bacteriano
 - 3.4.2. Citoesqueleto celular
 - 3.3. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
 - 3.3.1. Morfología y fisiología
 - 3.3.2. Aspecto Clínico
4. OBJETIVOS
 - 4.1. Objetivo general
 - 4.1.1 Objetivos específicos
5. HIPÓTESIS
6. MATERIALES Y MÉTODOS
 - 6.1. Aislamiento y caracterización de *A. actinomycetemcomitans*
 - 6.1.1. Medios de cultivo
 - 6.1.2. Pruebas bioquímicas y tinción de gram
 - 6.2. Cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos
 - 6.3. Ensayo de adherencia
 - 6.4. Tinción de actina fluorescente
 - 6.5. Cuantificación de calcio intracelular
7. RESULTADOS
8. DISCUSIÓN
9. CONCLUSIONES
10. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN

Actinobacillus actinomycetemcomitans, es una bacteria crucial como un agente etiológico en la periodontitis juvenil y del adulto. La adherencia e invasión de esta bacteria gram-negativa en células epiteliales gingivales representa un paso importante en la patogénesis de la periodontitis, enfermedad que se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente y resorción de hueso alveolar.

En esta investigación se estudió la adherencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a fibroblastos gingivales humanos así mismo se caracterizó el daño a citoesqueleto celular y cuantificó la movilización de calcio intracelular en respuesta al fenómeno de la adherencia.

Mediante la técnica de tinción de GIEMSA se observó la adherencia de *A. actinomycetemcomitans* en cultivo celular primario de fibroblastos gingivales humanos, la máxima adherencia se determinó a las 6 horas de incubación, el ensayo se realizó en presencia o ausencia de manosa, los resultados muestran que no se alteró significativamente el patrón de adhesión de la bacteria a las células lo que nos sugiere que no participan fimbrias manosa dependiente en la adherencia.

En el ensayo de tinción de Actina Fluorescente (FAS) se observó daño al citoesqueleto de fibroblastos gingivales por la adherencia de *A. actinomycetemcomitans*.

Se observó que la presencia de la bacteria en los cultivos celulares promueve la movilización de la concentración de calcio intracelular detectada a través de fluorescencia utilizando el fluoróforo FURA 2 AM. Cuando se adicionan 27×10^6 bacterias se produce un aumento de 2 veces sobre la actividad basal y este aumento continua después de tres horas de incubarse con las bacterias. Afin de caracterizar si el aumento en la concentración de calcio intracelular provenía del retículo endoplasmático se utilizó dantrolene que es un inhibidor de esta poza de calcio los resultados obtenidos no fueron satisfactorios por la fluorescencia intrínseca de este compuesto.

Los resultados de esta investigación muestran a la bacteria *A. actinomycetemcomitans* como un patógeno importante que actúa sobre los fibroblastos gingivales humanos que en sus fases iniciales es capaz de adherirse a estas células, habría que explorar los mecanismos que emplea para la invasión celular, hasta desencadenar señales intracelulares como la reorganización del citoesqueleto y la movilización de calcio. Este estudio sugieren que *A. actinomycetemcomitans* es capaz producir daño a un importante componente del periodonto, la encía, y contribuir así en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

2. ANTECEDENTES

Desde hace mucho tiempo se ha establecido que la caries y la enfermedad periodontal ocasionan el 97% de las extracciones dentales. La pérdida dental causada por caries es mayor durante la niñez y adolescencia, así como la enfermedad periodontal se considera la causa principal de mortalidad dental durante la vida adulta. Al Cirujano Dentista le compete el conocimiento profundo de este padecimiento, el análisis de la etiología juega un papel muy importante debido a que es aquí donde podría encontrarse un punto en la prevención de la enfermedad.

Numerosas investigaciones se han dedicado al estudio de dicha enfermedad, pero aún quedan muchas interrogantes ante la vía de destrucción de los componentes del periodonto y el papel de las bacterias en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad.

Esta investigación va encaminada a conocer el comportamiento que tiene un componente primordial en el periodonto: los fibroblastos gingivales, ante la presencia de una bacteria que se ha relacionado con la enfermedad periodontal: *A. actinomycetemcomitans*.

Se estudiaron las señales intracelulares que *A. actinomycetemcomitans* desencadena tras adherirse a los fibroblastos gingivales humanos, como el daño al citoesqueleto celular y movilización de calcio.

El estudio Bioquímico que se realizó ayuda a esclarecer el daño que provocan las bacterias a los fibroblastos gingivales humanos. Con este estudio se abre un nuevo conocimiento en la etiopatología de esta bacteria en la periodontitis.

Se muestra además que el conocimiento Bioquímico es de suma importancia; es el punto de partida para el estudio de la serie de eventos que ocurren en las diferentes enfermedades bucales que presenta el paciente dentro de la clínica odontológica.

3. INTRODUCCION

La historia de la microbiología bucal es paralela a la de la microbiología de la enfermedad infecciosa en general. Muchos científicos han estudiado los microorganismos bucales para determinar su función en la enfermedad periodontal. Se sabe que la enfermedad periodontal es producida fundamentalmente por infecciones bacterianas, y los microorganismos causales se localizan sobre todo en la encía o en las bolsas periodontales. De aquí la importancia del conocimiento preciso acerca de la microbiota y de la interacción con los tejidos periodontales, esto hace necesario primeramente conocer la anatomía, estructura y bioquímica de los elementos que constituyen el periodonto, así mismo el estudio de determinados microorganismos involucrados con en la enfermedad periodontal y posteriormente enfatizar en los cambios que éstos provocan en los componentes del periodonto.

3.1. PERIODONTO

Se denomina periodonto (Fig. 1) al conjunto de tejidos que rodean y soportan al diente. La estructura periodontal comprende desde el punto de vista anatómico: ⁽²⁾⁽⁴⁰⁾

1. Encía o gingiva
2. Ligamento periodontal
3. Hueso alveolar
4. Cemento

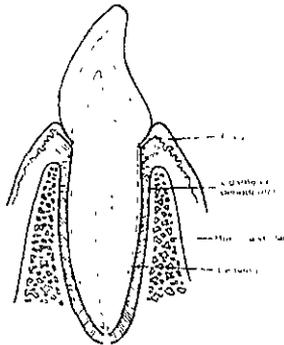


Figura 1. Corte vestibulolingual que muestra los elementos del tejido periodontal (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P.H y Pawlak E.A.)

3.1.1. ENCÍA O GINGIVA

La encía es el tejido blando adyacente al cuello dental; este tejido se adhiere al diente y reviste la porción de la corona del hueso alveolar. ⁽¹⁾⁽⁴⁰⁾ Anatómicamente se divide en:

Encía marginal: Es la parte de la gingiva situada alrededor del cuello dentario. Tiene normalmente alrededor de 1mm y forma la pared externa del surco gingival. Está dividida por la cresta del margen gingival en dos vertientes: una interna, que da contra el diente, y otra externa. La vertiente externa de la encía marginal se encuentra cubierta por un epitelio escamoso estratificado, que en la mayoría de los casos alcanza paraqueratinización y, con menos frecuencia, una queratinización completa. El epitelio de la vertiente interna carece de queratinización, esto obedece a procesos inflamatorios. La encía marginal se encuentra limitada en su extremo apical por el surco marginal, no siempre claramente visible, que la separa de la encía insertada o adherente.

Surco gingival: Es la hendidura virtual situada entre el diente y la encía marginal. Tiene una profundidad de 1 a 2 mm en caras libres y de 1 a 3 mm en caras proximales. Histológicamente, el surco está revestido de epitelio no queratinizado, que se extiende desde la cresta del reborde gingival hasta la zona más coronaria del epitelio de unión.

Encía insertada: Es la parte de la gingiva que se extiende entre la encía marginal y la mucosa oral de revestimiento de la que la separa la línea mucogingival. Está unida firmemente al diente y al hueso alveolar subyacente. Esta mucosa se caracteriza por su superficie lisa y de color más rojizo por la falta de queratinización, no suele ser tan resistente a la fricción. La encía insertada tiene una superficie punteada de color rosado y un ancho variable; es más ancha en el sector incisivo (3.5 a 4.5 mm) y disminuye hacia los sectores posteriores. Estas dimensiones son menores en la mandíbula. Por palatino la gingiva insertada se continúa sin límite divisorio con la mucosa palatina. Por lingual se continúa con la mucosa del piso de boca.

Papila gingival: Es la parte de la encía que se sitúa en el espacio interproximal creado por los dientes adyacentes en contacto. Puede ser deprimida en la zona central, debajo del punto de contacto, con dos papilas más elevadas en vestibular y lingual/palatino. La papila gingival está integrada por gingiva marginal y insertada en cantidades variables, de acuerdo con el tipo de contacto de los dientes contiguos. ⁽²⁾⁽⁴⁰⁾

La encía está constituida por un sector central de tejido conectivo fibroso cubierto por un epitelio escamoso estratificado. ⁽³⁾

Unión dentogingival: La encía se une al diente por medio de sus dos tejidos: epitelial y conectivo. El epitelio de unión se localiza en la porción apical al epitelio del surco y mide aproximadamente 1-2 mm de longitud. Este epitelio indica el nivel de la inserción histológica de la encía y está formado por la reunión del epitelio bucal con el epitelio reducido del esmalte durante la erupción dental.

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

Las células epiteliales basales se unen al tejido conectivo subyacente por medio de hemidesmosomas y una lámina basal. La unión del epitelio al esmalte o al cemento se hace por un medio similar que permite el desplazamiento de las células del epitelio de unión, que sufren un continuo recambio, hacia su descamación en el surco gingival, y el pasaje del fluido gingival. (Fig. 2)

Fluido gingival: El surco gingival y la unión epitelio-diente son bañados por un fluido gingival o crevicular, proveniente del tejido conectivo y que tiene una doble función: a) lavaje y arrastre mecánico de partículas tisulares o externas introducidas y b) defensa inmunitaria, por la presencia de anticuerpos. Se descubrió mediante análisis con inmunoelectroforesis que por lo menos siete proteínas plasmáticas diferentes están presentes en este líquido; se han identificado α -1 y α -2, así como β globulinas y γ globulinas y fibronectina. En la inflamación gingival, la velocidad del flujo hacia el exterior se incrementa; este líquido no se considera como un simple infiltrado de los tejidos con metabolismo normal, sino como exudado inflamatorio, debido a la casi invariable presencia de reacción inflamatoria en el margen gingival y de neutrófilos en el líquido del surco. El fluido gingival es de origen inflamatorio y existe también en gingivas clínicamente sanas. La cantidad del fluido gingival varía en relación directa con el grado de inflamación gingival.

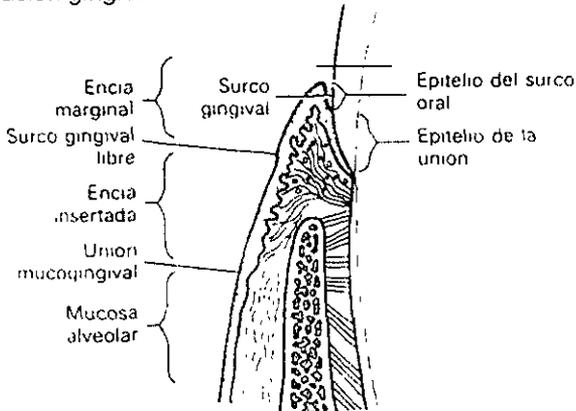


Figura 2. Corte histológico vestibulolingual del tejido periodontal en la cara facial del diente (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P H, y Pawlak E.A.)

Tejido conectivo gingival: El tejido conectivo está constituido fundamentalmente por:

- Fibras de colágeno. Las fibras de colágeno soportan el reborde gingival y lo mantienen unido al diente y al hueso alveolar subyacente. Las fibras de colágeno forman fuertes cordeles que unen y sostienen los tejidos, dando origen a unidades funcionales. Existen por lo menos cuatro tipos de colágena, que se diferencian de acuerdo con su composición de cadenas alfa, éstas se clasifican como α -1 y α -2, además, las cadenas α -1 se subdivide de acuerdo con la secuencia de aminoácidos a lo largo de su extensión, en "tipos" I a IV. La estructura básica de la colágena tipo I consta de tres cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí, formando la molécula básica de colágeno. Las moléculas se agregan por los lados, dando lugar a filamentos de colágeno que se acumula, a su vez, para formar la fibrilla de colágeno. Las fibras de colágeno de la encía están compuestas por numerosas fibrillas, unidas entre sí por los proteoglicanos. ⁽⁴⁶⁾
- Sustancia fundamental intercelular. Esta entidad esta formada principalmente por mucopolisacáridos y glucoproteínas. Estas sustancias contribuyen a la regulación de la distribución del agua, electrolitos y metabolitos en los tejidos.
- Células. La célula principal es el fibroblasto (Fig.3), que sintetiza colágena, elemento básico del tejido conectivo; otras células son mesenquimatosas indiferenciadas, mastocitos y macrófagos.



Figura 3 Micrografía electrónica de un fibroblasto. N. núcleo M. Mitocondria. G. Complejo de Golgi. REG Reticulo endoplásmico granular COL. Fibras colágenas (Tomada de Histología Básica. Junqueira L.C y Carneiro J.)

-Vasos sanguíneos. La vascularización del tejido periodontal proviene de las ramas de las arterias alveolares superior e inferior. Las porciones superficiales de estos vasos se observan con facilidad a través de la mucosa vestibular y lingual: las ramas de las arterias alveolares penetran en el tabique interdentario o surgen del ligamento periodontal, lo que contribuye al aporte sanguíneo gingival; estas ramas se anastomosan con la periósticas y forman el lecho vascular de la encía. El aporte nutricional del epitelio gingival se da a través de terminaciones capilares en grupos, debajo de la membrana basal. La mayor parte de los vasos en el tejido conectivo gingival son arteriolas, capilares y pequeñas venas. El transporte de sustancias entre el sistema circulatorio y los tejidos se lleva a cabo a través de la pared capilar en la medida de los requerimientos de una parte en particular en un momento dado. El drenaje linfático suele ir paralelo al vascular. (Fig. 3)

- Nervios. La inervación de la encía procede de las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino. ⁽⁴⁾⁽⁴⁰⁾

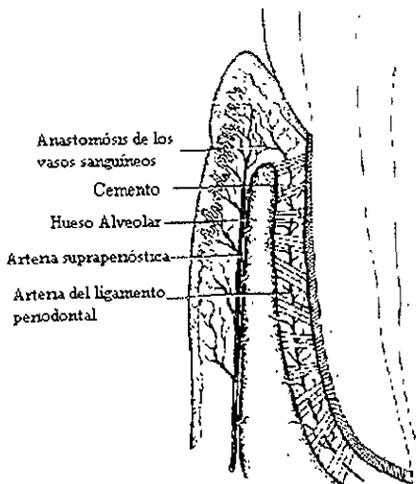


Figura 4. Vascularización del tejido periodontal (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P.H. y Pawlak E.A)

3.1.2. CEMENTO

Es el tejido mesenquimático calcificado, bastante similar al hueso en sus características fisicoquímicas y estructurales, que cubre la raíz anatómica del diente y permite que las fibras del ligamento periodontal se adhieren a éste. Si se elimina la inserción del tejido conectivo, no se forma cemento en la superficie radicular, ya que las células que lo sintetizan se encuentran en el ligamento

periodontal. Hay dos tipos de cementos: el cemento acelular o primario y el cemento celular o secundario. El cemento acelular cubre los dos tercios coronarios de la raíz y no contiene células, mientras que el cemento secundario, es más irregular y contiene células llamadas cementocitos. Ambos tipos de cemento están constituidos por una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas colágenas. La inserción de las fibras principales del ligamento periodontal en el cemento, se hace por medio de la incorporación en el cemento de los extremos de fibras principales. Esta porción de la fibra se llama *fibra de Sharpey*⁽⁴⁾⁽²⁾

La nutrición del cemento se produce principalmente mediante los cementocitos y sus prolongaciones anastomosadas, y proviene de la superficie periodontal, y en escasa proporción por vía dentinaria. El cemento tiene poca actividad metabólica.

La unión amelocementaria es un sector de gran interés puesto que es donde con frecuencia se realiza el tratamiento periodontal básico de raspaje y alisamiento radicular. Según la relación entre esmalte y cemento, se pueden encontrar tres situaciones diferentes: en la mayor parte de los casos el cemento cubre el borde apical del esmalte, otras veces el cemento y esmalte hacen contacto sin encimarse, y con menos frecuencia, no llegan a ponerse en contacto dejando una franja de dentina descubierta.⁽²⁾

El espesor del cemento disminuye en la región cervical y va aumentando hacia el ápice; los máximos se encuentran en las zonas apicales y furcaciones, donde hay mayor cantidad de cementocitos. El espesor aumenta con la edad en relación con la erupción continua del diente.⁽³⁾

3.1.3 LIGAMENTO PERIODONTAL

Es el tejido fibroso que une diente y hueso. Sus funciones más importantes son: a) mecánica, dan soporte al diente, permiten movimientos de éste dentro de los alveolos y amortiguan la presión ejercida al hueso durante la masticación, b) genética, formadora de hueso y cemento y c) nutritiva y sensorial, al proveer nutrición e inervación al cemento y hueso.⁽³⁾ (Fig. 5)

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

-**Fibras crestodentales:** se extienden desde la cresta ósea, en dirección oblicua hacia la corona. Su función principal es impedir la extrusión del diente.

-**Fibras oblicuas:** ocupan la mayor parte del ligamento periodontal y siguen una dirección oblicua hacia apical de hueso a cemento. Sirven para detener la intrusión del diente.

-**Fibras apicales:** ocupan las zonas apicales en forma radial. No existen en raíces incompletamente formadas.

-**Fibras de transición:** son pequeños grupos horizontales entre los haces anteriores.⁽²⁾

La célula más común en el ligamento periodontal es el fibroblasto, encargado de sintetizar colágeno. Además, contiene células encargadas de formar y reabsorber cemento (cementoblastos y cementoclastos, respectivamente) y de formar y destruir hueso (osteoblastos y osteoclastos, respectivamente). También contiene los llamados *restos epiteliales de Malassez*, que son remanentes de la vaina de Hertwing después de que ha terminado su función modeladora de la raíz que se localizan en pequeños grupos cerca de la superficie cementaria.

El espesor del ligamento es menor en las cercanías de la unión del tercio medio con el tercio apical de la raíz con soporte óseo (140 a 160micrones), llega un máximo en la zona cervical (200 a 240 micrones) y alcanza niveles intermedios en la zona apical (150 a 180 micrones).

El espesor del ligamento periodontal varía con la función del diente. Tiene valores mínimos en el diente fuera de oclusión, llega a duplicarse en el diente en función intensa ya que las fuerzas que se ejercen sobre la corona del diente son transmitidas por el ligamento periodontal al hueso en forma de tensiones. Además desempeña un papel importante un mecanismo hidrodinámico consistente en una especie de amortiguador hidráulico. Bajo la presión de las fuerzas oclusales el espacio periodontal es comprimido, lo que provoca el desplazamiento del fluido tisular existente en el ligamento periodontal, a través de las formainas de la cortical alveolar, hacia los espacios medulares vecinos. ⁽²⁾⁽⁴⁾

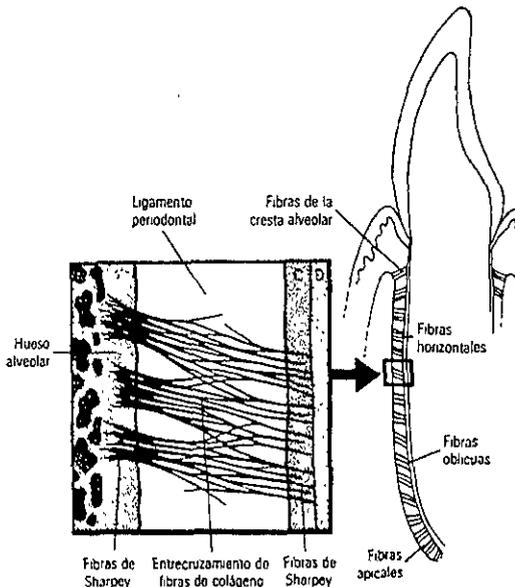


Figura 5 Grupos principales de fibras del ligamento periodontal y fibras de Sharpey (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P.H. y Pawlak E A.)

3.1.4. HUESO ALVEOLAR

Es la parte de los huesos maxilares superior e inferior que forma los alvéolos dentarios y que se continúa con el resto de la estructura ósea. ⁽¹⁾

El hueso alveolar está constituido por una matriz colágena calcificada, con osteocitos encerrados en espacios denominados lagunas. Los osteocitos tienen prolongaciones que se anastomosan, y traen oxígeno y sustancias nutritivas a las células. Las dos terceras partes de la estructura ósea están formadas por minerales (calcio, fosfato, carbonatos, etc.) en forma de cristales ultramicroscópicos de hidroxiapatita. ^{(2) (3)}

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

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

En el hueso y zonas vecinas se distinguen: a) la cortical alveolar, zona de hueso compacto que forma el alvéolo; b) el esponjoso perialveolar, y c) la cortical externa del maxilar.

La **cortical alveolar** limita el espacio periodontal y está formada por: a) hueso de inserción, de origen periodontal, que da inserción a las fibras principales del ligamento periodontal y b) hueso de sostén, de origen medular, cuya función sólo es la de refuerzo del anterior.

El **esponjoso perialveolar** aparece en cantidades variables, de acuerdo con la zona anatómica de que se trate. Consiste en trabéculas óseas que limitan espacios más o menos amplios de médula adiposa. La densidad depende de factores de función, así los dientes sin antagonista tienen un esponjoso menos denso, y de factores de tipo general (deficiencias nutritivas u otras) que pueden provocar una reducción de la densidad del esponjoso al ser requerido el calcio de sus trabéculas para otras funciones; esta reducción se produce en el hueso de sostén y rara vez en el hueso de inserción.

Anatómicamente el hueso alveolar termina por debajo del límite amelocementario, lo que permite la inserción de fibras gingivales y crestodentales en la franja cementaria no cubierta por hueso. La forma del tabique óseo interdental depende de la distancia entre los dos dientes adyacentes, de la convexidad de sus caras proximales y de la altura relativa de sus límites amelocementarios. (2)(4)

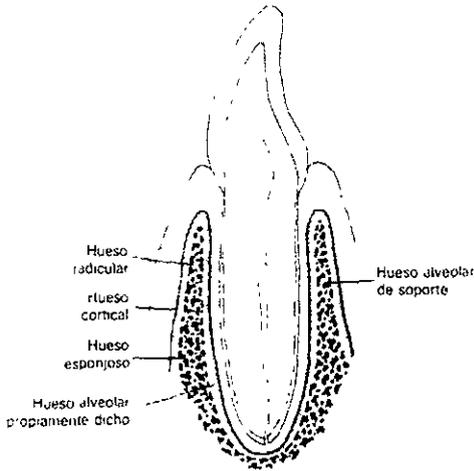


Figura 6. Hueso alveolar (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P.H. y Pawlak E.A.)

3.2. ENFERMEDAD PERIODONTAL

La periodontitis es una enfermedad que afecta los tejidos de soporte del diente. La enfermedad periodontal se caracteriza por la presencia de lesiones inflamatorias gingivales, con formación de una bolsa periodontal que provoca movilidad de los dientes y como consecuencia la pérdida dental. (Fig. 7)

Al persistir la irritación bacteriana de la gingivitis, el proceso inflamatorio se va propagando y afecta las estructuras más profundas. Entonces se observa la desintegración de las fibras transeptales, y la inserción epitelial proliferativa en sentido apical, se desprende al mismo tiempo del diente a su nivel coronal y así se forma la bolsa periodontal. El desarrollo de la bolsa es un signo patognomónico de la periodontitis. En esta etapa el infiltrado inflamatorio se halla concentrado en el tejido conectivo perivascular que envuelve a los vasos sanguíneos interdentarios, el cual se extiende a través de los tabiques óseos interdentarios. La formación ósea ocurre en la región interdentaria dando lugar a deformaciones en forma de copa. La evolución progresiva de la periodontitis acaba en la resorción generalizada del hueso alveolar de soporte y destrucción progresiva de la conexión o inserción del ligamento periodontal. ⁽⁵⁾

El mecanismo exacto de la formación de la bolsa no se conoce por completo, pero Page y Schroeder han clasificado las distintas fases patogénicas de la siguiente manera:

1. Lesión inicial. Las características de la lesión inicial son la vasculitis de los vasos sanguíneos situados en la profundidad del epitelio de unión, el aumento del flujo de líquido gingival, el movimiento de leucocitos hacia el epitelio de unión y el surco gingival, las proteínas séricas extracelulares, las alteraciones de la cara coronaria del epitelio de unión y la pérdida de fibras de colágeno alrededor del vaso sanguíneo gingival.

2. Lesión precoz. La lesión precoz se caracteriza por una exageración de las características de la lesión inicial, la presencia de células linfáticas por debajo del epitelio de unión, a cuyo nivel se concentra la inflamación aguda, las alteraciones fibroblásticas, una mayor destrucción de las fibras de colágeno gingival y la proliferación precoz de las células basales del epitelio de unión.

3. Lesión establecida. En este tipo de lesión las manifestaciones inflamatorias agudas persisten, con un predominio de las células plasmáticas; las inmunoglobulinas se acumulan en el espacio extravascular; se observa una destrucción de las fibras de colágeno, una proliferación con migración apical y extensión lateral del epitelio de unión, así como una formación precoz de bolsas periodontales; sin embargo, no se observa una pérdida apreciable de hueso.

4. Lesión avanzada. La lesión avanzada es típica de la periodontitis y se caracteriza por la progresión de la lesión establecida, su extensión al hueso alveolar y al ligamento periodontal, con la consiguiente destrucción ósea, pérdida

de las fibras de colágeno adyacentes al epitelio de la bolsa, fibrosis de las áreas más periféricas, presencia de células plasmáticas alteradas, formación de bolsas periodontales y signos generalizados de respuesta inflamatoria e inmunopatológica. Desde el punto de vista clínico se considera que la periodontitis avanzada es una profundización de la bolsa periodontal asociada con presencia de exudado y aumento paulatino de la movilidad de los dientes.⁽⁴¹⁾

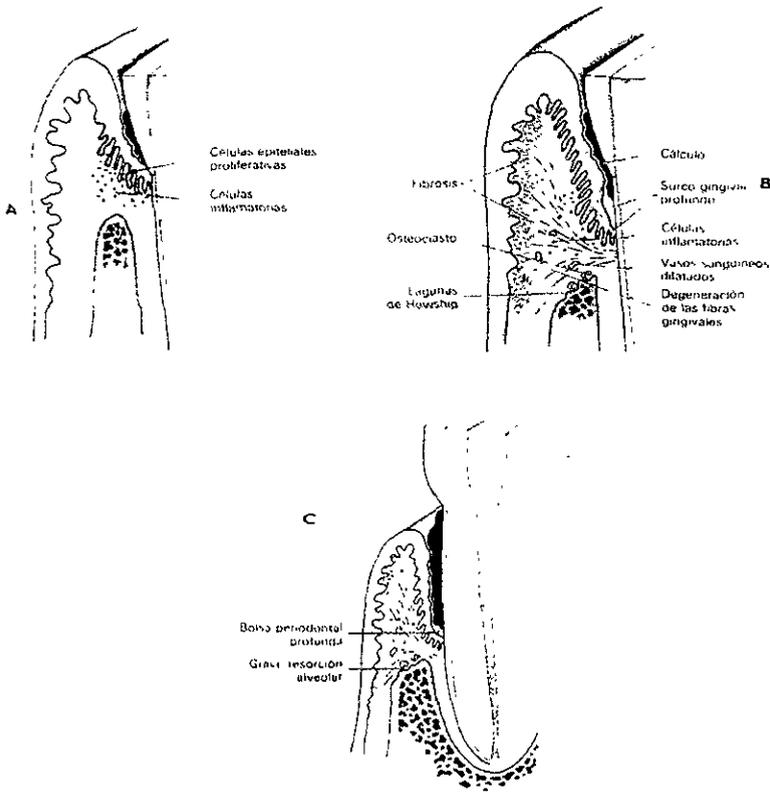


Figura 7. Formación de Bolsa. A. Proliferación apical de las células epiteliales de la inserción del epitelio de la unión y del epitelio del surco B Movimiento apical del epitelio de la unión, degeneración de las fibras gingivales, reabsorción osteoclastica; fibrosis C. Periodontitis avanzada. (Tomada de Fundamentos de Periodoncia, Haag P H y Pawlak E.A.)

3.2.1. ETIOLOGÍA

Investigaciones tanto clínicas como experimentales sobre la enfermedad periodontal inflamatoria en el hombre sugiere que las bacterias son el factor etiológico principal (Fig. 8). Aunque, la reacción del huésped también es importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal. ⁽⁵⁾

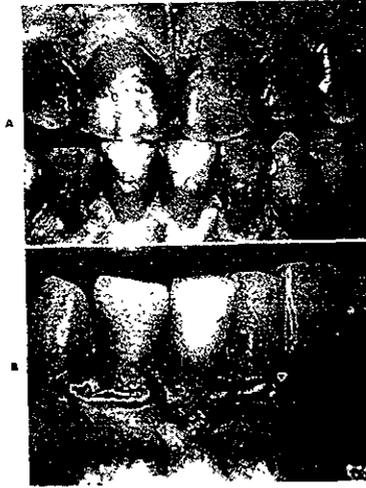


Figura 8. A. Patrón típico de acumulación de la placa B. Depósitos de placa en paciente con periodontitis. (Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P H y Pawlak E.A.)

Numerosas investigaciones han documentado el hecho de que la placa bacteriana es el agente etiológico en la mayoría de las formas de enfermedad periodontal; por tanto es una enfermedad con varias líneas de evidencias que justifican su índole infecciosa.

En primer lugar, se cuenta con estudios de higiene bucal tanto longitudinales como transversales, que correlacionan el incremento de la gravedad de la periodontitis con el de acumulación de placa. Es bastante claro que la placa supragingival y la subgingival son directamente responsables de la iniciación y progresión de la enfermedad periodontal ⁽¹⁴⁾ La construcción de la placa puede ocurrir como resultado de la agregación de bacterias, o de una unión interbacterial de específico apareamiento de diferentes especies bacterianas que benefician así una interacción ecológica. Es probable que la placa supragingival influya fuertemente en el crecimiento, acumulo y potencial patogénico de la placa subgingival, especialmente en las fases tempranas de la gingivitis y la periodontitis ⁽¹⁴⁾

La ecología subgingival es diferente en la superficie dental, en donde predominan bacilos y cocos gram-positivos; en el exudado de la bolsa; y en el epitelio interno de la bolsa en donde predominan espiroquetas, bacilos y filamentosos gram-variables. La interacción célula-célula con coagregación bacteriana de actinomicetes y organismos gram-negativos así como bacteroides han sugerido a varios investigadores la posibilidad que actinomicetes puede ser un marcador para la transición de la microflora marcadamente gram-positivo de la placa, a una microflora gram-negativo.⁽³⁴⁾ Las proporciones relativas de las zonas de la placa subgingival parecen estar relacionadas con la naturaleza y actividad de la enfermedad, presentes en una bolsa en particular.

La segunda línea de evidencia que justifica la índole infecciosa de la enfermedad periodontal, se refiere al tratamiento de la periodontitis destructiva. La terapéutica que reduce el número total de microorganismos de la placa y elimina ciertas especies microbianas se correlaciona con la mejoría clínica.

Una tercera línea de evidencia se encuentra en los estudios de la patogenicidad de bacterias de placa específica. Las clásicas teorías que trataban del papel de la placa dental sugerían que la placa consistía en una masa bacteriana compleja y homogénea, que conduciría a la enfermedad al permitirse su crecimiento. Posteriormente se descubrió que la composición bacteriana de la placa asociada con lugares sanos es diferente de la placa asociada con lugares enfermos. Incluso más importante fue el hecho de que podía asociarse una flora microbiana característica con enfermedades periodontales clínicamente diferentes. Las respuestas clínicas frente a las bacterias de la placa son variadas, con diferencias en el grado y naturaleza de la inflamación, la forma de la lesión, su localización en la cavidad oral y la formación de pus y cálculo. Se están realizando intentos para relacionar la sintomatología clínica con el tipo de microorganismos presentes, aunque los progresos realizados son todavía limitados.⁽¹⁴⁾ El concepto de especificidad bacteriana, formalmente descrito por Loesche en 1976, sugiere que formas específicas de la enfermedad periodontal tienen etiologías bacterianas específicas.⁽¹⁵⁾

Por otro lado la patogenicidad se relaciona con la habilidad de las bacterias para producir factores de virulencia. Los microorganismos periodontopáticos producen una variedad de factores patogénicos y de virulencia, que están sin duda relacionados con todas las fases del proceso patológico.

Teóricamente la presencia de las enzimas bacterianas capaces de producir la degradación de un sustrato que se sabe es componente del huésped sugiere que las bacterias bucales tienen la capacidad potencial de alterar o destruir, por medios directos, los componentes tisulares del huésped

Además de las enzimas liticas, existe una amplia variedad de otros productos tóxicos, elaborados por las bacterias gingivales. Estos factores pueden dividirse en tres clases fundamentales: 1) factores que afectan la matriz intercelular, 2) factores de toxicidad celular directa y 3) estimulantes inflamatorios.

Un ejemplo de estimulantes inflamatorios son las endotoxinas que se encuentra habitualmente en bacterias gram-negativas. Son sustancias complejas formadas por lípidos, polisacáridos y una sustancia proteíniforme. Estudios han demostrado que la porción lipídica provoca la resorción ósea ⁽¹¹⁾ El aumento en la cantidad de endotoxinas en el exudado subgingival ha sido relacionado con el aumento en la intensidad de la inflamación tanto clínica como histológicamente. Un hecho también significativo es que el cemento de dientes humanos con periodontitis contiene cierta cantidad de endotoxinas con actividad biológica. Quizá es esta actividad la que inhibe la adherencia *in vitro* de los fibroblastos a la superficie de las raíces. ⁽¹²⁾

Existen productos tóxicos bacterianos que producen la despolimerización del ácido hialurónico de la sustancia intercelular de cemento, como son las hialuronidasas, que podría favorecer la separación de las células epiteliales, esta separación podría ayudar a la penetración de las bacterias o de sus productos en los tejidos o alterar el equilibrio líquido del tejido conectivo.

En cuanto a las proteasas, el efecto de la colagenasa bacteriana puede ser muy importante, puesto que la proteína fibrosa principal del sistema fibroso periodontal, del hueso y de los tejidos conectivos es la colágena. La colagenasa del huésped, liberada de los granulocitos y de las células mononucleares como resultado de una respuesta inflamatoria que se piensa es liberada por irritantes bacterianos, es una fuente principal de actividad colagenolítica en el tejido periodontal de los seres humanos. ⁽¹⁰⁾

La salud periodontal se mantiene con el equilibrio entre la resistencia del huésped y la virulencia bacteriana esté a favor del huésped.

El conocimiento de los microorganismos específicos que se encuentran en las diferentes formas de enfermedad periodontal ha sido fundamental para comprender la respuesta del huésped hacia ellos.

Muchas respuestas del huésped son peculiares, pues en ellas participan anticuerpos o reacciones inmunitarias celulares dirigidas a antígenos bacterianos específicos

Los componentes del sistema inmunitario que se ha comprobado que operan en una u otra de estas fases de la patogénesis de la enfermedad periodontal son:

-El sistema inmunitario secretorio, en las que participan las células del tejido linfóide y anticuerpos secretorios, principalmente IgA.

-Eje neutrófilos-anticuerpo-complemento, en este sistema participan los neutrófilos y las células plasmáticas, anticuerpos IgG, y el sistema de complemento especialmente C3.

-Eje linfocito-macrófago-linfocina, en este sistema participan las células T y B efectoras, macrófagos y monocitos.

En la fase de colonización, la inhibición de la adhesión por medio de anticuerpos puede desempeñar un papel decisivo; los anticuerpos del tipo IgA secretor pueden ejercer efecto en los microorganismos que colonicen primero. Después al presentarse inflamación gingival, los anticuerpos del líquido gingival, podrán limitar más colonización de la zona subgingival por microorganismos periodontopatógenos. Los anticuerpos ejercen su efecto en la colonización inhibiendo la adhesión de los microorganismos. Asimismo, los anticuerpos derivados del plasma IgG e IgM o producidos localmente en el líquido gingival pueden conducir a una actividad bactericida mediada por anticuerpo-complemento o a la opsonización con remoción mediante fagocitosis.

Se piensa que el eje neutrófilo-anticuerpo-complemento lleva a cabo un papel protector claro contra las bacterias periodontales patogénicas; en primer término por la habilidad de este sistema para limitar la penetración del tejido por parte de los microorganismos. Hay evidencia considerable de que los neutrófilos son importantes en la protección contra la microflora periodontal. Por ejemplo la rápida alteración en los tejidos periodontales que sufren los pacientes con periodontitis juvenil localizada, en los que se encuentra disminuida la quimiotaxis neutrófila.

Frecuentemente los microorganismos periodontopáticos con frecuencia poseen factores de virulencia que les permite evadir los mecanismos protectores de los neutrófilos.

Por otro lado, el eje linfocito-macrófago-linfocina tiene un potencial de ejercer efectos patológicos y puede contribuir a la pérdida de tejidos periodontales que se observa en la fase destructiva. Los linfocitos activados por antígenos o mitógenos de los patógenos periodontales pueden estimular la producción de linfocinas. La estimulación de los macrófagos, ya sea por productos bacterianos o por la linfocina interleucina-2, da como resultado la producción de colagenasa, que ocasiona disolución de la colágena hística. La estimulación de los macrófagos por linfocinas y productos bacterianos puede conducir a la producción de especies

reactivas de oxígeno que son tóxicas para las células locales. Además, los macrófagos estimulados pueden producir interleucina-1 y PGE₂, los que intervienen en la resorción ósea. (Fig. 9)

Los linfocitos hiperreactivos o macrófagos, ya sean determinados de manera genética o activados localmente, pueden acelerar la destrucción periodontal. (13)(5)(46)

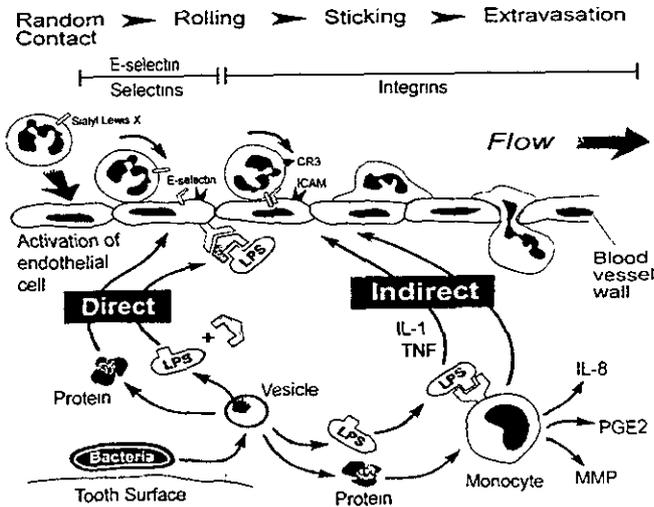


Figura 9. Colonización bacteriana y el papel de la proteína CD14 en la respuesta al huésped. Las toxinas de la cubierta bacteriana en particular los lipopolisacáridos (LPS) y las proteínas (PROTEIN) son la forma de comunicación más importante entre la placa dentobacteriana y el huésped (TOOTH SURFACE). Las vesículas liberadas de la superficie de la placa dentobacteriana interactúan con los monocitos (MONOCYTE) y las células no mieloides (ENDOTHELIAL). La activación directa del endotelio por lipopolisacáridos puede ocurrir como una activación indirecta por la bacteria con los monocitos lo que promueve la liberación de citocinas. El resultado de estas interacciones promueve la salida de leucocitos (LEUKOCYTES) del torrente sanguíneo a los tejidos contiguos a fin de remover el estímulo bacteriano. Estos eventos producen activación de las moléculas de adhesión intracelular (ICAM), prostaglandinas (PGE₂), integrinas (CR3, CD11/CD18-β integrin) Tomado de Endotoxina in Health and Disease Brade Helmut

3.2.2. CLASIFICACIÓN

PERIODONTITIS DEL ADULTO

La periodontitis del adulto aparece a partir de los 35 años y puede ser localizada en dientes aislados o generalizada, afectando toda la dentición. Clínicamente se manifiesta por bolsas periodontales, pérdidas de la inserción y del tejido óseo, y eritema y/o tumefacción de la encía, que sangra con frecuencia por el roce. En las fases más avanzadas se observa también movilidad dental. Otra manifestación son las recesiones. La gravedad de la periodontitis del adulto se corresponde directamente con la acumulación de la placa y de los cálculos dentales. La progresión de la pérdida de inserción suele ser escasa en la periodontitis del adulto. ⁽⁴⁾

No se han descrito defectos inmunes en los pacientes con periodontitis del adulto. Los títulos de IgG y/o de IgA en el suero contra *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema vicentii* o *Treponema denticola* suelen ser elevados en los pacientes con periodontitis del adulto, debido a la integridad de las defensas inmunes.

PERIODONTITIS INCIPIENTE PRECOZ

PERIODONTITIS PREPUBERAL

La periodontitis prepupal se inicia con la erupción de los dientes temporales y suele afectar después los permanentes. Puede ser localizada o generalizada.

La forma localizada muestra escasos signos clínicos de inflamación gingival y sólo afecta ciertos dientes. La velocidad de destrucción hística es más lenta que en la forma generalizada. No se conoce bien la etiología de este trastorno, pero se sospecha de un defecto en la resistencia del paciente a la acción de los microorganismos de la placa. En esta forma, los defectos leucocitarios afectan tanto a los leucocitos polimorfonucleares como a los mononucleares, pero no a ambos al mismo tiempo. ⁽⁴²⁾

La periodontitis prepupal generalizada se caracteriza clínicamente por una inflamación grave, con resorción ósea alrededor de la dentición temporal que determina su caída prematura. (Fig. 10) También se afecta a veces la dentadura permanente, pero dado el pequeño número de casos publicados, la información sobre los efectos de esta enfermedad es bastante limitada. Los pacientes con este trastorno suelen manifestar deficiencias de los leucocitos polimorfonucleares y mononucleares. La enfermedad se asocia a abscesos frecuentes, infecciones respiratorias altas y otitis media. ⁽⁴⁾⁽⁴⁰⁾

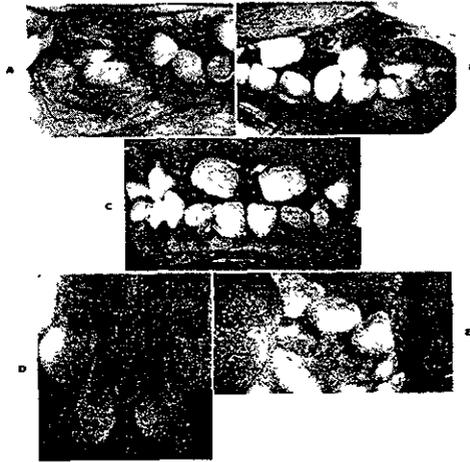


Figura 10. Periodontitis prepuberal en una niña de 6 años.
(Tomada de Fundamentos de Periodoncia. Haag P.H y Pawlak E.A.)

PERIODONTITIS JUVENIL

La periodontitis juvenil es una forma poco frecuente de periodontitis que aparece en adolescentes y se caracteriza por la rápida destrucción del hueso alveolar con signos mínimos de inflamación. Suele ser de carácter hereditario. Se discute si la herencia es autosómica recesiva o dominante ligada al cromosoma X. Se clasifica como localizada y generalizada, según su distribución en la dentadura.(Fig. 11)

La forma generalizada afecta, por lo general, toda la dentición. Se asocia con frecuencia a enfermedades sistémicas. Sin embargo, también se observa en sujetos sin enfermedad sistémica aparente y se caracteriza por la pérdida progresiva de tejido periodontal, migración patológica de los dientes, aumento de la movilidad dental y formación de bolsas periodontales.

La forma localizada se caracteriza por la destrucción rápida de hueso alveolar y la formación de bolsas infraóseas profundas que afectan típicamente los incisivos y primeros molares permanentes. Las manifestaciones clínicas gingivales suelen ser muy poco llamativas. Si se comparan las lesiones periodontales de los jóvenes con las del adulto, se observa una cantidad mínima de placa y cálculo dental en la periodontitis juvenil ⁽⁴⁰⁾

No se ha confirmado la patogenia concreta de la periodontitis juvenil y se desconocen aún los factores etiológicos, aunque se piensa que la causa principal es de origen bacteriano aunada a una respuesta anómala del hueso.

La presencia de dos microorganismos capaces de producir una destrucción rápida del tejido periodontal es frecuente: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Capnocytophaga sputigena*. En los pacientes con periodontitis juvenil se observa gran número de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en los sitios de lesión, pero no en sitios adyacentes sanos. Esta bacteria no se ha encontrado en igual cantidad en bolsas periodontales de pacientes con otro tipo de periodontitis. Estos pacientes desarrollan altos niveles de anticuerpos en suero, saliva y fluido crevicular contra *A. actinomycetemcomitans* comparado con los bajos niveles de anticuerpos que se observa en pacientes con otros tipos de enfermedad periodontal. Estudios realizados en el tratamiento de la enfermedad periodontal consistentes en la eliminación de *A. actinomycetemcomitans* de sitios subgingivales está relacionada directamente con la mejoría clínica. ⁽⁶⁾

Las respuestas quimiotáctica de los granulocitos neutrófilos disminuye en el 70-75% de los pacientes con periodontitis juvenil. En cambio, los monocitos se afectan con menor intensidad. La fagocitosis bacteriana por parte de los neutrófilos se halla también limitada esto puede relacionarse a los factores de virulencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* que invaden los mecanismos de defensa del huésped a través de una leucotoxina la cual puede destruir leucocitos polimorfonucleares. ⁽⁷⁾

Los enfermos con periodontitis juvenil suelen mostrar títulos elevados de IgG, IgA y/o IgM contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Capnocytophaga sputigena*. ⁽⁴⁾

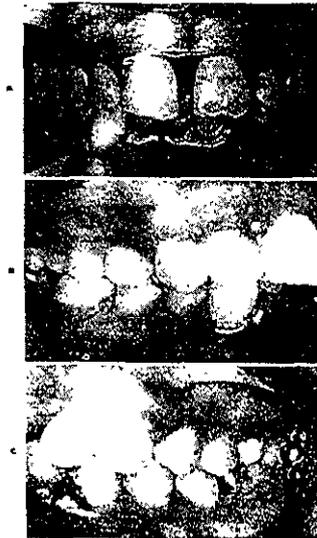


Figura 11. Periodontitis juvenil de una muchacha de 16 años. (Tomada de Fundamentos de Periodoncia Haag P H y Pawlak E.A.)

PERIODONTITIS RAPIDAMENTE PROGRESIVA

La periodontitis rápidamente progresiva, es una enfermedad en la que se produce una reabsorción ósea intensa en un período de tiempo muy breve. Aparece en cualquier momento entre la pubertad y los 35 años de vida, y suele afectar toda la dentición. La gravedad de las lesiones se corresponde directamente con la acumulación de la placa y del cálculo dental. La progresión de la enfermedad es episódica, alternando períodos de exacerbación y de remisión. Las características clínicas de la fase aguda de la enfermedad comprenden una inflamación gingival extensa, con sangrado inmediato y aspecto aframbuesado del tejido. La fase latente se manifiesta por aspecto normal de la encía y la inserción del tejido a los dientes, aunque persista la pérdida ósea avanzada y las bolsas periodontales profundas. La fase activa suele acompañarse de malestar general y pérdida de peso. ⁽⁴⁰⁾

El 85% de los pacientes muestra una reducción de la quimiotaxis de los neutrófilos y el 74%, una disminución de la de los monocitos. ⁽⁴⁾ La flora bacteriana asociada a esta enfermedad no se ha identificado totalmente, pero se han implicado los siguientes patógenos: bacilos gram negativos, anaerobios, asacarolíticos, sobre todo algunas especies de *Bacteroides*, *A. actinomycetemcomitans* y probablemente especies de *Capnocytophaga*. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Se conocen varias enfermedades sistémicas asociadas a la destrucción del tejido periodontal que pueden predisponer a la periodontitis rápidamente progresiva o relacionarse con ella. Algunos ejemplos son la diabetes mellitus, el síndrome de Down, la enfermedad de Crohn, la neutropenia. ⁽⁴³⁾

PERIODONTITIS REFRACTARIA

La periodontitis refractaria es toda enfermedad resistente al tratamiento no quirúrgico convencional o quirúrgico. En la periodontitis refractaria se observan pérdida de la inserción y pérdida ósea, a pesar del tratamiento ⁽⁴⁾ Se considera que, igualmente, *A. actinomycetemcomitans* está asociado a algunos casos de periodontitis refractaria. ⁽⁹⁾

3.3. ADHESIÓN BACTERIANA

Las superficies y las criptas de varias zonas de la cavidad oral están colonizadas por distintas colecciones de bacterias: los dientes, el dorso de la lengua, la mucosa bucal y las fisuras gingivales.

Los nutrientes disponibles para este amplio espectro de especies bacterianas dentro de la cavidad oral incluyen los componentes de la dieta, el fluido gingival, los componentes de la saliva y los mebatolitos sintetizados por los organismos asociados. Las diferencias en los tipos de microorganismos asociados en diversos lugares dentro de la cavidad oral parecen ser principalmente atribuibles a su adhesión selectiva a diferentes superficies bucales. Debido a la corriente de fluidos orales y la exposición de nuevas superficies epiteliales por descamación, la adherencia bacteriana es el primer paso esencial para la colonización. Por tanto, las especies de bacterias que en principio colonizan las estructuras orales están determinadas principalmente por su adhesividad hacia una superficie en particular. ⁽⁴⁶⁾

3.3.1. ESTRUCTURA Y METABOLISMO BACTERIANO.

La mayoría de las bacterias son estructuras de un diámetro aproximado de 1µm. Se distinguen morfológicamente: cocos de estructura esférica, bacilos de estructura alargada, vibriones, espirilos y espiroquetas de estructura curva. Las estructuras que se observan en el citoplasma son la región nuclear, los ribosomas, los mesosomas y, en ciertas ocasiones, unos gránulos irregulares formados por sustancias de reserva: glucógeno o polimetáfosfato.

La cubierta celular que rodea al citoplasma está compuesta de una membrana citoplasmática y una pared celular rígida. Los organismos gram-negativos presentan además una membrana externa y un espacio periplasmático (que contiene la pared) entre las dos membranas.

Los organismos gram-negativos tienen una pared menos gruesa que la de los organismos gram-positivos y suelen presentar filamentos proteicos que se proyectan hacia el exterior (fimbrias)

La tinción de gram es esencial para la identificación de la mayoría de las bacterias de importancia clínica. Aunque la mayoría de las bacterias se tiñen inicialmente de color violeta, sólo las gram-positivas retienen el colorante básico (cristal violeta) durante los siguientes pasos, por tanto, las gram-negativas se decoloran debido a la acción del disolvente orgánico y presentan finalmente, el color del colorante de contraste, que es más tenue (safranina).

La superficie externa de diversas bacterias posee una gran variedad de componentes y estructuras no esenciales para el crecimiento, pero de las que dependen en gran medida las interacciones de su entorno.

Flagelos. Muchos bacilos y bacterias curvadas poseen flagelos que les permiten moverse. Un flagelo consiste en un largo filamento de moléculas de una proteína globular (flagelina) agrupadas formando una cadena helicoidal compacta; que se proyecta hacia el exterior de la superficie.

Fimbrias (pili); adhesinas. La mayoría de las bacterias gram-negativas poseen otras estructuras filamentosas complementarias, denominadas fimbrias o pili. Se trata de estructuras cilíndricas rígidas y compuestas de pilina (peso molecular 17.000-25.000 daltones), una proteína altamente hidrófoba y densamente agregada en forma de cadena helicoidal. Las fimbrias se pueden separar de las células pero se regeneran rápidamente al seguir creciendo la célula.

Se ha demostrado que las fimbrias crecen por adición del material en su base. Además la pilina se sintetiza en forma de precursor con una secuencia de líder que es eliminada en el momento de penetrar en la membrana, formándose el pili a partir de las proteínas procesadas en la membrana.

En cada célula hay varios cientos de fimbrias, que funcionan como adhesinas encargadas de mediar la adhesión a superficies específicas. Por lo tanto, desempeñan un papel en patogénesis. Las bacterias pueden fluctuar rápidamente entre sus formas con fimbrias (Fim+) y sin ellas (Fim-), mediante un mecanismo reversible de regulación genética. En el primero de estos estados, se favorece la colonización inicial, pero también aumenta la sensibilidad de fagocitosis; por ello, su pérdida tras la colonización parece favorecer la invasión tisular.

Una bacteria puede poseer diferentes tipos de fimbrias de distinto grosor y longitud, especificidad antigénica, secuencia proteica y especificidad por el receptor glicoproteico del hospedador al que se unen, quizás análogo a los mecanismos de reconocimiento antígeno-anticuerpo. La adherencia de la bacteria tiene una interacción específica en el cual las macromoléculas en la superficie de la bacteria se une a estructuras complementarias (ligandos) en la superficie de los tejidos del huésped. Existen fimbrias sensibles a manosa, que son aquellas en las que la manosa inhibe la hemoaglutinación uniéndose competitivamente a los receptores celulares del hospedador. Parece ser que la adhesina puede no ser la pilina, sino una proteína especial situada en el extremo. La mayoría de las adhesinas son lectinas; (proteínas con una alta afinidad hacia hidratos de carbono específicos). En algunos casos la bacteria tiene en su superficie enlace carbohidrato proteína que sirve como de unión a los microorganismos a su correspondiente glucoconjugante en la superficie de los tejidos del huésped. ⁽³⁴⁾⁽⁴⁹⁾

Cápsulas. Las cápsulas son geles difusos que pueden llegar a formar una capa de limo. Las cápsulas son especialmente importantes en bacterias patógenas, ya que las protegen de la fagocitosis. No todas las cápsulas están formadas por polisacáridos. Algunas bacterias poseen cápsulas polipeptídicas sencillas.

Región nuclear. Esta estructura carece de membrana nuclear, se denomina nucleoide, en lugar de núcleo. El nucleoide se define como la región que carece de ribosomas y constituye, aproximadamente, 10% del volumen celular total. Los

estudios genéticos y la microscopía electrónica tras lisis suave demuestran que las bacterias contienen un cromosoma único, circular y cerrado covalentemente. El nucleóide contiene aproximadamente un 60% de DNA, un 30% de RNA y un 10% de proteínas.

Pared celular. La pared es una de las capas que constituyen la cubierta bacteriana, y entre sus funciones se encuentra el mantenimiento de la forma de la célula y la protección frente a la lisis osmótica. Aunque el componente principal responsable de la rigidez es el peptidoglucano, la pared también contiene cadenas de otros compuestos unidas covalentemente. La estructura del peptidoglucano es muy parecida en todas las bacterias; la columna vertebral es una cadena de glucano, un disacárido formado por uniones alternantes de N-acetilglucosamina y su éter láctico, el N-acetilmurámico; el ácido murámico se encuentra exclusivamente en el peptidoglucano bacteriano. A cada disacárido se encuentra unido un tetrapéptido con aminoácidos L y D alternantes, y el grupo carboxilo (COOH) terminal de cada tetrapéptido está unido mediante un enlace peptídico al grupo amino (NH₂) de un tetrapéptido de la cadena glucano vecina.

Membrana citoplasmática. La membrana citoplasmática de las bacterias (denominada también membrana interna en las gram-negativas) consiste principalmente, en un mosaico de proteínas incrustado en una bicapa de fosfolípidos cuyos grupos polares quedan expuestos sobre ambas superficies. También contiene pequeñas cantidades de lípido portador un decaprenol-P, y en algunos organismos, cadenas de poli-β-hidroxi-butarato y polifosfato que lo atraviesan formando poros a través de los cuales se produce el transporte de iones. La membrana citoplasmática bacteriana lleva a cabo varias funciones; entre las que se encuentran la concentración activa de nutrientes y iones, la síntesis de lípidos, la secreción de proteínas y el transporte electrónico. Se han detectado más de 100 proteínas diferentes. Hay enzimas de membrana que solamente son activas cuando se encuentran asociadas a un fosfolípido específico. Los componentes apolares de los lípidos de membranas bacterianas son, fundamentalmente, ácidos grasos con cadenas de entre 14 y 18 átomos de carbono, saturados o monoinsaturados, los procariontes no poseen cadenas poliinsaturadas.

Membrana externa. Los lípidos que predominan en la lámina interna de la membrana externa son fosfátidos, mientras que en la lámina externa el lípido predominante es el lipopolisacárido. El LPS, también denominado endotoxina, es responsable de la toxicidad de la cubierta celular gram-negativa. La membrana externa (ME) contiene menor cantidad de proteínas, que la membrana interna. Una función importante de la ME es actuar como tamiz molecular, permitiendo solamente la difusión de moléculas relativamente pequeñas. Por ser más sólida que la membrana interna presenta mayor resistencia a la distorsión y a la solución por detergentes o solventes orgánicos, y es menos permeable a las moléculas hidrófobas, entre las que se encuentran diversos antibióticos. ⁽⁴⁹⁾

Algunas fermentaciones están basadas en la vía glucolítica (Embden-Meyerhof). Esta vía genera ATP dos veces: la primera, en la oxidación del gliceraldehído-3P (triosa-P) por el NAD^+ , y más tarde, en la conversión del P-enolpiruvato en piruvato. Para que la reacción de fermentación esté ajustada y para poder reciclar el NAD, el NADH que se produce en la oxidación neta a piruvato debe volver a oxidarse a expensas de algún otro sustrato. Con este objeto, los microbios han desarrollado diversas vías, que dependen de la disponibilidad de nutrientes. Como en cada fermentación la mayoría de la glucosa se convierte en un único producto o en unos pocos, este proceso representa, cuantitativamente, a principal actividad bioquímica del organismo fermentador.

Aunque el lactato y etanol son productos comunes de las fermentaciones microbianas, no son los únicos posibles. Por ejemplo existen algunas bacterias capaces de producir butanol y acetona.

En la mayoría de los microorganismos otras hexosas aparte de la glucosa pueden entrar en glucólisis después de ser transformadas por diferentes enzimas en un derivado fosforilado (Fig. 12). Los disacáridos entran a la ruta glucolítica después de haber sido hidrolizados por diferentes enzimas a monosacáridos.⁽⁴⁹⁾

En la fermentación láctica el piruvato se reduce a lactato sin formación de gases. Existe la fermentación homoláctica, en la que únicamente se produce lactato. En la fermentación heteroláctica se obtienen como productos finales cantidades aproximadamente iguales de lactato, etanol y CO_2 .

En la fermentación alcohólica el piruvato se convierte en CO_2 y acetaldehído, que después se reduce a etanol en una reacción acoplada a NAD.

En la fermentación acidomixta (fórmica) el piruvato se descompone (sin oxidación ni reducción neta) en formiato y acetil-CoA. De aquí el piruvato se reduce a partir de dos vías que consumen [H]: a) formación de etanol a partir de acetil-CoA y b) reducción a succinato.

En la fermentación butilenglicólica se produce acetil-P y formiato, como en la fermentación mixta, sin embargo, el aceptor de electrones es la acetoina, formada por dos moléculas de piruvato que después se reducen a butilenglicol.

En la fermentación butírico-butílica primeramente se producen acetil-CoA, dos [H] y CO_2 . Después se condensan dos grupos acetilo. El acetil-CoA sufre varias reducciones en diferentes proporciones hasta producir acetona, isopropanol, ácido butírico y *n*-butanol.

En la fermentación propiónica se reducen dos moles de lactato, vía oxalacetato y succinato, produciéndose propionato.

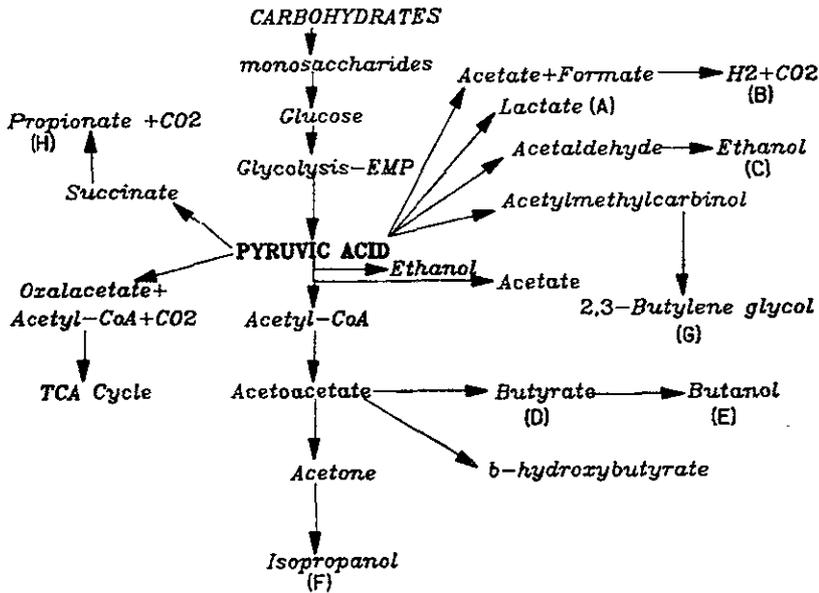


Figura 12. Participación del ácido pirúvico en la formación de un gran número de compuestos reducidos a partir de la glucosa. Las letras representan los grupos de bacteria que sintetizan estos compuestos: A-C Bacterias lácticas; H Bacterias propiónicas; B-G Enterobacterias; C, D, E, F grupo butílico y acetona. (Tomado de Oral Microbiology and Immunology Nisengard and Newman, Ed. Saunders)

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

La oxidación completa transforma a los compuestos orgánicos en CO₂ y H₂O. En la ruta más habitual, el piruvato procedente de la vía glucolítica es oxidado a acetil-CoA y CO₂, y el acetil-CoA formado es oxidado mediante el ciclo ATC en un proceso denominado respiración final. En la respiración, cada molécula de glucosa produce 10 veces más energía libre y 18 veces más ATP que en la fermentación. (Fig. 13)

En cada uno de los pasos oxidativos el ciclo ATC, se utilizan un par de hidrógenos de los sustratos para producir FAD o NAD⁺, pero no se forma directamente ATP. Estos cofactores reducidos son finalmente oxidados por el O₂ en el proceso de transporte de electrones, que es donde se obtiene la energía procedente de la respiración en forma utilizable.

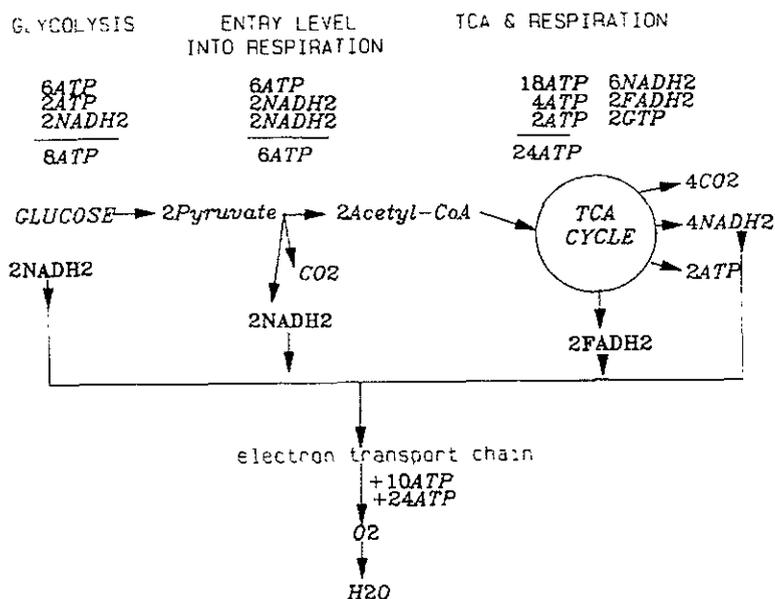


Figura 13. Rutas de energía de ATP a partir de una molécula de glucosa y las diferencias entre la respiración aeróbica y anaeróbica. (Tomado de Oral Microbiology and Immunology Nisengard and Newman. Ed. Saunders)

Ciclo de los ATC de Krebs y, dentro del mismo, derivación del glioxilato. En estas dos reacciones el ciclo de glioxilato se conserva el carbono, mientras que en las dos reacciones descarboxilativa del ciclo ATC se pierde carbono en forma de CO_2 . El ciclo del glioxilato proporciona síntesis neta de compuestos de 4C a los organismos que crecen únicamente en presencia de acetato, para sustituir a los compuestos derivados hacia las vías biosintéticas.

Transporte de electrones

En las bacterias aerobias los electrones procedentes de diversos donadores son conducidos por el NADH o por una flavoproteína hasta el sistema de transporte de electrones (TE), en el que la mayor parte de energía se aprovecha para producir ATP (fosforilación oxidativa).⁽⁴⁹⁾

3.4.2. CITOESQUELETO CELULAR

El citoesqueleto está compuesto por tres principales tipos de filamentos proteicos: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Los microfilamentos son polímeros de actina que junto con un largo número de uniones de actina y proteínas asociadas constituyen la actina del citoesqueleto.⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁴⁾ La actina existe ya sea en forma monomérica (G-actina) o en forma polimérica (F-actina). Cada molécula de actina puede unirse a ATP, hidrolizarlo a ADP después de incorporar una molécula de actina al polímero. Los polímeros se ensamblan espontáneamente por interacciones de tipo no-covalente entre las subunidades monoméricas. El paso que limita la velocidad de polimerización es la nucleación, la unión de la primeras subunidades genera un nuevo filamento. Los filamentos de actina son estructuras polimerizadas, y la cinética de polimerización para cada extremo final es diferente. El extremo final denominado plus (barba) crece más rápidamente que el extremo final designado minus (punta).⁽⁴⁸⁾

En células mamíferas, la actina del citoesqueleto es requerida para la motilidad y la remodelación de la superficie. Regula los cambios de la forma celular durante la mitosis. Es esencial para varias actividades de contracción, como la contracción muscular o la separación de la célula hija durante la citoquinesis; controla la interacción célula-célula y célula-sustrato junto con la adhesión de moléculas; y participa en señales transmembranales, endocitosis, y secreción. Se ha estudiado también la participación de la actina en la división nuclear así como en el movimiento y posición de organelos.⁽⁵⁰⁾

La unión de actina del citoesqueleto es regulada a múltiples niveles, incluyendo la organización de monómeros de actina a polímeros de actina y la superorganización de polímeros de actina a una red de filamentos. Un largo número de proteínas unidas a actina regulan el ensamblaje de actina por control de la formación de filamentos y entrecruzamiento de la red de actina. Las actividades de estas proteínas son frecuentemente moduladas por señales moleculares de calcio (Ca^{2+}) o por segundos mensajeros derivados del fosfatidilinositol.⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾

Plegamiento de actina. Se ha observado que monómeros de actina puros son capaces de polimerizarse espontáneamente *in vitro* por lo que es necesario su plegamiento a través del complejo CCT.⁽⁵³⁾

Polimerización de actina La disponibilidad de monómero y la polimerización con la preexistencia de filamentos es regulada por las uniones monoméricas y por la formación de una cápsula y finalmente por el corte de proteínas de los filamentos de actina. Un importante regulador de la concentración intracelular de actina monomérica es la profilina, la cual modula la polimerización de actina en respuesta a señales de fosfatos de inositol. Gelsolina, vilina, fragmina, adseverina y scinderina comprenden una familia de proteínas estructuralmente relacionadas que son capaces de cortar filamentos de actina. Estas proteínas seccionan filamentos de actina, de una manera Ca^{2+} dependiente. La fragmentación de

filamentos puede servir como nueva nucleación y permiten una rápida repolimerización en respuesta a futuras señales. La actividad de estas proteínas cortadoras es inhibida por la unión de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [PI(4,5)P₂] ⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾

Entrecruzamiento de actina. La superorganización de polímeros de actina en una red de filamentos es mediada por el extremo de unión de actina o por el entrecruzamiento de proteínas (α -actina, filamina, fimbrina y vilina). Varias isoformas de α -actina existen en el ángulo de las bifurcaciones entre los filamentos de actina o en uniones entre filamentos de actina paralelos que generan haces de actina. La actividad de entrecruzamiento de α -actina es incrementada por fosfatidilinositol cuatro fosfato [PI(4)P] o por fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato [PI(4,5)P₂] y algunas isoformas son dependientes de Ca²⁺. La filamina también entrecruza filamentos de actina, pero en contraste con α -actina, su actividad es disminuida por uniones a fosfatidilinositol. ⁽⁵⁶⁾

Nucleación de actina. Las múltiples funciones de la actina del citoesqueleto es determinante para que los filamentos de actina no se generen azarosamente ni uniformemente por toda la célula, más bien en sitios discretos de la membrana plasmática.

La adhesión focal y las uniones adherentes son complejos asociados a membrana que sirven como sitios de nucleación para los filamentos de actina y como interacción entre el exterior de la célula y la actina del citoesqueleto. La adhesión focal media la adhesión célula sustrato y consiste de receptores de tipo integrina que se unen a la matriz extracelular y se asocian intracelularmente con complejos proteicos que contienen talina, vinculina, actina, paxilina, tensina, zyxina, y la cinasa de adhesión focal (FAK). Las uniones adherentes participan en la interacción célula-célula y consisten en agrupaciones de caderinas que son complejos intracelulares con proteínas como vinculina, α -actina, catenina, ERM (ezrina, radixina, moesina) y filamina. Muchas de estas proteínas contienen sitios de unión a fosfatidilinositol y es probable que sean punto de señales para diferentes vías intracelulares. Las proteínas Arp pueden mediar la nucleación de actina por servir como una plantilla de actina. ⁽⁵⁷⁾

Movimiento de actina. El movimiento de los filamentos de actina con la célula es controlado por la miosina. La miosina es una proteína motora que interactúa con los polímeros de actina y que traduce energía de la hidrólisis del ATP a fuerza mecánica y movimiento. Se han distinguido hasta la fecha 13 clases de miosinas. Las miosinas están involucradas en la separación celular, son requeridas para el transporte de ciertas vesículas secretoras a lo largo de los cables de actina de la célula madre a la hija. Se han implicado en el control de los receptores que median la endocitosis y en la organización de la actina del citoesqueleto. ⁽⁵⁸⁾

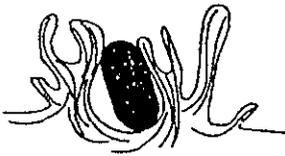
Señales de la actina del citoesqueleto por Rho GTPasas. Estudios en células mamíferas han demostrado que Rho GTPasas son la llave de regulación de

señales extracelulares o estímulos intracelulares y el ensamblaje y organización de la actina del citoesqueleto.

Las proteínas Rho (Ras homóloga) pertenecen a la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas. ⁽⁵⁹⁾

La alta plasticidad del citoesqueleto es a menudo alterada por la entrada de patógenos a la célula, normalmente no fagocítica, y en algunos casos durante la diseminación de estos patógenos en las células y tejidos. La actina del citoesqueleto juega un rol crítico durante la infección. ⁽⁶⁰⁾

Muchos microorganismos patógenos tienen la capacidad de inducir su propio conducto en las células mamíferas no fagocíticas. El proceso de entrada es similar a la fagocitosis y requiere reorganización de la actina del citoesqueleto subyacente a la membrana plasmática en donde contacta el patógeno. La alteración del citoesqueleto por una bacteria patógena durante la entrada puede ser dividido en dos mecanismos generales de acuerdo al tipo de cambios que ocurren en la célula huésped. Estos mecanismos (zipper o cremallera y trigger ó gatillo) fueron propuestos para partículas fagocíticas. El modelo zipper emplea la interacción de un ligando bacterial con un receptor en la célula huésped. En contraste los patógenos clásicos del modelo trigger activan respuestas que provocan el rizamiento de la membrana inducido por factores de crecimiento. (Fig. 14)



"TRIGGER" MECHANISM

Salmonella typhimurium



"ZIPPER" MECHANISM

Listeria monocytogenes

Figura 14. Mecanismo de fagocitosis inducida por patógenos bacterianos. Salmonella induce pliegues en las membranas celulares y Listeria se interna en forma de zipper. (Tomada de Mengaud et al 1996. E cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of Listeria monocytogenes into epithelial cells Cell 84; 923-032.)

Entrada Vía Zipper ó cremallera

Listeria monocytogenes agente etiológico de listeriosis, tiene la capacidad de entrar a una gran variedad de células mediante la vía zipper. Dos proteínas de superficie bacterial están involucradas en la entrada de esta bacteria a las células, InIA (internalina) y InIB. InIA es una proteína de 80-kDa que contiene una región rica en lucina repetida (LLRs), se sabe que InIA es suficiente para la entrada bacterial ⁽⁶²⁾

El receptor de InIA es E-caderina, una glucoproteína de 110-kDa responsable para la adhesión célula-célula Ca^{2+} dependiente. La región extracelular de E-caderina consiste en 5 módulos. La porción citoplasmática de E-caderina está asociada con las cateninas, las cuales interactúan con la actina del citoesqueleto. La presencia de la porción citoplasmática es esencial para las fuertes interacciones célula-célula. ⁽⁶³⁾

La fosforilación en residuos de tirosina y los reacomodos del citoesqueleto son necesarios para la entrada regulada por las proteínas InIA y por InIB; inhibidores de tirosin quinasa (genistein) e inhibidores de la polimerización de actina (citocalasina D) impiden la internalización bacterial. Las quinasas involucradas no han sido identificadas. Otras proteínas necesarias para la entrada, pero no para la adhesión son: fosfatidilinositol, la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI-3quinasa) y p85, p110. La enzima PI 3-quinasa es activada en la entrada bacterial, conduciendo un rápido incremento en los productos lipídicos de PI 3-quinasa. Esta activación requiere InIB, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en la célula huésped y la asociación de p85 con una o más proteínas fosforiladas en tirosina. El pretratamiento de las células huésped con citocalasina D no impide la activación de PI 3-quinasa, esto sugiere que la estimulación de esta quinasa se produce por la adhesión bacterial extracelular y precede a los reacomodos del citoesqueleto. Recientemente se ha demostrado que en plaquetas, los productos lipídicos de PI 3-quinasa pueden directamente afectar el ensamblaje por el encapsulamiento de los extremos de los filamentos de actina. También se sabe que PI 3-quinasa puede interactuar con pequeñas GTPasas Ras y esta interacción puede estar involucrada en los cambios citoesqueletales necesarios para la entrada. ⁽⁶⁴⁾

Entrada por la vía tipo trigger ó gatillo

En *Salmonella*, a diferencia de *Listeria*, los mecanismos de entrada parecen ser más complejos. En el sitio bacterial, más de 20 productos genéticos son necesarios para este tipo de entrada. En el citoplasma celular, se produce un inicial contacto de *Salmonella typhimurium* sobre la superficie celular lo que activa una respuesta dramática en la superficie de células epiteliales, caracterizado por largas proyecciones membranales similares a los pliegues, ondulaciones inducido por algunos factores de crecimiento u oncogenes. El reacomodo del citoesqueleto culmina en la formación de las proyecciones de la membrana plasmática que conduce a un sumergimiento y una entrada pasiva de otra bacteria o de partículas localizadas cercanamente a estas membranas altamente dinámicas en un proceso similar a la macropinocitosis. ⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾

Muchas de las proteínas bacteriales requeridas para la captura de *Salmonella* comprenden un sistema de secreción tipo III. Estos aparatos constituidos por sitios *inv/spa/pr*, se presentan en muchos patógenos gram-negativos y permiten la translocación de proteínas efectoras sobre o debajo de las células huésped. ⁽⁶⁸⁾

Dos proteínas secretadas via el sistema especializado tipo III de secreción son candidatas para efectuar la entrada a la célula huésped: SipB y SipC. Aún no se conoce como actúan estas proteínas en el reacomodo del citoesqueleto durante la invasión ⁽⁶⁷⁾

Los receptores de cada proteína secretada por *Salmonella* no es aún conocido. La invasión de células Henle-407 por *S. typhimurium* ha sido asociada con la fosforilación en residuos de tirosina del receptor del factor de crecimiento epidermal. Estudios recientes indican que el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) no es requerido para la internalización pero sí se ha caracterizado que la activación de este receptor es un fenómeno indirecto. *S. typhimurium* induce una cascada de señales en la célula huésped que conducen a la captación de la bacteria. Incremento en los fosfatos inositol, incremento en la concentración intracelular de calcio y cambios en el metabolismo de lípidos son los eventos implicado en la entrada de *Salmonella*. Es posible que la bacteria estimule la fosfolipasa C del huésped, esta induce la producción de IP₃, la cual provoca la movilización de calcio de los almacenes intracelulares. Los flujos de calcio pueden afectar la captura debido a que este ión controla actividades de varias proteínas que unen actina como α -actinina, talina, y ezrina, las cuales son recluidas a los sitios de entrada. Un estudio reciente indica que la proteína Cdc42 es requerida en la internalización de *Salmonella*. Hasta el momento se desconoce como estos eventos se relacionan ni la secuencia precisa que llevan a la internalización de la bacteria. ⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾ (Fig. 15)

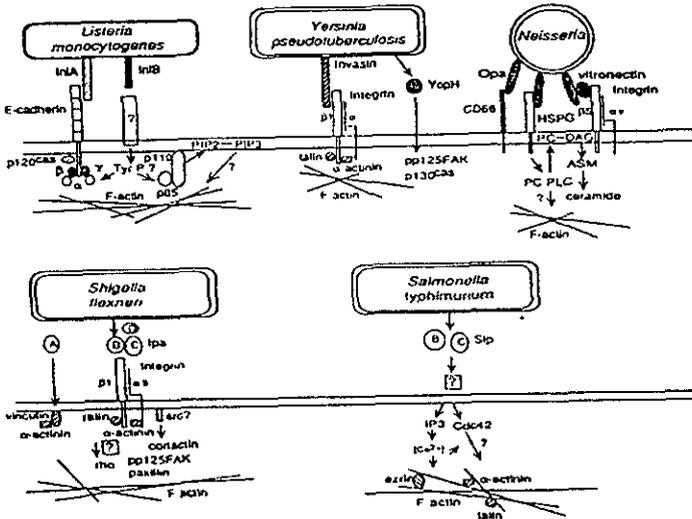


Figura 15. Transducción de señales por la fagocitosis de patógenos. (Tomada de Dramsi S. and Cossart P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. Cell Dev. Biol. 1998 14: 140.)

Como se ha mencionado en líneas anteriores las bacterias participan de forma importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal entre las que se encuentran miembros de los géneros de *Bacteroides* y *Actinobacillus*. A continuación se describirá algunas de las características de la bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, este microorganismo está implicado en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad periodontal.

3.4. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

actis = rayo; *myces, mycetus* = hongo; *comitans* = acompañado. Porque se han aislado en asociación con *Actinomyces* en lesiones micóticas. ⁽¹⁷⁾

3.4.1. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

Las células de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* son esféricas o bacilares que miden 0.3 a 0.5µm de ancho por 0.6 a 1.4µm de largo. Son bacterias gram-negativas no encapsuladas y no mótil. Son anaerobios facultativos, pero crecen mejor bajo condiciones microaerofílicas en una atmósfera de 10% de dióxido de carbono (CO₂).

Las colonias alcanzan un tamaño máximo de 1 mm después de 2 o 3 días a 37°C, son colonias translúcidas, y no hemolíticas. La morfología de las colonias en el medio puede variar, existen cepas, que se cree poseen fimbrias, que exhiben colonias de superficie rugosa con una forma estrellada que se adhieren firmemente al agar mientras que las colonias que presentan componentes no fimbriales, como vesículas, material extracelular amorfo o extensiones fibrilares de la membrana, exhiben una morfología lisa y no adherente al agar. ⁽²⁰⁾⁽³⁹⁾

El crecimiento en caldo es en forma de gránulos que tienden a adherirse a la superficie interna del tubo. ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ El agar soya trypticasa, 5% de sangre de carnero y agar chocolate permiten un buen crecimiento; el microorganismo no crece en agar de MacConkey. Se han descrito medios selectivos para el crecimiento de esta bacteria como son: el agar verde de malaquita-bacitracina (MGB) o el agar soya trypticasa selectivo suplementado con suero y bacitracina-vancomicina (agar TSBV). ⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

3.4.2. ASPECTO CLÍNICO

A. actinomycetemcomitans aunque se ha obtenido de lesiones o infecciones con especies de *Actinomyces* en la mayoría de los casos ha sido aislado solo. *A. actinomycetemcomitans* es un habitante en la mucosa oral humana. Se ha aislado en gran número de la placa subgingival y se le considera como un importante patógeno en la periodontitis del adulto, en algunos casos en la periodontitis refractaria y en la periodontitis de rápida progresión pero más específicamente esta relacionado en la etiología de la periodontitis juvenil localizada. ⁽¹⁹⁾

Adherencia. Se sabe que *A. actinomycetemcomitans* tiene la capacidad de unirse a células epiteliales, ⁽²¹⁾ fibroblastos gingivales, ⁽²⁷⁾ hidroxiapatita del esmalte ⁽²⁰⁾ y a componentes salivales ⁽²⁹⁾. Aunque aún no están bien establecido

los mecanismos de adhesión e invasión a estas estructuras se han realizado numerosas investigaciones para definir la actividad patogénica de esta bacteria.

Estudios de microscopía electrónica de barrido muestran que *A. Actinomycetemcomitans* se adhiere a células epiteliales después de 12 horas de tratamiento. La bacteria parece estar unida a microvellosidades a la superficie celular.

Micrografía obtenida de microscopía de transmisión electrónica muestra que *A. actinomycetemcomitans* se adhiere a la superficie de las células epiteliales. La microscopía electrónica revela así mismo que cepas diferentes de *A. Actinomycetemcomitans* tienen distintas características de superficie: pequeñas vesículas, extensiones fibrilares membranales, material extracelular amorfo y fimbrias, estos componentes de superficie juegan un papel importante en la adhesión de *A. actinomycetemcomitans*.

Se ha demostrado que las fimbrias presentes en *A. actinomycetemcomitans* juegan un papel muy importante en la adhesión de la bacteria a células epiteliales.^(30,31) Se ha reportado que una proteína de 11kDa de *A. actinomycetemcomitans* funciona como una adhesina asociada a fimbrias. Es posible que ciertas cepas tengan un potencial mayor para exhibir fimbrias que otras. Intuye et al, purificaron fimbria con 54kDa de subunidades proteicas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 310, aislado de un paciente con periodontitis rápidamente progresiva.⁽³⁵⁾

La presencia de vesículas extracelulares (ExVes): brotes de las vesículas membranales, que son extrusiones de la membrana externa pueden funcionar en la adherencia de *A. Actinomycetemcomitans* como sucede con otras especies orales gram-negativas (*Porphyromonas gingivalis*).⁽²⁶⁾⁽³⁷⁾

Existen cepas de *A. actinomycetemcomitans* asociadas con material extracelular amorfo (ExAmMat) que se adhieren mejor a células epiteliales que aquellas que no presentan este material. Sin embargo ExAmMat es capaz de interactuar con otras cepas de *A. actinomycetemcomitans* y proporcionar su adherencia. ExAmMat resulta ser altamente proteico.

Se ha observado que tanto ExAmMat y ExVes incrementan la adherencia de *A. actinomycetemcomitans*. Estudios de electroforesis de SDS-PAGE muestran perfiles proteicos de cepas que presentan ExAmMat y ExVes, los geles revelan que ambas son entidades diferentes pues las bandas más prominentes en ExVes son de 33 y 46 kDa, las cuales no están presentes en ExAmMat, mientras que las bandas más prominentes en ExAmMat fueron de 77 y 60 (double)kDa.⁽³⁷⁾

Estos resultados sugieren que ExVes y ExAmMat no sólo juegan un papel importante en la adherencia bacteriana a las células epiteliales sino también en la interacción del complejo entre especies gram-positivo y gram-negativo y en la formación de la placa dental.⁽³⁷⁾

Internalización. Se cree que la invasión de *A. actinomycetemcomitans* a células epiteliales se lleva a cabo por endocitosis aunque esta idea no está aún clara. Se ha demostrado que la adición de monodansilcadaverina y bacitracina, (inhibidores de endocitosis mediada por receptores en células eucariotas), al inoculo bacteriano antes de la infección a las células epiteliales en diferentes concentraciones, promueven la inhibición de la invasión bacteriana sobre las células

epiteliales de una manera dosis dependiente. El pretratamiento con monodasilcadaverina y bacitracina en el medio de las células epiteliales antes de la infección con la bacteria produce un decremento en la invasión de hasta el 58% y 62%.⁽³⁹⁾

Parásitos y toxinas localizadas dentro de la célula huésped evita el daños de las enzimas letales de las células eucariotas por una variedad de medios. Algunas bacterias en el entorno intracelular son resistentes a los efectos antimicrobiales del endosoma, mientras otras bacterias sobreviven por inhibición de la acidificación del endosoma. Existen algunos parásitos intracelulares y toxinas bacterianas, incluyendo la toxina difterica, que requiere una acidificación endosomal para su activación después de la entrada a la célula huésped.⁽³⁸⁾ Se ha reportado que *A. actinomycetemcomitans* entra a las células eucariotas mediante el sistema de endosoma pero más tarde se encuentra libre en el citoplasma celular.⁽²⁹⁾ Por lo tanto se supone que *A. actinomycetemcomitans* es resistente a los efectos letales del endosoma. Investigaciones realizadas en donde se inhibe la acidificación del endosoma no se aprecia cambio en la invasión de *A. actinomycetemcomitans* a células epiteliales proponiéndose así que *A. actinomycetemcomitans* es capaz de inhibir la acidificación endosomal o bien requiere de la acidificación endosomal para librarse de la vacuola endocítica.⁽³⁹⁾

Una micrografía obtenida de estudios de microscopía electrónica de transmisión muestra que *A. actinomycetemcomitans* se adhiere a la superficie de las células epiteliales. Los especímenes tratados con anticuerpos específicos dirigidos contra *A. actinomycetemcomitans* y la adición de una proteína A marcada con oro muestra células bacterianas dentro de las células epiteliales en estos estudios no se observa membranas rodeando a *A. actinomycetemcomitans* en el medio intracelular. Estos resultados muestran que el conducto de internalización de la membrana vacuolar desaparece. En estos estudios se revela de igual forma que *A. Actinomycetemcomitans* en el entorno intracelular se puede dividir.⁽⁴⁰⁾

Invasión y transducción de señales. La invasión microbial a las células huésped y a los tejidos es un importante paso en la progresión de la infección bacterial. Clínicamente se ha observado la capacidad de invasión de *A. actinomycetemcomitans* a tejidos periodontales al ser obtenido de tejido gingival enfermo. Se ha determinado que la capacidad de *A. actinomycetemcomitans* para invadir las células epiteliales humanas es mejor a temperaturas de 37°C que a 4°C. Así mismo, una buena proporción de bacterias que se adhirieron a 4°C se internaliza a 37°C.⁽³⁹⁾

La inhibición de la síntesis proteica de *A. actinomycetemcomitans* significativamente inhibe la invasión de esta bacteria a células epiteliales. La síntesis de novo proteína bacterial es necesaria para la invasión, por lo que no se cree que una masa de proteínas bacteriales preformada medie la invasión. Se requiere tanto síntesis proteica de células eucariotas como de células bacterianas para que se lleve a cabo la invasión.⁽³⁹⁾

La inhibición de la síntesis de RNA o de DNA no afecta, aparentemente, la invasión de *A. actinomycetemcomitans* a la célula huésped. La experimentación de esta bacteria sobre células epiteliales con adición de ácido nalidixico, un inhibidor de la síntesis bacteriana de DNA, o de rifampina, un inhibidor de la

síntesis de RNA bacterial, no inhibe la invasión después de 4 horas. Ahora bien, la incubación de *A. actinomycetemcomitans* por un total de 6 horas (suficiente para que la bacteria produzca una generación) en presencia de ácido nalidíxico o rifampina resulta en un sustancial decremento de la viabilidad bacteriana⁽³⁹⁾

Se ha demostrado que la energía metabólica, tanto glucólisis como fosforilación oxidativa son prerequisites para la invasión de *A. actinomycetemcomitans* a células epiteliales. Ensayos donde se tratan células epiteliales y células bacterianas con iodoacetato y dinitrofenol inhibidores de la glucólisis y la fosforilación oxidativa respectivamente, bloquean la invasión. Lo que sugiere que la energía metabólica, tanto glucólisis como fosforilación oxidativa son prerequisites para a la invasión de *A. actinomycetemcomitans*.

Los microtúbulos son componentes importantes del citoesqueleto de células mamíferas que ayudan a mantener la arquitectura celular y que colaboran en el movimiento de los orgánulos o de la célula entera⁽⁴⁴⁾. La inhibición de microtúbulos no inhibe la invasión de *A. actinomycetemcomitans* a células epiteliales humanas.⁽³⁹⁾

Virulencia. *A. actinomycetemcomitans* produce un número considerado de factores de virulencia estos factores incluyen una leucotoxina la cual puede destruir leucocitos polimorfonucleares,⁽²⁴⁾ una endotoxina lipopolisacárido,⁽²⁵⁾ colagenasa,⁽³²⁾ un factor de inhibición fibroblástico⁽²³⁾ una epiteliotoxina⁽³³⁾ y un factor no endotóxico de reabsorción ósea.⁽²⁶⁾ Estos factores ayudan a la invasión de *A. actinomycetemcomitans* a células epiteliales y pueden ser un efectivo medio para eludir los mecanismos de defensa del huésped y contribuir con el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Se ha demostrado la presencia de un componente termolábil y neutralizable de *A. Actinomycetemcomitans* el cual inhibe la proliferación de fibroblastos gingivales humanos.

Experimentación con una cepa leucotóxica de *A. actinomycetemcomitans* muestra una dosis media de inhibición de proliferación fibroblástica (ID50) de 2mg/ml, una concentración que bien puede ser alcanzada *in vivo*. *A. actinomycetemcomitans* es entonces un mayor inhibidor fibroblástico que *Capnocytophaga spp.*⁽²⁷⁾

La sensibilidad al calor de la leucotoxina y del factor de inhibición fibroblástico son diferentes. La actividad leucotóxica es inhibida por completo a temperaturas de 56°C por 30 min., mientras a temperaturas mayores de 70°C no se inactiva el factor de inhibición fibroblástica. Las endotoxinas son termoestables.⁽²⁷⁾

A. actinomycetemcomitans presenta citotoxicidad a fibroblastos gingivales humanos.⁽⁴⁵⁾ Esta actividad citotóxica de *A. actinomycetemcomitans* es mediada a través de inhibidores de la síntesis de DNA.⁽²⁷⁾

Factores del Huésped. La saliva puede influir en la formación de complejos microbiales en la superficies orales. Por un lado, la acción entre los componentes salivales con las adhesinas de superficie bacterial que bloquean la interacción entre los receptores en los tejidos de huésped, ellos pueden mediar la agregación y el paso de la bacteria. Y por el otro lado, las proteínas salivales que

cubren el diente y la mucosa, pueden funcionar como sitios receptores adicionales para la adhesión bacteriana, con ello incrementar la colonización en las superficies orales. ⁽²⁸⁾

Estudios realizados han demostrado que la unión de la saliva humana con *A. actinomycetemcomitans* inhibe la adhesión de la bacteria a célula orales humanas. ⁽²⁹⁾ Estudios recientes, han identificado mucina salival de bajo peso molecular unida a *A. actinomycetemcomitans* a través del ácido siálico que se une a las adhesinas de *A. actinomycetemcomitans*. Esta adhesión se presenta tanto en ausencia o presencia de fimbrias. ⁽²⁸⁾

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los efectos de la adherencia de *Actinobacillus actinomycescomitans* sobre los fibroblastos gingivales humanos y determinar las vías de transducción implicadas en este evento

4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Se determinará la capacidad de *A. actinomycescomitans* para adherirse a fibroblastos gingivales humanos mediante tinción de GIEMSA y se estimará el papel de la manosa en la adhesión.
- Se estudiará el reacomodo del citoesqueleto, específicamente de los filamentos de actina de fibroblastos gingivales humanos por la adherencia de *A. actinomycescomitans*.
- Se cuantificará la liberación de calcio vía retículo endoplásmico que provoca la unión de *A. actinomycescomitans* a fibroblastos gingivales humanos mediante el tratamiento de las células con el fluoróforo FURA 2/AM.

5. HIPÓTESIS

H. A. Si existe adhesión entre *A. Actinomycetemcomitans* y fibroblastos gingivales humanos por lo tanto se observará unión curso temporal tras el tratamiento de la células con la bacteria.

H. O. Si no existe adhesión entre *A. Actinomycetemcomitans* y fibroblastos gingivales humanos, por lo tanto no se observará unión curso temporal tras el tratamiento de las células con la bacteria.

H. A. Si la adherencia de *A. Actinomycetemcomitans* es fimbrias-manosa dependiente, la adherencia de *A. Actinomycetemcomitans* a fibroblastos gingivales humanos se alterará por presencia de manosa.

H. O. Si la adherencia de *A. Actinomycetemcomitans* no es fimbria-manosa dependiente, la adherencia de *A. Actinomycetemcomitans* a fibroblastos gingivales humanos no se alterará por presencia de manosa.

H. A. Si existe reacomodo en el citoesqueleto de los fibroblastos gingivales humanos por *A. Actinomycetemcomitans*, se observará cambio en la fluorescencia de los filamentos de actina seguido del tratamiento con faloidina.

H. O. Si no existe reacomodo en el citoesqueleto de los fibroblastos gingivales humanos por *A. actinomycetemcomitans*, no se observará cambio en la fluorescencia de los filamentos de actina seguido del tratamiento con faloidina.

H. A. Si la adherencia de *A. Actinomycetemcomitans* libera calcio intracelular en fibroblastos gingivales humanos se observará mayor fluorescencia al cargar las células con FURA 2/AM. Esta respuesta será curso temporal y dosis dependiente.

H. O. Si la adherencia de *A. Actinomycetemcomitans* no libera calcio intracelular en fibroblastos gingivales humanos no se observará mayor fluorescencia al cargar las células con FURA 2/AM. Esta respuesta no será curso temporal ni dosis dependiente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS

Las cepas bacterianas usadas en este estudio fueron *Actinobacillus actinomycetemcomitans* aislada de paciente con periodontitis juvenil activa. Se caracterizó mediante pruebas bioquímicas y tinción de gram.

6.1.1. MEDIOS DE CULTIVO

La cepa se creció en caldo y agar soya trypticasa (DIFCO Laboratories). Se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada que contiene 10% de CO₂. Para los ensayos se creció la bacteria 24 horas antes en medio infusión cerebro-corazón (DIFCO Laboratories) se centrifugó a 3,000rpm por 5 min. se retiró el sobrenadante y se resuspendió en buffer de fosfatos salino (PBS). El recuento bacterial se hizo mediante el porcentaje en la cámara de Newbawer.

6.1.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y TINCIÓN DE GRAM

Para la caracterización de *A. actinomycetemcomitans* se utilizó tinción de gram y las pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos (dextrosa, fructosa, glucosa, maltosa, manosa, manitol, sorbitol, ramnosa, rafinosa, sacarosa), inoculación en agar Mc Conkey, catalasa, oxidasa, fosfatasa, gelatinasa, lisina, ornitina descarboxilasa.

6.2. CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS

El cultivo de fibroblastos gingivales humanos se obtuvo de pacientes de la clínica de exodoncia. Las células se obtuvieron a partir de muestra de tejido libre de enfermedad periodontal. El tejido se lavó durante 6 ocasiones en solución de Hanks (GIBCO) suplementado con penicilina/fungizona(GIBCO). El tejido gingival se cortó en piezas de 1-2 mm y se sembró en cajas de 6 pozos en medio Dulbecco's Modificado por Eagles (GIBCO) suplementado con 2mM L-glutamina (GIBCO) 100u/ml de penicilina, 100mg/l de estreptomycin, 1mg/ml de fungizona (GIBCO) y 10% de suero bovino fetal. El explante se incubó a 37°C en 5% de CO₂. Los cultivos se alimentaron semanalmente. Las células se utilizaron entre los pases 5-15.⁽⁷¹⁾

6.3. ENSAYO DE ADHERENCIA

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron en 5% de CO₂ a 37°C en cajas de 24 pozos sobre cubreobjetos hasta confluencia. Las células fueron lavadas tres ocasiones con buffer de fosfato salino estéril (PBS) y se trataron con la bacteria a diferentes tiempos. Las células se lavaron 6 veces con PBS para retirar las bacterias no adheridas, se fijaron por 1 minuto con metanol al 10% y se tiñieron con el reactivo de GIEMSA por 30 minutos posteriormente se lavaron tres ocasiones con PBS. Los cubreobjetos se secaron con acetona, acetona-xileno y xileno, se montaron sobre portaobjetos y se observaron en fotomicroscopio Zeiss.⁽⁷²⁾

6.4. ENSAYO DE TINCIÓN DE ACTINA FLUORESCENTE

Las células se crecieron en cajas de 24 pozos sobre cubreobjetos hasta confluencia. Se fijaron por 10 minutos con 3.7% de formalina en buffer de fosfato salino (PBS). Las células se trataron con la bacteria a diferentes tiempos posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Para la visualización de F-actina las células se trataron con rodamina-faloídina (SIGMA) diluida 1:10 en PBS por 30 minutos.⁽⁷³⁾ Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos evitando la exposición a la luz y se observaron en fotomicroscopio Zeiss equipado con epifluorescencia.

6.5. DETERMINACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

Las células se crecieron en cajas de 48 pozos hasta subconfluencia. Las células se preincubaron con 2μM Fura 2/AM en DMEM por 30 minutos a 37°C. Después de ser marcadas con Fura 2/AM las células se lavaron con 2 ocasiones en Krebs-Ringer-HEPES buffer que contiene 120mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 0.96mM NaH₂PO₄, 0.2% glucosa, 0.1% suero albumina bovina, 1mM CaCl₂, 20mM HEPES buffer (pH7.4). Las células fueron lavadas 3 ocasiones con buffer de fosfato salino estéril (sPBS). El cultivo se trató con diferentes dosis de bacteria. La fluorescencia de las células marcadas con Fura 2/AM fue medida con fluoroscan a 340nm de longitud de onda en excitación y a 510nm de longitud de onda en emisión. La lectura en fluoroscan se hizo a diferentes tiempos.⁽⁷⁴⁾ Los niveles de fluorescencia se estimaron con la ecuación: $F = (F - F_{min} / F_{max} - F) * 100$. F_{max} (fluorescencia máxima) se estimó al agregar al cultivo celular tritón al 10%, F_{min} (fluorescencia mínima) se estimó con el quelante EDTA a 1mM. El ensayo se realizó por triplicado, los resultados representan la media para cada condición.

7. RESULTADOS

A fin de determinar la pureza del cultivo celular se realizaron la tinción de gram (Fig.1) y Pruebas bioquímicas (Tabla I). Nuestros resultados señalan que la tinción de gram corresponde a bacterias de forma cocoide-bacilar gram negativos y que al revisar los resultados de las bioquímicas con lo previamente publicado corroboramos que la bacteria corresponde a *A. Actinomycetemcomitans*

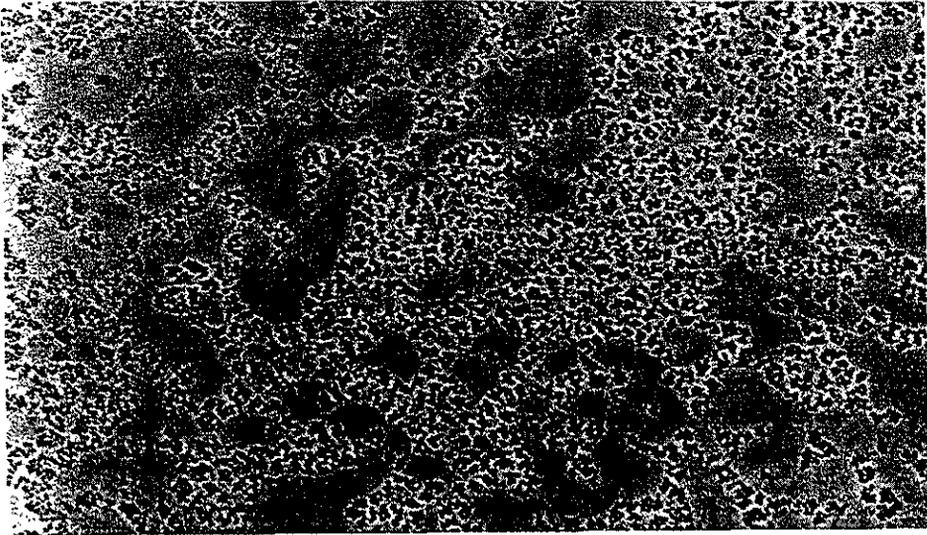


Figura 1. Microscopía óptica de tinción de gram de *A. actinomycetemcomitans*. La figura muestra bacterias cocobacilares gram negativo.

De los resultados obtenidos mediante los ensayos de técnicas bioquímicas obtuvimos los siguientes resultados.

Tabla I. Resultado de las Pruebas bioquímicas realizadas a <i>A. actinomycetemcomitans</i>			
CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS	CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
FERMENTACION		Rafinosa	Negativo
Dextrina	Variable	Sacarosa	Negativo
Fructuosa	Positivo	Crecimiento en Mc Conkey	Negativo
Glucosa	Positivo	Catalasa	Positivo
Maltosa	Positivo	Oxidasa	Positivo
Manosa	Positivo	Fosfatasa	Positivo
Manitol	Tardío	Gelatinasa	Negativo
Sorbitol	Negativo	Lisina descarboxilasa	Negativo
Ramnosa	Negativo	Ornitina descarboxilasa	Negativo

En otra serie de resultados en la investigación señalan que las bacterias se adhieren a los fibroblastos gingivales humanos después de 3 horas de incubación. La adherencia no se altera por la adición de manosa al cultivo.

Aproximadamente del 80 al 90% de las células se encontraron infectadas, después de 6 horas de tratamiento se detecta una mayor número de bacterias adheridas a la superficie celular, así mismo, la adherencia de estas bacterias a la superficie es independiente de la adición de manosa. (Fig. 2A-D)

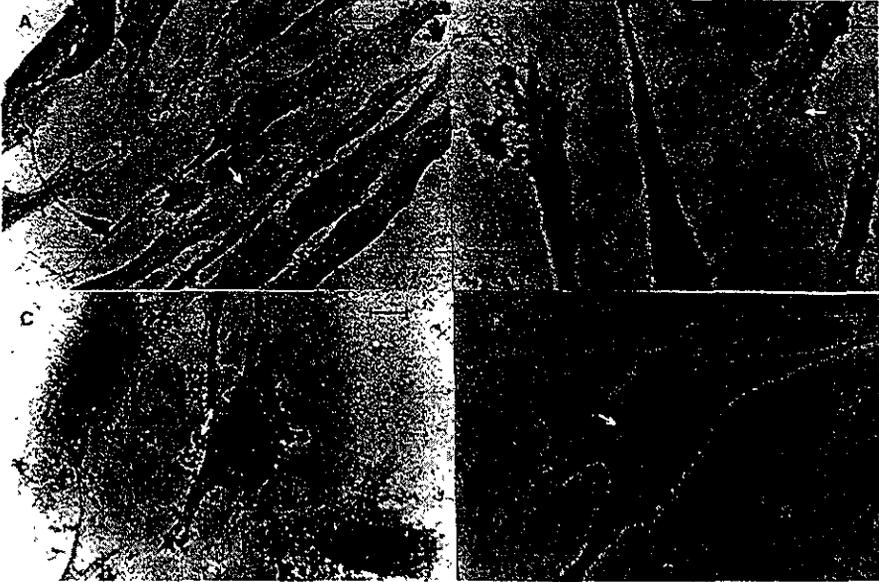


Figura 2. Fotomicroscopia óptica de la adhesión de *A. actinomycetemcomitans* sobre la adherencia en fibroblastos gingivales humanos.

Unión de *A. actinomycetemcomitans* a las células después de 3 horas de tratamiento, en ausencia de manosa (panel A) y en presencia de manosa (panel B)

Unión de *A. actinomycetemcomitans* a las células después de 6 horas de tratamiento, en ausencia de manosa (panel C) y en presencia de manosa (panel D)

En cuanto al efecto de *A. actinomycetemcomitans* sobre la organización del citoesqueleto. La malla de F-actina es difusa y ampliamente distribuida en todo el citoplasma de las células, se extienden de forma azarosa a todo lo largo de la célula. Cuando las células son tratadas con la bacteria, las células asumen una forma alargada y en ocasiones redondeada y aplanada. (Fig. 3A). A la hora y media de tratamiento la malla de F-actina adquiere una apariencia granulosa en lugar de la consistencia fibrosa.(Fig. 3B) A las tres horas de tratamiento las membranas y porciones del citoplasma se arrugan y algunas células adquieren una conformación redondeada.(Fig. 3C). A las cuatro horas media las fibras de F-actina adquieren una conformación casi completamente granular (Fig. 3D).

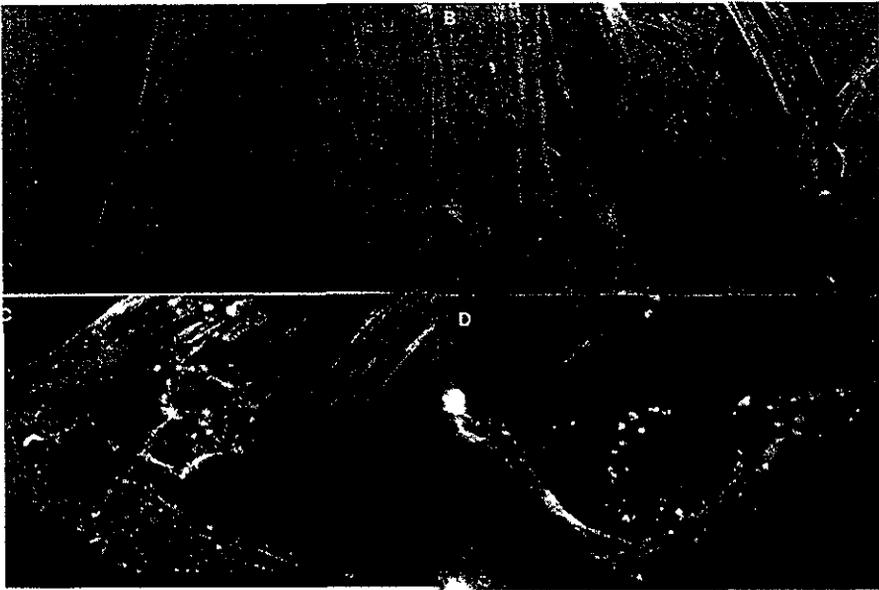
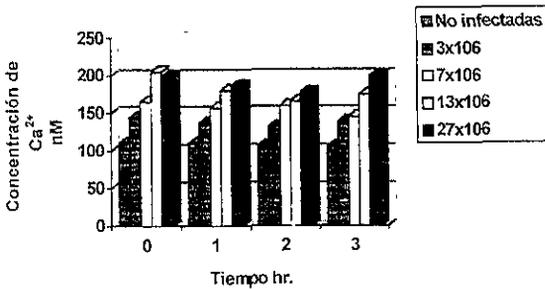


Figura 3. Fotomicroscopia de epifluorescencia. Organización del citoesqueleto de fibroblastos gingivales humanos por *A. actinomycetemcomitans*. Control, células en ausencia de la bacteria (panel A), células incubadas con la bacteria a 1.5 horas (panel B), a 3 horas (panel C), a 4.5 horas (panel D).

La concentración de calcio en fibroblastos gingivales humanos es de 110nM. La infección con *A. actinomycetemcomitans* causa un incremento en la concentración de calcio intracelular. El efecto se detectó desde el inicio de la infección y se conserva en 3 horas, no se aprecia variación significativa a 1, 2 y 3 horas. (Gráfica 1)

Tabla II. Dosis respuesta de la infección de *A. actinomycetemcomitans* sobre la movilización de calcio en fibroblastos gingivales humanos a diferentes concentraciones de la bacteria.

Condición	Tiempo 0	1 Hora	2 Horas	3 Horas
No infectadas	110±3.0	110±4.0	107±3.0	105±4.0
3x10 ⁶	145±2.0	137±5.0	132±2.0	138±2.0
7x10 ⁶	165±3.0	157±4.0	159±4.0	145±3.0
13x10 ⁶	205±2.0	180±5.0	165±5.0	174±4.0
27x10 ⁶	198±3.0	186±2.0	177±1.0	199±4.0



Gráfica 1. Elevación de la concentración de calcio a tiempo 0, 1, 2 y 3 horas de inoculada la bacteria. La movilización de calcio resulta ser dosis dependiente

8. DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación muestran la capacidad de *A. actinomycetemcomitans* de adherirse a los fibroblastos gingivales humanos, que tras 6 horas de tratamiento, tiempo en el que se produce la máxima adhesión, la bacteria no ha producido la muerte celular. Aunque se han hecho varios experimentos, no se ha determinado aun cual es el mecanismo que utiliza para adherirse a las células, se conoce que existen componentes membranales, tal como fimbrias, que sirven de unión para ciertas células. Se sabe que ciertos carbohidratos son específicos para la unión de lectinas (incluyendo fimbrias) en *E. coli* y en algunas especies de *Fusobacterium*, en donde al bloquear estos receptores disminuye su adhesión. En esta investigación se demostró que *A. actinomycetemcomitans* presenta unión dependiente del tiempo en los fibroblastos gingivales humanos y al agregar manosa al ensayo no se ve afectado la adhesión, esto corrobora estudios recientes donde se demuestra que al agregar manosa, manitol, glucosa, galactosa, fructuosa y ramnosa en ensayos de adherencia de *A. actinomycetemcomitans* a células epiteliales no se produce decremento en la adhesión de tres cepas diferentes de la bacteria. Lo que sugiere que *A. actinomycetemcomitans* probablemente utilice otro mecanismo de adhesión.

El citoesqueleto (microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios) realiza un importante trabajo de las proteínas intracelulares responsables para dar forma a la célula, motilidad, migración, polaridad y mantenimiento de contactos intercelulares involucrados en la arquitectura tisular. Se sabe que muchos patógenos como *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Escherichia coli* enteropatogénica alteran la actina del citoesqueleto durante la infección en células de la mucosa intestinal provocando densas concentraciones de microfilamentos de actina y puntos de intensa fluorescencia de actina por debajo de la unión de las bacterias sobre la superficie del huésped. El efecto que los patógenos realizan en los reacomodos de la actina es específico para cada bacteria. Durante esta investigación se observa el daño que se produce al citoesqueleto de fibroblastos gingivales humanos al apreciarse el reacomodo de actina celular en presencia de *A. actinomycetemcomitans*. Este reacomodo es en respuesta a un estímulo que tiene lugar en la membrana plasmática o dentro de la célula.

Se sabe poco sobre la liberación de calcio que produce *A. actinomycetemcomitans* pero estudios realizados en *Treponema denticola* sugieren que la bacteria no desencadena señales que involucren la liberación de calcio intracelular en fibroblastos gingivales humanos. En esta investigación la movilización de calcio intracelular que se observa durante el tratamiento de los fibroblastos gingivales humanos con *A. actinomycetemcomitans* ocurre inmediatamente al inocular el cultivo celular con la bacteria. Se desconoce si el calcio es proveniente de la vía del retículo endoplásmico debido a que Dantrolene, un inhibidor del calcio intracelular vía retículo endoplásmico, presenta fluorescencia intrínseca lo que impidió que se empleara durante el ensayo. Por

otro lado, investigaciones realizadas muestran que *Salmonella typhimurium* desencadena señales intracelulares que provoca reacomodo de actina en la célula huésped empleando proteínas Ca^{2+} dependientes. Esto sugiere que el calcio necesariamente podría estar involucrado al observarse F-actina en fibroblastos gingivales humanos después de tratarse con *A. actinomycetemcomitans*.

ESTA TERCERA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9. CONCLUSIONES

A. actinomycetemcomitans muestra gran capacidad de adherirse a los fibroblastos gingivales humanos, una vez producida esta adhesión, provoca señales intracelulares que alteran a la célula huésped. Esta adhesión resulta ser manosa independiente. Se confirma entonces nuestra hipótesis al observar reacomodo en la actina del citoesqueleto tras la adhesión de *A. Actinomycetemcomitans* a los fibroblastos gingivales humanos siendo este reacomodo curso temporal. Se afirma también que existe movilización de calcio, esta movilización resulta ser dosis dependiente. La variación en la concentración de calcio se mantiene después de tres horas de tratamiento.

En esta investigación se conoció el daño que *A. Actinomycetemcomitans* produce en los fibroblastos gingivales humanos y nos lleva a concluir que *A. actinomycetemcomitans* es una bacteria que participa como patógeno en la enfermedad periodontal alterando a un componente importante del periodonto.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Latarjet, M., Ruiz, A. Anatomía Humana. Colombia. 1989. 2a Edición. Editorial Médica Panamericana.
2. Carranza, F., Sznajder, N. Compendio de Periodoncia. Argentina. 1996. 5a Edición. Editorial Médica Panamericana.
3. Junqueira, L.C., Carneiro, J. Histología. México. 1988. 3a Edición. Editorial Salvat.
4. Fleming, T. Compendio de Periodoncia. España. 1995. Editorial Masson.
5. Nolte, W. Microbiología Odontológica. 1985. México. 4a Edición. Editorial Interamericana.
6. Zambon, J.J., Umemoto, T. et al. 1988. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Pathogenesis of Human Periodontal Disease. *Adv Dent Res* 2(2):269-274.
7. Slots, J., Reynolds, H.S. and Genco, R.J. 1980. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Human Periodontal Disease: a Cross-sectional Microbiological Investigation. *Infect Immun* 29: 1013-1020.
8. Zambon, J.J. 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Human Periodontal Disease. *J Clin Periodontol* 12:1-20.
9. Dzink, J.L., Tanner, A.C.R et al. 1985. Gram Negative Species Associated with Active Destructive Periodontal Lesions. *J Clin Periodontol* 12:648-659.
10. Simpson, J., et al. 1980. Identification of collagenase in cultured blood mononuclear cells. *J Den Res* 59:2.
11. Hausmann, E., et al. 1974. Structural requirements for bone resorption by endotoxin an lipoteichoic acid. *J Den Res.* 54:B94.
12. Aleo, J., DeRenzis, F. and Farber, P. 1975. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J periodontol* 11:639-645.
13. Attstrom, R., Homstrup, P., Nattestad, A. Dinamarca. 1997. Departments of Informatics and Periodontology.
14. Carranza, F.A. Periodontología Clínica de Glickman. México. 1987. 3a Edición. Editorial Interamericana.
15. Joklik, W., et al. Zinsser Microbiology. EUA. 1992. 20ª Edición. Editorial Appleton & Lange.
16. Krieg, N. Bergey's Manual Sistemic Bacteriology. 1984. EUA. Vol 1. Editorial Williams & Wilkins.
17. Sidney, M. Diagnóstico Microbiológico. Argentina. 1989. 7ª Edición. Editorial Panamericana.
18. Koneman., Allen., Dowell. Diagnóstico Microbiológico. Argentina. 1992. 3ª Edición. De Panamericana.
19. Zambon, J.J., et al. 1988. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of human periodontal disease. *Adv Dent Res* 2(2):269-274.
20. Meyer, D.H., and Fives-Taylor P.M. 1993. Characteristics of Adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to Epithelial Cells. *Infect Immun* 62(3): 928-935.
21. Kagermeier, A.S., and London, J. 1985. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* Y4 and N27 adhere to hydroxyapatite by distinctive mechanisms. *Infect Immun* 47: 654-658

22. Keith, P.M., and Fives-Taylor P.M. 1994. Adhesion of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* to a Human Oral Cell Line. *Infect Immun* 62(9):3672-3678.
23. Cogen, R.B., et al. 1986. Host Factors in Juvenile Periodontitis. *J Dent Res* (65): 394-399.
24. Baehni, P., et al. 1979. Interaction of Inflammatory cells and Oral Microorganisms. VIII. Detection of Leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun*. 24: 223-243.
25. Kiley, P., Holt, C. 1980. Characterization of lipopolysaccharide from *Actinobacillus Actinomycesetemcomitans* Y4 and N27. *Infect Immun* 30: 862-873.
26. Nowotny, et al., 1982. Release of Toxic Microvesicles of *Actinobacillus Actinobacillus*. *Infect Immun* 37: 151-154.
27. Stevens, R.H., Gatewood, C., Hammond, B.F. 1983. Cytotoxicity of the Bacterium *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* Extracts in Human Gingival Fibroblasts. *Archs Oral Biol* 28(11): 981-987.
28. Groenink, J., et al. 1996. Interaction of the Salivary low-molecular-weight mucin (MG2) with *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*. *Anto van Lee* 70: 79-87
29. Mintz, K. P., and Fives-Taylor, P. M. 1994. Adhesion of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* to a human oral cell line. *Infect Immun*. 62: 3672-3678
30. Gillespie, M. J., et al. 1990. Isolation and Characterization of fimbrial proteins from *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*. *J Den Res* 69:297.
31. Inouye, T. H., et al. 1990. Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett*. 69: 13-17.
32. Robertson, P. B., et al. 1982. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*. *Infect Immun* 17:275-283.
33. Sweet, S. P., Macfariane, T. W., and Samaranyake., L. P. 1989. An *in vitro* method to study the adherence of oral bacteria to HeLa cells. *Microbios* 60:15-22.
34. Ramford, S., and Ash, M. *Periodontology and Periodontics: Modern Theory and Practice*. Japón. 1989. Ishiyaku Euroamerica Inc.
35. Listgarten, M. A., and Lai, C. H. 1979. Comparative ultrastructure of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies. *J Periodontal Res*. 14:332-340.
36. Lai, C. H., Listgarten, M. A. and Hammond, B. F. 1981. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*. *J Periodontal Res*. 16:379-389.
37. Meyer, D. H., Fives-Taylor, P.M. 1993. Evidence that Extracellular Components Function in Adherence of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* to Epithelial Cells. *Infect Immun*. 61(11): 4933-4936.
38. Moulder, J.W. 1985. Comparative Biology of Intracellular Parasitism. *Microbiol Rev*. 49:298-337.
39. Sreenivasan, P. K., Meyer, D. H., and Fives-Taylor, P. M. 1993. Requirements for Invasion of Epithelial Cells by *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*. *Infect Immun*. 61(4): 1239-1245.
40. Philip, M.H., Pawlak, E. A. *Fundamentos de Periodoncia*. España 1992. 4ª Edición. Editorial Mosby.
41. Page, R. C., and Schroeder, H. 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. *Lab Invest* 33: 235-241.

42. Page, R. C., y cols. 1983. Prepuberal Periodontitis. I Definition of a clinical entity. *J Periodontol* 54: 257-271.
43. Page, R. C., y cols. 1983. Rapidly Progressive Periodontitis: A distinct clinical condition. *J Periodontol* 54:197-209.
44. Lehninger, L.A., Nelson, D. L., and Cox, M. M. *Principios de Bioquímica*. España. 1993. 2ª Edición. Editorial Omega.
45. Johansson, A., Bergenholtz, A., and Holm, S.E. 1996. Strong cytotoxicity to human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. *J Periodont Res* 31:477-482.
46. Genco, R.J., Goldman, H.M., and Cohen, D.W. *Periodoncia*. México. 1993. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. Vol I, II y III.
47. Stössel, T.P. 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260: 1086-1094.
48. Engel J., et al. The polymerization reaction of muscle actin. *Mol. Cell Biochem.* 18:3-13.
49. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. *Tratado de microbiología*. España. 1996. 4ª Edición. Editorial Masson.
50. Nobes, C.D., et al. Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J Cell Sci* 108:225-33.
51. Sun, H. Q., Kwiatkowska, K., Yin, H.L., 1995. Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7:102-110.
52. Janmey, P. A. 1994. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol.* 56: 169-91.
53. Yaffe, M.B., et al. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* 358:245-248.
54. Goldschmidt-Clermont P.J., et al. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell* 3: 1015-24.
55. Yonezawa, N., Nishida, E., Lida, K., et al. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and desoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol Chem* 256:8382-86.
56. Wash, T.P., et al. Calcium dependence of willin-induced actin depolymerization. *Bio-chemistry* 23:6099-6102.
57. Geiger, B., et al. The molecular basis for the assembly and modulation of adherens-type junctions. *Cell Differ. Dev.* 32:343-53.
58. Titus, M.A., 1993. Myosins. *Curr Opin Cell Biol.* 5:77-81.
59. Hall, A. 1994. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 1994; 10:31-54.
60. Donnenberg, M. S., Donohue-Rolfe, A., Keusche, G.T. 1990. A comparison of HEp-2 cell invasion by enteropathogenic and enteroinvasive *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 69:83-86.
61. Finaly, B.B., Falkow, S. 1988. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacteria invasion or intracellular replication. *Biocimie* 70:1089-1099.
62. Ireton, K., Cossart, P. 1997. Host pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu Rev Genet* 31:113-138

63. Overdium, M., et al. 1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267: 386-389.
64. Ireton, K., et al 1996. A role for phosphoinositides 3-kinase in bacterial invasion. *Science* 274: 780-782.
65. Francis, C. L., et al. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 364:639-642.
66. Francis, C.L., et al. 1992. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol Microbiol* 6:3077-3087.
67. Kaniga, K., et al. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasions are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *J. Bacteriol.* 177: 3965-3971.
68. Hermant, D., et al. Functional conservation of *Salmonella* and *Shigella* effectors for entry into epithelial cells. *Mol Microbiol* 17: 781-789.
69. Finaly, B.B., Ruschkowski, S. 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J Cell Sci.* 99:283-296.
70. Chen, L.M., Hobbie, S., Galan, G.E. 1996. Requirement of cdc-42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* 274:2115-2118.
71. Somerman, M.J., et al. 1988. A comparative study of human periodontal ligament cell and gingival fibroblast *in vitro*. *J. Dent. Res.* 67:66-70
72. Clark, G. 1973. Staining Procedures used by the Biological Stain Commission 3rd. Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
73. Barak, L.S., Yocum, R.R., Nothagel, E.A. 1980. Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenzo-2oxa-1,3-diazole phalloidin. *Proc. Natl. Sci. USA* 77:980-984
74. Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y.A. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-2450.