80

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

INDUCCION DE LA ENZIMA CATALASA POR LIPOPOLISACARIDOS EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

ERIKA INES GARCIA RUIZ

TUTOR: DR. JAVIER PORTILLA ROBERTSON.

ASESOR: GLORIA GUTIERREZ VENEGAS

MEXICO, D. F. 2000

283735

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

VNIVERSIDAD NACIONAL
AVPNOMA DE
MEXICO

J U R A D O

Presidente: _____
Dr. Javier Portilla-Robertson

Secretario: _____
MC. Jaime Esquivel-Soto.

Vocal: _____
Dra. Gloria Gutiérrez-Venegas

Suplente: _____
CD Luz Carmen González.

Suplente: _____
CD Verónica Vanegas Vidaurreta

La presente tesis titulada "Inducción de la enzima catalasa por lipopolisacáridos en cultivos de fibroblastos gingivales humanos", elaborada por la alumna García Ruíz Erika Inés; se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica, perteneciente a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, bajo la tutoría del Dr.Javier Portilla Robertson y la asesoría de la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas. El proyecto fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico PAPIIT IN224398.

Sustentante: _____
Erika Inés García Ruíz

Tutor: _____
Dr. Javier Portilla Robertson

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

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de estudiar dentro de esta máxima casa de estudios.

Al Dr. Javier Portilla Robertson por su asesoría para la realización de esta tesis.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por su ayuda incondicional para el desarrollo de la investigación y realización de esta tesis.

A Silvia Maldonado Frías una gran amiga y apoyarme para la realización de este rabajo.

A mis compañeros Mauricio Peña y al laboratorista Armando Flores integrantes del Laboratorio de Bioquímica de la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

A Cristina Trejo Sólis por su ayuda y enseñanza para la realización de este trabajo.

Finalmente a P A P I I T proyecto IN224398 por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

D E D I C A T O R I A S

A MIS PADRES:

POR EL APOYO OTORGADO A LO LARGO DE MI VIDA

POR EL AMOR, COMPRENSIÓN Y SOBRE TODO POR

SER UNOS PADRES MARAVILLOSOS.

A MIS HERMANOS:

JAVI, NORMA, LETY, QUIQUE Y ROSY

POR SER INCOMPARABLES HERMANOS

Y POR ESTAR SIEMPRE PRESENTES.

ANABEL Y CARLOS JAVIER

POR SER PARTE YA DE LA FAMILIA.

ÍNDICE.

	Pag
1. ABREVIATURAS.	
2. RESUMEN.	1
3. INTRODUCCIÓN.	3
4. ANTECEDENTES.	4
4.1 PARODONTO.	4
4.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL.	9
4.3 ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL	12
4.4 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL	14
4.5 ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.	14
4.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.	17
4.6.1 SIGNOS CLÍNICOS DE INFLAMACIÓN.	17
4.6.2 MEDICIÓN	17
4.6.3 TÉCNICAS RADIOGRÁFICAS.	17
4.7 MÉTODOS BIOQUÍMICOS.	19
4.8 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.	19
4.9 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.	19
4.10 ENDOTOXINAS BACTERIANAS.	20
4.10.1 RADICALES LIBRES Y ENZIMAS DETOXIFICANTES.	25

Pag

4.10.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LOS RADICALES LIBRES. 27

4.10.3 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO. 27

4.10.4 MECANISMO DE TRANSFORMACIÓN DE RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS. 28

4.10.5 ESTRÉS OXIDATIVO 30

4.10.6 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE CATALASA 31

4.10.7 LIPOPOLISACÁRIDOS RELACIONADOS CON CATALASA 32

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 36

6. JUSTIFICACION 38

7. HIPÓTESIS. 39

8. OBJETIVOS. 39

8.1 OBJETIVOS GENERALES. 39

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. 39

9. MATERIALES Y MÉTODOS. 40

9.1 CULTIVO CELULAR. 40

9.2 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR. 40

9.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA. 40

9.4 DETERMINACIÓN DE CATALASA POR WESTERN BLOT 42

Pag

10. RESULTADOS. 45

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS. 49

12.CONCLUSIONES 50

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

14. ANEXOS. 56

14.1 EQUIPO 56

14.2 REACTIVOS. 56

1. ABREVIATURAS.

CAT	ENZIMA CATALASA.
FGH	FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.
EROS	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO
SOD	ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA.
LPS	LIPOPOLISACÁRIDOS.
PAGE	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.
SOD Zn/Cu	ZINC-COBRE SUPERÓXIDO DISMUTASA.
PDB	PLACA DENTAL BACTERIANA

2. RESUMEN.

La reparación de tejidos es un campo del conocimiento en donde se realizan considerables estudios. Los eventos que ocasionan daño a los tejidos se han caracterizado en tres estadios, inicialmente como una respuesta inflamatoria, seguido de la formación de tejido nuevo y finalmente remodelación del tejido formado.

Para impedir la destrucción de tejidos, los fibroblastos, juegan un papel importante en la síntesis y mantenimiento de los componentes del tejido conectivo como colágeno, proteoglucanos y ácido hialurónico.

Por otro lado las bacterias gram negativas han sido ampliamente asociadas con los daños ocasionados en el parodonto debido a que poseen diversos componentes entre los cuales se encuentran los lipopolisacáridos que alteran la homeostasis de esta estructura celular, dentro de los efectos causados por los lipopolisacáridos se encuentran la producción de especies reactivas de oxígeno, que puede ser tóxicas para la célula, así mismo la célula tiene un conjunto de enzimas antioxidativas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutation peroxidasa que tienen la capacidad de descomponer especies reactivas de oxígeno que se forman durante el estrés oxidativo.

Con la finalidad de determinar si los lipopolisacáridos están involucrados en la expresión de la enzima catalasa en tejidos gingivales, se examinó el efecto de los lipopolisacáridos sobre la inducción de catalasa en cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos.

Durante el tratamiento con lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos a dosis de 1 a 100 μg/ml por 24 se demostró que se incrementa la actividad de la enzima catalasa hasta 4 veces sobre la actividad basal, este aumento en la actividad de la enzima no se ve reflejado en la síntesis de la misma al tratar con dosis fija de lipopolisacáridos 50 μg/ml a diferentes tiempos también se encontró un aumento en la actividad en FGH.

Los resultados obtenidos señalan que los lipopolisacáridos son capaces de inducir la actividad de la enzima catalasa en fibroblastos gingivales humanos a fin de combatir el estrés oxidativo.

3. INTRODUCCIÓN.

El modelo actual que trata de explicar la patogénesis de las enfermedades periodontales propone que esta afección ocurre como resultado de procesos infecciosos ocasionados por la placa subgingival. Se desarrolló este modelo a partir de los estudios realizados por Black entre las décadas de los 50 y 60, con el descubrimiento de que las enfermedades periodontales se asociaban a infecciones por las bacterias presentes en la placa dental lo que ocasionó que un gran número de microbiólogos se abocó a aislar y cultivar docenas de microorganismos. En la actualidad sabemos que más de una especie y probablemente la combinación de bacterias están involucradas en la etiología de la enfermedad periodontal.

Investigaciones posteriores se abocaron a estudiar la adhesión e interacción entre bacterias así como desarrollo y madurez de la placa dentobacteriana, se conoce con certeza que las respuestas celulares y humorales son activadas durante la enfermedad periodontal. Y estos resultados señalan que procesos inmunopatológicos están involucrados en la destrucción de tejidos.

Actualmente la terapia de la enfermedad periodontal consiste en la aplicación de drogas derivadas de la familia de las tetraciclinas que entre otras funciones se ha determinado que inhiben la resorción ósea. Las tetraciclinas modificadas se han utilizado para tratar enfermedades crónico inflamatorias incluida la enfermedad periodontal.

4. ANTECEDENTES.

4.1 PARODONTO:

El parodonto es una estructura que esta integrada por cuatro elementos que son los encargados de mantener al órgano dentario en su lugar y de protegerlo de los cambios del medio ambiente, estos elementos son: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar (Fig. 1).

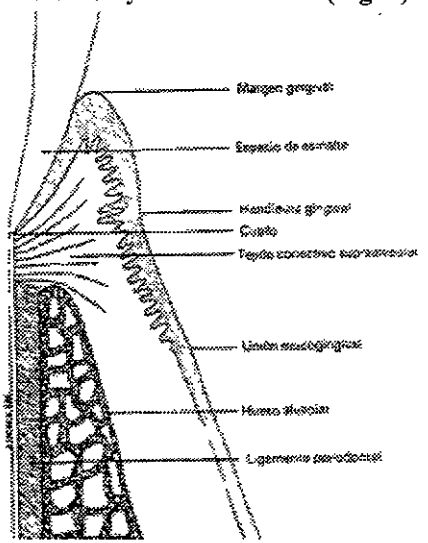

Fig. 1 Esquema del parodonto. Relaciones anatómicas del periodonto marginal normal. Tomado de Peridoncia Genco Ed. Interamericana)

La encía es la parte de la mucosa bucal que protege los procesos alveolares y las porciones cervicales de los dientes. Se divide en encía libre e insertada, esta división es una línea imaginaria que va del fondo del surco gingival hasta la unión mucogingival y presenta un grosor de 1 a 9 mm excepto en paladar duro, se ha establecido que es más ancha alrededor de los incisivos superiores e inferiores y decrece de forma gradual hasta llegar a los caninos y segmentos

laterales. La encía esta cubierta por tejido queratinizado y no queratinizado lo que dá una apariencia de cáscara de naranja, presenta una coloración rosa coral pálido de manera uniforme (aunque en ocasiones puede presentar diferentes coloraciones debido al grado de vascularización y aspectos ligados con la raza). La superficie gingival está cubierta por epitelio escamoso estratificado de tipo queratinizado y tejido conjuntivo fibroso denso. La profundidad del surco gingival en una encía sana varía de 1 a 3 mm y no debe de haber hemorragia [1].

El epitelio gingival se divide en varias capas de células: de epitelio queratinizado y no queratinizado. A su vez el tejido conjuntivo se divide en capa basal y membrana basal (lámina basal) y una capa de células espinosas. Dentro de la parte superficial del estrato espinoso existen varias capas de células aplanadas que forman, a su vez, la capa granular que está relacionada con la formación de queratina: la capa más superficial está queratinizada y es denominado también estrato córneo.

En el microscopio electrónico se ha demostrado que las células se encuentran sobre una membrana basal que consiste en una capa amorfa llamada lámina densa rica en colágena tipo IV. La lámina densa esta separada de la membrana de células epiteliales por una lámina lúcida que es abundante en laminina y por una red de fibras de tejido conectivo. El tejido conectivo supraalveolar está integrado por la estructura mesodérmica de la encía, cono y cresta del hueso alveolar formado por células, fibras, nervios y vasos sanguíneos incluidos en el tejido conectivo denso.

La célula principal es el fibroblasto, que sintetiza los elementos básicos del tejido conectivo; pero también es abundante en células mesenquimatosas indiferenciadas como mastocitos y macrófagos. Las fibras predominantes son de dos tipos: colágenas y de elastina; las fibras de oxitalán, estas últimas no participan en la fijación dental, aunque se ha establecido que tienen una participación destacada en la rigidez del ligamento. Se ha observado también que las fibras de oxitalán se asocian a los fibroblastos y sirven de guías para la emigración celular durante la erupción del diente. Las fibras se hallan en una relación estrecha con los capilares y las terminaciones nerviosas, lo que podría sugerir que tienen una intervención importante en la modulación del comportamiento de los vasos en el ligamento y en la producción de la respuesta neural. [1-5].

La colágena se organiza en fascículos que reciben su denominación obedeciendo a su emplazamiento, dirección y volumen: se dividen en fibras circulares y transeptales. Las *fibras circulares* pertenecen a la encía libre y rodean al diente en forma de anillo, mientras que las *fibras transeptales* van del cemento supraalveolar del diente en dirección mesiodistal através de la encía interdental, por arriba del tabique del hueso alveolar al cemento del diente contiguo. Otras fibras que participan en la fijación dental son las *fibras dentogingivales* son fibras en forma de abanico que emergen de la porción supraalveolar del cemento en toda la circunferencia del diente, y se extiende por fuera, por arriba y termina en la encía marginal; el otro grupo de fibras emerge de la misma área pero pasa por fuera, mas allá de la cresta alveolar en dirección apical dentro del mucoperiostio de la encía insertada estas fibras son las *fibras dentoperiósticas.*

La lámina propia de la encía insertada es una capa de tejido conectivo denso, dentro del cual se insertan la mayor parte de los sistemas de fibras, que participan en la unión de la lámina propia al periostio del proceso alveolar.
Las fibras gingivales, que son las fibras del ligamento periodontal, están formadas abundantemente por moléculas de colágena que son sintetizadas por los fibroblastos que corresponden al tipo I y en menor proporción por moléculas de colágena del tipo III, que va disminuyendo con la edad.

El ligamento periodontal está compuesto por fibras del estroma que se encuentran tapizadas de células vasculares y redes nerviosas. Los fibroblastos del ligamento son fusiformes y alargados y en un quince por ciento contienen retículo endoplasmático, que es el organelo responsable de la producción de colágena, la que se genera en los niveles ideales mediante un mecanismo que no ha sido elucidado hasta el día de hoy. El ligamento se encuentra integrado, así mismo, por glucosaminoglucanos de la matriz extracelular, en particular dermatán sulfato, condroitín sulfato y fibronectina [6-14]

La unidad dentoalveolar, que ejerce funciones de formación, nutrición y soporte, se halla compuesta por tres tipos celulares: cementoblastos, fibroblastos y osteoblastos y está constituida por el cemento, ligamento parodontal y hueso alveolar. Están presentes también vasos sanguíneos y redes de nervios que abastecen de nutrientes y tienen una responsabilidad manifiesta en los fenómenos de sensibilidad.
La matriz extracelular tiene gran importancia en el funcionamiento del parodonto.

Existen varios tipos de matrices extracelulares: a) matriz extracelular, b)matriz extracelular derivada de los fibroblastos y está constituida por colágena tipo I y III, condroitín sulfato y fibronectina, ácido hialurónico y condronectina y c)matriz extracelular de células epiteliales, formadas por heparán y laminina.[15-18]

Los fibroblastos parodontales secretan las fibras del ligamento parodontal que funcionan en soportar el diente en el hueso alveolar y restringir el movimiento de la pieza dental ante fuerzas masticatorias y ortodóncicas. Estas células recambian la colágena quince veces más frecuentemente que los fibroblastos de la piel y secretan además colagenasa, cuya función será el moldeamiento del ligamento parodontal. [19]

Por otro lado la porción ósea del proceso alveolar cubre los alvéolos dentro de los cuales encajan las raíces dentales, es un hueso compacto y delgado lo traspasan numerosas y pequeñas aberturas en las cuales penetran vasos sanguíneos y linfáticos así como fibras nerviosas. El hueso alveolar contiene las terminaciones adheridas de las fibras de tejido conectivo del ligamento periodontal (fibras de Sharpey).

El hueso es un tejido mesodérmico muy especializado compuesto por matriz orgánica y materia inorgánica; la primera está constituida por una red de osteocitos y sustancia extracelular, gran parte de la inorgánica esta compuesta por calcio fosfato y carbonato en forma de cristales de apatita.

4.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES DEL PARODONTO:

Entre los padecimientos parodontales más frecuentes, ocasionados por la acumulación de placa dentobacteriana (PDB) y sarro, se encuentran la gingivitis y periodontitis.

Gingivitis:

Se define como un proceso inflamatorio de la encía [20], se ha separado en tres estadios basados en la secuencia de los eventos histopatológicos que ocurren cuando la placa dentobacteriana se acumula en el margen gingival dividiéndola en lesión inicial, temprana y establecida. [21]

La lesión inicial aparece a los cuatro días de la acumulación de PDB manifestándose como una reacción inflamatoria, la lesión se caracteriza por incremento en el flujo de fluido crevicular y migración de leucocitos polimorfonucleares en el surco gingival provenientes del plexo vascular subyacente al epitelio de unión y surcal. Adyacente a este epitelio el infiltrado inflamatorio ocupa de 5 a 10% del tejido conectivo gingival donde se ha perdido colágena, la lesión inicial no es visible clínicamente. La lesión temprana sigue a la lesión inicial aproximadamente después de 7 días de la acumulación de placa dentobacteriana y persiste por 21 días o más tiempo y clínicamente es detectada como gingivitis. [22-23] La lesión temprana se caracteriza por la persistencia de la lesión inicial y el desarrollo de un infiltrado con macrófagos y linfocitos y algunas células plasmáticas localizadas en la periferia de la lesión. Los linfocitos comprenden el 75% de las células inflamatorias. El área infiltrada ocupa aproximadamente el 15% del tejido conectivo marginal con destrucción de colágena de un 60 a 70%. Migración de leucocitos en el epitelio de unión y surco gingival y el fluido crevicular que aumenta a los 6 a 12 días seguido a la detección de la gingivitis. Después de un período de tiempo

las lesiones tempranas evolucionan a lesiones establecidas caracterizadas por un incremento en el tamaño de la encía afectada y predominan las células plasmáticas y linfocitos B. Las lesiones establecidas pueden persistir por meses o años sin progresión.

La enfermedad gingival se clasifica por el tipo de reacción inflamatoria y puede ser crónica o aguda (cuadro 1):

En la gingivitis crónica el 25% de las bacterias corresponden al género gram-negativo y se encuentran bacterias como Veillonella, Campylobacter y B. intermedius.

Gingivitis asociada a PDB: es la más común de las enfermedades periodontales, se caracteriza clínicamente por enrojecimiento, sangrado, edema o alargamiento y sensibilidad gingival. Entre las bacterias presentes se encuentran miembros del género Actinomyces y Estreptococos en la placa supra y subgingival y con incremento en la flora subgingival de especies gram negativas como *F. nucleatum, V.parvula* y especies de Treponema.

Gingivitis influenciada por hormonas esteroides: es la gingivitis de la pubertad, embarazo, gingivitis asociada con anticonceptivos y terapia de esteroides, entre los microorganismos más ampliamente caracterizados se encuentran los Bacteroides, esta gingivitis se caracteriza por una respuesta exagerada a formar placa, intensa inflamación, enrojecimiento, edema y alargamiento.

Gingivitis asociada a medicamentos: como fenitoina, ciclosporina, nifedipina. Clínicamente la lesión comienza con alargamiento gingival en el margen y papila.

Gingivitis descamativa: se caracteriza por la descamación del epitelio gingival, dejando una superficie sumamente enrojecida.

Gingivitis ulcerativa necrozante: presenta una etiología compleja caracterizada por necrosis en las papilas gingivales, sangrado, dolor y halitosis. Se ha observado que se presenta invasión bacteriana por espiroquetas y un gran número de Bacteroides intermedius. [26] (cuadro 1)

Cuadro. 1. Clasificación de la Gingivitis.

CLASIFICACIÓN DE GINGIVITIS	*MICRORGANISMOS PRESENTES*
CRÓNICAS	Veillonella, Campylobacter y B.Intermedius. Actinimyces y Estreptococos
‣ Gingivitis asociada a PDB	
‣ Gingivitis relacionada con alteraciones hormonales.	Bacteroides
‣ Gingivitis descamativa	
‣ Gingivitis asociada a medicamentos.	
AGUDAS	
‣ Gingivitis ulcerativa necrosante.	Bacteroides intermedius
‣ Gingivoestomatitis herpertica primaria	

Periodontitis:

La conversión de una lesión establecida a una lesión avanzada denominada periodontitis, es caracterizada por destrucción del tejido conectivo, adherencia a la superficie de la raíz y pérdida de hueso alveolar. La lesión mantiene todas las características de la lesión establecida y adicionalmente se produce la migración apical del epitelio de unión y formación de bolsas. Puede producirse la invasión de bacterias en la bolsa. Clínicamente la periodontitis se caracteriza por la presencia de inflamación gingival, bolsas y pérdida del hueso alveolar.[24]

4.3 Etiología de la Enfermedad Periodontal.

La etiología se define como el conjunto de características que permite el conocimiento de las causas relacionadas con la enfermedad. En el caso particular de la periodontitis se ha establecido que los microorganismos de la placa dental así mismo la resistencia y susceptibilidad de los tejidos del periodonto a las bacterias u otros agentes nocivos contribuyen a los aspectos destructivos de esta enfermedad. (cuadro 2)

Los factores etilógicos los podemos clasificar en dos categorías de acuerdo a su sus orígenes:

Cuadro 2. Factores etiológicos de la enfermedad periodontal.

Factores locales	Factores sistémicos
⇨Cálculos	⇨Endocrinos (hormonales)
⇨PDB y materia alba	⇨Deficiencias nutricionales
⇨Iatrogénias: protesis desajustadas, etc.	⇨Medicamentos ej. Fenantoína
⇨Retención e impactación de alimentos	⇨Herencia
⇨Oclusión traumática	
⇨Empuje lingual	
⇨Respiración bucal	
⇨Hábitos	

Microorganismos:

Los microorganismos presentes en la placa y las bolsas peridontales presentan un gran potencial patogénico, estos microorganismos producen sustancias que son tóxicas para los tejidos como colagenasa, hialuronidasa, fibrinolisina, condroitín sulfatasa, neuramidasa, desoxirribonucleasa, ribonucleasa, amonio, proteasas, urea, indol y ácidos orgánicos. [25]

De igual forma microorganismos no viables derivados de la placa dentobacteriana tienen la capacidad de inducir daño en el tejido. Microorganismos gram-negativos son los que se encuentran presentes en las bolsas y liberan endotoxinas y lipopolisacáridos, se ha reportado que los niveles de inflamación se incrementan conforme aumenta la concentración de endotoxinas.

De los microorganismos que se han asociado con la gingivitis se encuentran *Actinomyces, Bacteriodes, Eikenella, Streptococcus, Fusobacterium, Veillonella y Treponema.* Y los asociados a periodontitis se encuentran *Actinobacillus, Bacteroides, Fusobacterium, Eikenella, Capnocytophaga y Eubacterium.*

Anatomía dental:

Aproximadamente el 6.5% de todos los molares contienen proyecciones cercanas a la unión cemento-esmalte, estos sitios son susceptibles a ser colonizados por microorganismos y al daño periodontal.

La pérdida ósea es más severa en zona de molares e incisivos. Los dientes más afectados por la enfermedad periodontal son los incisivos inferiores y molares

superiores, seguidos por los molares inferiores, incisivos superiores, premolares y caninos en ese orden.

Posición dental:
La posición dental y la maloclusión podrían incrementar la susceptibilidad a la periodontitis inflamatoria, por favorecer el incremento en la acumulación de la placa dentobacteriana lo que promueve daños mecánicos a la encía a los tejidos subyacentes.

4.4 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

La clasificación de la enfermedad periodontal ha evolucionado conforme se obtiene mayor información relacionada con la etiología, patogénesis y factores del huésped. [25]
Existen cuatro formas de periodontitis: del adulto, rápidamente progresiva, juvenil y prepubertal. La periodontitis juvenil puede ser generalizada y localizada. La rápidamente progresiva se ha subclasificado en tipo A y B. [25]
(Cuadro 3)

Periodontitis del adulto: comienza en la adolescencia y continua a lo largo de la vida de los individuos, es clínicamente significativa a mediados de la década de los 30 la prevalencia y severidad se incrementa con la edad, el progreso de la enfermedad es lento y no presenta predilección por género. La presencia y severidad de la periodontitis del adulto está directamente relacionada con la presencia de cálculos y placa. Entre los microorganismos presentes se encuentran *Actinomyces israelii, A. naeslundii y A. Viscosus.*

Periodontitis de progreso rápido: Se presenta en la población de adultos jóvenes es caracterizada por una severa inflamación de la encía y rápida pérdida de hueso alveolar. Un amplio porcentaje de las personas afectadas presenta respuesta quimiotáctica deprimida y respuesta linfocítica autóloga, es posible que en esta enfermedad exista un contexto genético. El tipo A se presenta en jóvenes de 25 a 36 años de edad y está asociada con acumulación de placa y cálculos. Las bacterias asociadas con esta enfermedad se encuentran *Bacteroides gingivalis, B. intermedius, B.capillus, Eubacterium brachy, E. nodatum, E. timidum, Fusobacterium nucleatum, L. minitis, Wolinella recta.* Se ha demostrado que esta enfermedad está caracterizada por una zona de organismos gram-positivos que se asocian a la superficie del diente. Esta enfermedad se asocia también con Diabetes Mellitus, síndrome de Down y síndrome Papillon-Lefevre.

Periodontitis juvenil: se presenta en la pubertad y está asociada con defectos angulares en hueso y los primeros molares permanentes e incisivos. La taza de severidad de la destrucción no es consistente con la cantidad de placa y la falta de signos clínicos de la inflamación. Las mujeres son las más afectadas por esta enfermedad. La taza de pérdida de adherencia es de 4 a 5 μm por día. Los microorganismos asociados con esta enfermedad son *Actinobacillus actinomicetemcomitans, Capnocytophaga ochracea, Bacteroides intermedius y Eikella corrodens.*

Periodontitis juvenil generalizada: se caracteriza por una severa y rápida destrucción periodontal alrededor de la mayoría de los dientes. Esta asociada a desórdenes en la quimiotaxis de neutrófilos. La flora microbiana persistente consiste en *Bacteroides gingivalis y Eikenella corrodens.*

Periodontitis prepuberal: es una condición poco frecuente que puede ser generalizada o localizada. Peridontitis prepuberal generalizada afecta piezas deciduas y temporales comienza con la erupción de los dientes deciduos y está caracterizada por una severa inflamación gingival, rápida pérdida de hueso alveolar, movilidad y pérdida de dientes. Periodontitis prepuberal localizada afecta a los dientes deciduos es menos agresiva entre los microorganismos presentes en esta enfermedad se encuentran *B. intermedius y Capnocitophaga sputigena.*

Periodontitis refractaria: es una enfermedad que se presenta en múltiples sitios. Se encuentran elevados niveles de *B. forsythus, F. nucleatum, S. intermedius, E. corrodens y B. Gingivalis.* (cuadro 3)

Cuadro 3.Clasificación de la enfermedad periodontal.

CLASIFICACION DE ENFERMEDAD PERIODONTAL	*MICRORGANISMOS PRESENTES*
‣ Periodontitis del Adulto	Actinomyces israeli, A. naeslundi y A.Viscosus.
‣ Periodontitis rápidamente progresiva.	B.gingivalis, B.intermedius, B.capillus, Wollinella recta etc.
‣ Periodontitis Juvenil: a)Localizada	Actinobacillus actinomicetancomitans, Capnocythaga ochracea.
b)Generalizada	Bacteroides gingivalis y Eikenella corrodens.
‣ Periodontitis prepuberal	Bacteroides intermedius y Capnocitophaga sputigena.
‣ Periodontitis refractaria	B.forsythus, F.nucleatum, S.intermedius, E. Corrodens y B.gingivales

4.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO:

4.6.1 SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Los síntomas clínicos más aceptados para el diagnóstico de la enfermedad periodontal son el sangrado y las bolsas periodontales así como la profundidad del surco mayor a 2 mm. El sangrado gingival se ha relacionado con incrementos en el flujo del fluido crevicular que a su vez se asocia con la presencia de inflamación gingival. El sangrado interdental después de utilizar el hilo se relaciona con la presencia de lesiones inflamatorias interdentales localizadas primariamente en el punto de contacto entre las piezas contiguas.

Profundidad de bolsas:

Se determina como la distancia entre la unión cemento-esmalte y la penetración apical de la sonda periodontal. Esta medición es importante para determinar dos importantes consecuencias de las periodontitis y permite registrar la actividad de la enfermedad. Las bolsas periodontales son el resultado de las lesiones establecidas y avanzadas causadas por destrucción del epitelio de unión y la pérdida de asociación de fibras de colágena a la superficie de los dientes.

Técnicas radiográficas.

Se utilizan para estimar la severidad y el patrón de pérdida de hueso, posición, forma y longitud de raíces y para detectar lesiones destructivas y quiza efectos en la oclusión. Para un mejor diagnóstico y tratamiento de la enfermedad periodontal en los últimos 50 años se han desarrollado numerosos índices; los

cuales se siguen utilizando en la actualidad y son:

Indices gingivales. Miden el grado de inflamación gingival, actualmente el más utilizado es el (GI) por siglas en inglés Gingival Index y fue desarrollado por Löe y Silness. Que evalúa la severidad de la lesión gingival en una escala graduada de 0 a 3; que va de encía normal a inflamación severa.

Otros índices muy usados son el sangrado al sondaje que precede a los signos visuales de inflamación y describieron el llamado índice de sangrado gingival (SBI). Otros índices registran si hay sangrado en la papila interdental al tocarla con un hilo encerado (Carter y Barnes) o con un palillo triangular de madera (Stim-Udents)® (Caton y Polson).

Indices periodontales. La evaluación de la destrucción parodontal puede realizarse: a)midiendo clínicamente el soporte periodontal perdido o b)midiendo radiográficamente la pérdida ósea.

Para la evaluación clínica de la pérdida de inserción (PDI) puede utilizarse la técnica descrita por Ramfjord [27]en la que registra el nivel de inserción desde el límite amelodentinario hasta el fondo del surco / bolsa con una sonda marcada con intervalos preestablecidos (por eje., 3,6 y 8 mm, o 3,6,9 y 12 mm.

Carlos y col. [27] desarrollaron el ESI que modela la extensión (E) y severidad (S) de la pérdida de inserción.

Indices de PDB. Puede dividirse en tres grupos: a)los que evalúan la superficie dentaria cubierta por placa, b)los que evalúan el espesor de la placa en el sector gingival, c)los que evalúan presencia o ausencia de placa.

Los índices utilizados para la medición de la placa sobre la superficie dentaría son: Greene y Vermillion, el de Quigley y Hein, el índice de la placa acompaña al PDI de Ramfjord y al índice O´Leary han sido los más usados.

Actualmente el más utilizado es el índice de placa (PI) de Silness y Löe en él cual se evalúa el espesor de la placa en el área gingival. O'Leary y col. Crearon el índice de presencia o ausencia de placa.

Indices de sarro. El índice de sarro de Volpe y Manhold mide con una sonda milimetrada, la extensión de los depósitos calcificados sobre las superficies linguales de los dientes. El índice de superficie con sarro de Ennever y col. registra presencia o ausencia de sarro supragingival o subgingival.

4.7 MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

Los métodos bioquímicos en el diagnóstico de la enfermedad periodontal se han centrado en estudiar el fluido crevicular y sus componentes. [28]

Entre los marcadores biológicos que se han caracterizado hasta el momento se encuentran la actividad de colagenasa y presencia de prostaglandina E2.

4.8 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.

Entre los microorganismos asociados a la enfermedad periodontal se encuentran los *Actinomyces actinomycetemcomitans, B. gingivalis, B. intermedius y especies de Capnocytophaga.* Los métodos empleados para la identificación de los microorganismos se encuentran los ensayos por Northern Blot; de actividades bioquímicas, técnica de la reacción de la polimerasa en cadena y métodos microscópicos.

4.9 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

1. Dieta, buena alimentación.
2. Eliminación y control de la placa dentobacteriana y /o de los factores etiológicos.

3. Tratamiento con el control de colutorios y antisépticos.

4. Eliminación de las bolsas periodontales, cirugía periodontal, así mismo la terapia con antibióticos.

5. Rehabilitación por medios protésicos y medidas de higiene

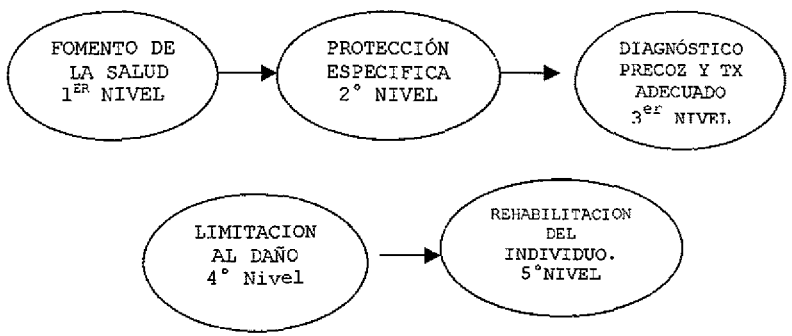

FIG 2. PERIODOS DE PREVENCION Y NIVELES DE APLICACIÓN (LEAVELL Y CLARK).

4.10 ENDOTOXINAS BACTERIANAS.

El nombre químico "*lipopolisacárido*", se utiliza como sinónimo de endotoxina bacteriana. Las endotoxinas son compuestos biológicamente activos presentes en la membrana externa de bacterias gramnegativas. Inicialmente se les llamaron *endotoxinas* debido a que se pensaba que las sustancias tóxicas estaban dentro de la célula bacteriana y que solo podían ser liberadas por digestión o ruptura de la célula. Por más de 100 años, la

endotoxina ha sido descrita como la toxina letal de bacterias gram-negativas. Sin embargo, hace unos 55 años, fue aislado el lipopolisacárido, y se encontró que era específicamente el lípido A de su estructura el responsable de la actividad endotóxica.

La composición química básica de los lipopolisacáridos (LPS) se conoce desde hace unos 30 años. Localizado en la superficie externa de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, el LPS es una molécula anfifílica con 3 regiones: una región interna hidrofóbica, llamada lípido A; un polisacárido central que contiene heptosa y un polisacárido O-específico que actúa como antígeno serológicamente activo. La estructura de LPS mínima requerida para el crecimiento de *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas (llamada Re LPS), consiste en el lípido A y dos unidades de la octosa 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO). La estructura interna del LPS está formada por KDO y heptosa. Las cepas bacterianas que poseen los Re LPS mínimos son hipersensibles a detergentes y antibióticos hidrofóbicos, lo cual sugiere un avance evolutivo hacia las formas completas de LPS. La especificidad serológica de los LPS radica en el polisacárido O específico, mientras que el centro bioactivo o

endotoxina como tal,corresponde la lípido A, que en su extemo tiene ácidos grasos y en el otros grupos fosfato, por lo cual es anfifílico; cuando los LPS están aislados, forman micelas biológicamente activas. [29-30] (Fig.3)

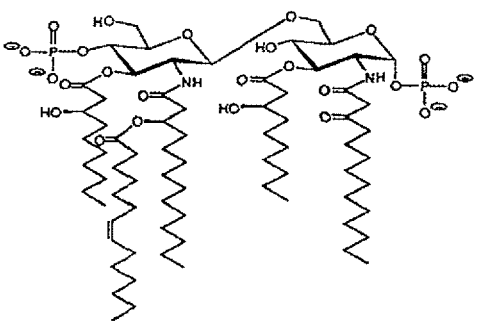

Fig.3 Estructura de los lipopolisacáridos. Lipido A, ácidos grasos y grupos fosfato.

El papel de las endotoxinas en la patogénesis de la enfermedad periodontal se deriva de estudios realizados por el grupo de Mandel [27] en donde correlaciona las concentraciones entre el fluido gingival y las concentraciones de endotoxinas con el grado de inflamación. Diversos experimentos señalan que las endotoxinas bacterinas son capaces de incrementar la resorción ósea *in vitro* [31]

En los trabajos realizados por Iino y Hopps [32] se demostró que las endotoxinas derivadas de *B. gingivalis* son 10 veces más potentes que las de

A. actinomycetemicomitans o de Capnocytophaga ochracea, además el mecanismo involucrado en las resorción ósea difiere entre las diferentes endotoxinas, esto se pone manifiesto porque indometacina inhibe las actividad de resorción de A. actinomycetemicomitans pero no la de otras especies como *B. gingivalis y Capnocytophaga.*

Las endotoxinas tienen la capacidad de asociarse a la superficie de células fagocíticas como los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos y activar receptores CD-14, CD-11/CD18, receptores RON y receptores SCAVENGER. La activación de estos receptores está acoplada al sistema de traducción de tirosín cinasa. Las consecuencias de esta activación promueve la expresión génica como el factor de necrosis tumoral, interleucina-1 e interleucina-8.

Como se mencionó en lineas anteriores los fibroblastos gingivales humanos participan en los procesos de remodelación del parodonto. Se ha determinado que estas células son susceptibles a la acción de lipopolisacáridos, endoxinas extraídas de *Prevotella intermadia* estimulan a los fibroblastos gingivales humanos en la síntesis de citocinas.[33]

Otros autores señalan que tratamiento con lipopolisacáridos sobre HGF estimulan la producción de prostaglandina E2. [34]El grupo de Hayashi de la

Universidad de Bunkyo-Ku en Japón demostró que los mecanismos de acción de los lipopolisacáridos sobre los fibroblastos gingivales humanos es através de la proteína de superficie CD-14 y que esta proteína es la receptora en la transducción de señales de los lipopolisacáridos extraídos de Porphyromonas gingivales. [36]Se ha demostrado así mismo que los lipopolisacáridos inducen la expresión de interleucina-6, [37] síntesis de hialuronato, [38]la inhibición de la síntesis de proteoglucanos. [39]

4.10 RADICALES LIBRES Y ENZIMAS DETOXIFICANTES.

4.10.1 Especies reactivas de oxígeno en los sistemas biológicos

El dioxígeno O_2 es esencial para el mantenimiento de la vida en los organismos aerobios microaerofílicos, sin embargo para las células el oxígeno en altas concentraciones puede ser altamente tóxico debido a su capacidad de xenobiótico; es decir, produce especies reactivas como el peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete y radicales superóxido e hidroxilo.

La molécula de oxígeno puede ser considerada como un biradical debido a los dos electrones que se encuentran desapareados en sus últimos orbitales.[40] (Fig.4)

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

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

El radical superóxido (O_2) no es muy reactivo;sin embargo ,es potencialmente dañino debido a la capacidad que tiene indirectamente de originar especies como el radical hidroxilo (HO). El O_2 al ser dismutado produce H_2O_2 y este ultimo puede generar HO.

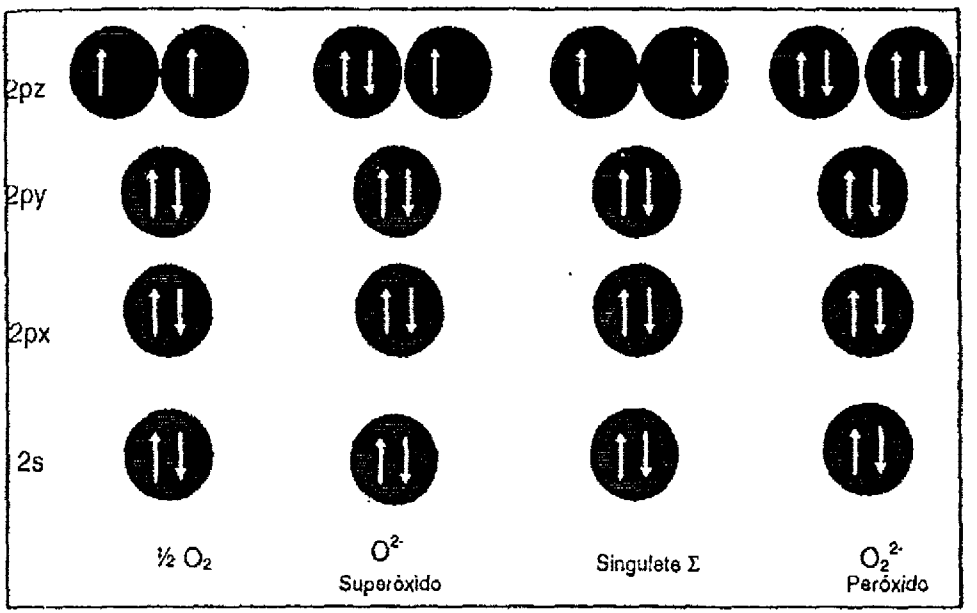

Fig.3. Esquema de configuración electrónica de las especies reactivas generadas apartir de la molécula de dioxígeno. Tomada de (Haliwell., B y Gutteridge, M.C., Free radical in biology and medicine. Ed. Claredon Press. 2. pp. (8-17) .

El H_2O_2 no es un radical libre, sin embargo, es una especie reactiva con capacidad oxidante débil. Difunde y cruza membranas fácilmente y tiene la capacidad de reaccionar con metales como Fe^{2+} y Cu+ para formar radicales hidroxilo de acuerdo con la siguiente reacción descrita por Fenton en 1894:

$$H_2O_2+Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+} + HO^{\cdot} OH^{-}$$

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

$$H_2O_2 \rightarrow {}^{\cdot}OH + {}^{\cdot}OH$$

4.10.2 Produccion de especies reactivas de oxígeno (EROS)

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

Además de la cadena respiratoria existen otros mecanismos metabólicos generadores de radicales libres; en ellos actúan enzimas que degradan radicales superóxido y producen H_2O_2 y O2.

La fuente principal de producción de H_2O_2 es la dismutación del radical superóxido, reacción intracelular catalizada por la superóxido dismutasa (SOD).

La descomposición del H_2O_2 ocurre en los peroxisomas, organelos celulares especializados que contienen enzimas del tipo de las peroxidasas, como catalasa. El H_2O_2 también se forma por acción de enzimas como glicolato oxidasa , D-L amino oxidasa y urato oxidasa , durante la β-oxidación de ácidos grasos de cadenas largas en la síntesis de colesterol de las purinas en el catabolismo de los aminoácidos, fotosíntesis y por acción metabólica de las células del sistema inmune.

Las células fagocíticas cuando son estimuladas en la superficie membranal, incrementan su consumo de oxígeno en el fenómeno llamado estallido o "burst" respiratorio; que resulta en la producción de radicales superóxido vía NADPH oxidasa y apartir de los cuales pueden formarse otras especies reactivas de oxígeno como H_2O_2. [41] (fig.5)

4.10.3 Mecanismos de transformación de radicales libres en los sistemas biológicos.

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

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

2.Defensas antioxidantes no enzimáticas como la vitamina E (α y β tocoferoles), vitamina C (ácido ascórbico),los carotenos,el glutatión, la bilirrubina y el ácido úrico entre otros.

3.Defensas antioxidantes enzimáticas. La protección enzimática celular puede dividirse en tres categorías; la primera línea de defensa la componen

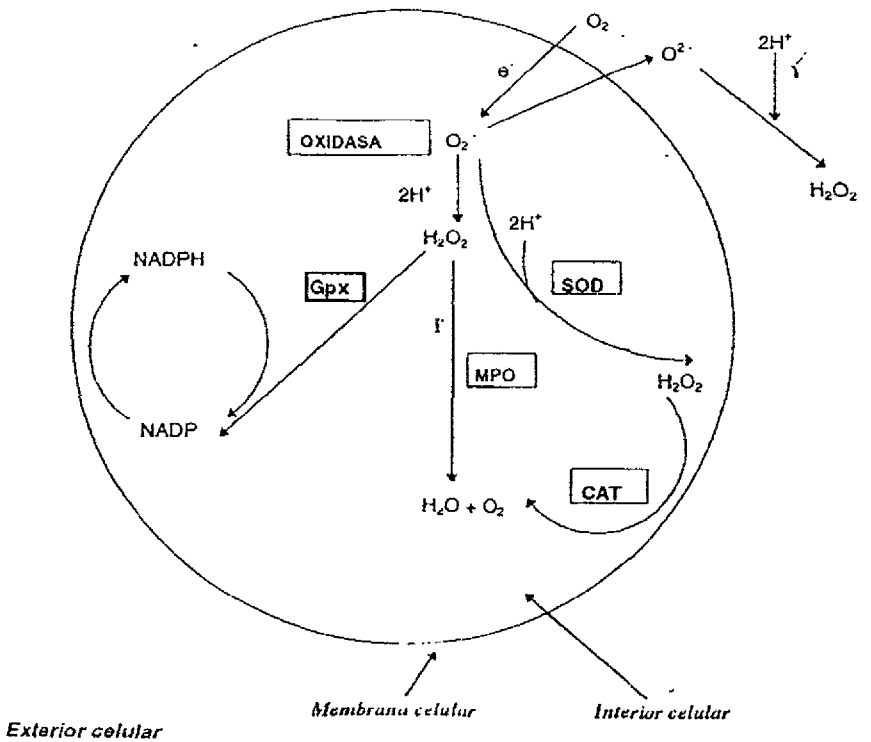

FIG 5. Esquema de vías de producción de superóxido y peróxido de hidrógeno en los leucocitos durante el estallido respiratorio en glutanión peroxidasa Gpx, super óxido dismutasa SOD y catalasa CA. (Smith, J. D y McManus, D.P., 1989, Developmental biology of larval en: The phisiology and biochemistry of cestodes. Ed. Cambridge University Press. Great Britain. Pp. 187-195).

las enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD), que actúan destruyendo a los radicales libres antes de que actúen sobre moléculas blanco Las enzimas dependientes de glutatión (peroxidasas y transferasas) componen la segunda línea de defensa, así como el citocromo P_450. La última categoría actúa directamente contra los grupos carbonilos.[42]

4.10.4 Estrés oxidativo

Los estados fisiológicos estables se mantienen al evitar que aumente la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno. Para ello la célula debe mantener un equilibrio entre el poder reductor y la concentración intracelular de dioxígeno. El estado hiperoxidante se genera cuando se rompe este equilibrio debido a factores como:

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

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

Los organismos presentan sistemas adaptativos que contrarrestan los cambios drásticos producidos en el ambiente; por ejemplo cuando se da un estrés oxidativo, se induce la expresión de algunos genes que codifican para enzimas antioxidantes como (catalasa) así como los mecanismos de reparación de DNA.[43]

4.10.5 Características bioquímicas de la catalasa

La catalasa es una molécula tetramérica compuesta de subunidades con un peso molecular aproximado de 60 Kda, cada subunidad contiene un hemo corto grupo prostético.

El origen de esta enzima se remonta a 2 mil millones de años, cuando la atmósfera cambió de reductora a oxidante. Fue apartir de entonces que los sistemas biológicos desarrollaron mecanismos para neutralizar los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno experimentando mayor adaptabilidad y proliferación en el medio. [44]

La catalasa es una hemoenzima y muestra cambios transitorios en sus espectros cuando se mezcla con su sustrato el peróxido de hidrógeno.

El mecanismo de reacción de la catalasa ocurre en dos etapas. La primera conlleva a la formación de un complejo primario entre el H_2O_2 y el hierro que se encuentra en el grupo prostético:

$$E\text{-}Fe^{2+}\text{-}OH + H_2O_2 \leftrightarrow E\text{-}Fe^{3+}\ OOH + H_2O$$

Este complejo reacciona con una segunda molécula de H_2O_2 y el hierro que se encuentra en el grupo prostético:

$$E\text{-}Fe^{3+}OOH + H_2O_2 \leftrightarrow E\text{-}Fe^{2+}\ OH + H_2O + O_2$$

La enzima catalasa es una de las primeras enzimas antioxidantes que descompone H_2O_2 a formar H_2O y O_2 en conjunto con otros antioxidantes, la enzima catalasa juega un papel importante en la prevención de la toxicidad celular inducida por especies de reactivas derivadas de oxígeno. En el paso de dos décadas la relación de catalasa con cáncer a sido sujeto de numerosos estudios debido a que la presencia H_2O_2 y ausencia de la actividad de la enzima catalasa para degradarla puede llegar a manifestar en las células de hígado de ratón efectos mutagénicos y carcinogénicos. [45]

Las catalasas son abundantes particularmente en células de hígado y riñón donde deben destruirse numerosos peróxidos durante el proceso de defensa contra sustancias extrañas que han penetrado al organismo.

4.10.6 Lipopolisacárido relacionado con catalasa:

La interacción de LPS con celulas eucariónticas resulta con cambios de transducción de señales y expresión génica. Las células en respuesta a LPS producen un rápido incremento (de minutos a dos o tres horas) en la formación de radicales de superóxido y H_2O_2 que estan asociados con la activación de NFκB. El O_2 y H_2O_2 sirven como agentes que señalan la causa de daño y muerte celular. [46]

El estrés oxidativo en células endoteliales, parenquimatosas o Kupffeer participan en el desarrollo de disfunciones hepáticas durante la endotoxemia o sepsis. Las consecuencias patofisiológicas del estrés oxidativo intra o extracelular depende del balance de vías pro y antioxidativas.[47] Dentro de los eventos pro-oxidativos se encuentran la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno.

Estos radicales pueden atacar a la célula que los sintetizó o a células vecinas a ella. La producción de especies reactivas de oxígeno por mitocondrias o por el sistema de xantina-oxidasa contribuye a los efectos de los lipopolisacáridos sobre la inducción del estrés oxidativo.

Por otra parte el efecto antioxidativo funciona como un mecanismo de defensa para la eliminación de las especies reactivas de oxígeno, entre las enzimas que participan en estos eventos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

Un estímulo inflamatorio puede modular las vías pro y antioxidativas para la eliminación de especies reactivas de oxígeno, el balance entre estos dos eventos es importante en la conservación de la homeostasis celular.[48]

Pinteaux y col sugieren que la adición de LPS al medio de cultivo celular induce síntesis de la enzima superóxido Mn dependiente estando fuera el efecto en la enzima Cu/Zn -SOD. Se demostró de igual forma que el peróxido de hidrógeno puede funcionar como el inductor específico en el fenómeno observado y puede entonces ser considerado como un mensajero intracelular envuelto en la regulación de muchos aspectos de metabolismo oxidativo particularmente en defensa a la acción de toxinas (EROS). [49]

La interpretación de los efectos nocivos de los radicales libres puede ser analizada no únicamente en función del efecto nocivo de los radicales sino puede estar relacionado con la eficiencia y actividad enzimática de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa y sistemas químicos antioxidantes. La baja protección celular puede inducir drásticamente los niveles de actividad de las enzimas protectoras de eventos oxidativos como catalasa, glutation peroxidasa y Cu/Zn superóxido dismutasa.[50]

Por otra parte el efecto antioxidativo funciona como un mecanismo de defensa para la eliminación de las especies de oxígeno reactivas entre las enzimas que participan en estos eventos se encuentran las superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. (Fig. 6)

En el estudio realizado por Zoltán y col. [53] demostraron que en las células Kupffer los elevados niveles de glutanión juegan un papel importante en la protección de las especies reactivas de oxígeno, considerando que la acción de la enzima catalasa para la destoxificación es atenuada. Estos estudios sugieren que ni catalasa ni la cicloxigenasa promueven la eliminación de especies reactivas de oxígeno y que puede ser otro factor el que esté envuelto en la supresión de fibroblastos por actividad de macrófagos en adición a H_2O_2.

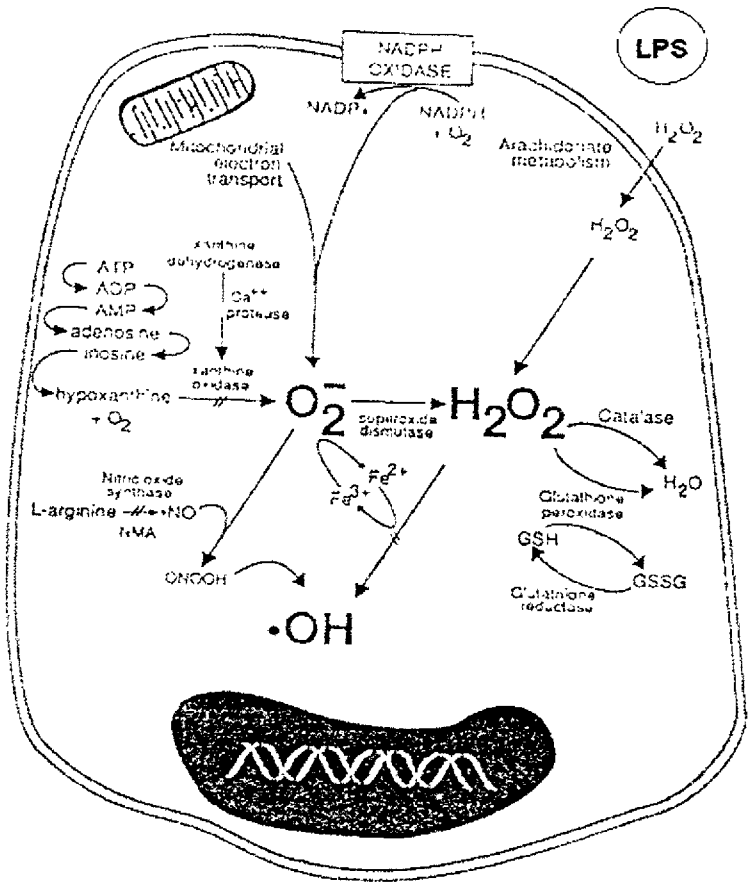

FIG.5. Esquema de las lineas intracelulares de reactivos oxígeno intermedios en superoxído dismutasa SOD, catalasa, Tomada de (Laura E.D Angela .M. Preston, Eiji T,Jonh. K. Laurence, B and Daniel G.. The Journal of biological chemestry vol.268 n°34, Dec.5, pp, 25568-25576).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El propósito de este estudio consistió en investigar la respuesta de los fibroblastos gingivales humanos al estrés oxidativo inducido por endotoxinas, para evaluar el daño se midió la actividad de la catalasa, esta enzima participa en el sistema de enzimas involucradas en la defensa antioxidante de las células.

Durante el shock endotóxico la generación de radicales derivados del oxígeno induce la lipoperoxidación de membranas celulares así como daño a proteínas y ácidos nucleicos resultando en un daño en los tejidos. Las células se protegen del daño ocasionado por radicales libres mediante sistemas de defensa antioxidantes. Las células eucariontes contienen dos superóxido dismutasas que catalizan las dismutación del anión superóxido. Se han caracterizado dos de estas enzimas unas dependientes de manganeso (Mn) que comprenden del 10 al 15% de la actividad celular total de superóxido y se encuentran localizadas en la matriz mitocondiral, estas enzimas son inducidas por el factor de necrosis tumoral, interleucina y lipopolisacáridos [55]

La otra isoenzima es la cobre-zinc (Cu-Zn) que se encuentra en el citoplasma de las células y en los peroxisomas, se expresa de forma constitutiva y es menos inducible. La enzima catalasa es una enzima que está presente en los peroxisomas y participa de forma preponderante en la degradación de peróxido producido por las enzimas superóxido dismutasa .

Se ha demostrado que la administración *in vivo* de endotoxinas produce un incremento en el estrés oxidativo en hígado y plasma en particular se ha determinado que los niveles de glutatión se incrementan durante las primeras cinco horas y disminuyen por debajo del control después de cuarenta y ocho horas de tratamiento [56]

Estas enzimas se expresan también durante procesos inflamatorios [57] dentro de estos procesos inflamatorios se encuentra la enfermedad periodontal, que en su etiología participan microorganismos gram negativos que contienen endotoxinas es por esta razón que el propósito de la investigación consistió en determinar si las endotoxinas afectan a los fibroblastos gingivales humanos mediante estrés oxidativo.

6. JUSTIFICACION

Dentro de los padecimientos más frecuentes durante la práctica diaria dental se encuentran los procesos inflamatorios gingivales y la pérdida del aparato de inserción por lo que es importante realizar investigaciones básicas que permitan conocer el comportamiento de las bacterias y las respuestas del huésped, lo que permitirá identificar a las moléculas involucradas en la enfermedad periodontal y combatirlas con la finalidad de que en un futuro tengamos una sociedad con dientes sanos y naturales durante el transcurso de la vida.

7. HIPOTESIS

Los lipopolisacáridos son los componentes de las paredes celulares de las bacterias gram negativas se ha determinado que la interacción de los lipopolisacáridos con las células eucariontas provoca cambios en las transducción de señales y expresión de genes. Se determinará si las células producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de defensa entre organismos invasores, en particular se determinará la expresión de la enzima catalasa en cultivo de fibroblastos gingivales humanos.

8. OBJETIVOS.

8.1 OBJETIVO GENERAL:

Se examinará la expresión de la enzima oxidativa catalasa en fibroblastos gingivales humanos después del tratamiento con lipopolisacáridos.

8.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Se estudiarán los efectos de los lipopolisacáridos sobre la actividad de la enzima catalasa.
- Se determinará si la activación de la enzima catalasa se produce por síntesis de nuevo.
- Se determinará el tiempo y la concentración a la cual los lipopolisacáridos promueven la activación de la enzima catalasa.

7. HIPOTESIS

Los lipopolisacáridos son los componentes de las paredes celulares de las bacterias gram negativas se ha determinado que la interacción de los lipopolisacáridos con las células eucariontas provoca cambios en las transducción de señales y expresión de genes. Se determinará si las células producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de defensa entre organismos invasores, en particular se determinará la expresión de la enzima catalasa en cultivo de fibroblastos gingivales humanos.

8. OBJETIVOS.

8.1 OBJETIVO GENERAL:

Se examinará la expresión de la enzima oxidativa catalasa en fibroblastos gingivales humanos después del tratamiento con lipopolisacáridos.

8.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Se estudiarán los efectos de los lipopolisacáridos sobre la actividad de la enzima catalasa.
- Se determinará si la activación de la enzima catalasa se produce por síntesis de nuevo.
- Se determinará el tiempo y la concentración a la cual los lipopolisacáridos promueven la activación de la enzima catalasa.

9. MATERIALES Y MÉTODOS.

⇒ Cultivo celular de fibroblastos gingivales

Los fibroblastos gingivales se obtendrán de pacientes sanos y que requieran la extracción de terceros molares. Se realizarán explantes de la muestra y se aislarán y crecerán las células en un medio de cultivo Dulbecco Modificado por Eagle suplementado con suero bovino fetal y antibióticos en atmósfera húmeda y en presencia de una mezcla de 95% aire y 5% CO_2 a 37°C. Los fibroblastos serán indentificados por su morfología. Los ensayos se realizarán entre los pasajes 3 a 10. En algunos ensayos el suero bovino fetal será sustituido por albúmina sérica bovina o el sistema libre de suero de GIBCO en combinación con los lipopolisacáridos. [58]

⇒Ensayo de actividad de catalasa.

Para la determinación de la actividad se crecerán los fibroblastos gingivales humanos hasta la subconfluencia en medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle suplementado con 1% antibiótico - antimicótico (GIBCO) y 10% de suero bovino fetal (GIBCO), se retirará el medio y cambiará por el mismo medio que contendrá 0.2% de suero bovino fetal se tratarán durante 24 horas, a las células de FGH con diferentes dosis de lipopolisacáridos

y dosis submáxima de lipopolisacáridos a diferentes tiempos. Al término se recuperarán las células en un buffer de lisis que contiene Tris 50 mM y tritón 20%, se cuantificará la proteína por Lowry [56] y se determinará la actividad en un gel nativo.

⇒Determinación de proteína por Lowry.

El contenido de proteína de las muestras se determinó con folin-fenol ciocalteuss en un medio alcalino en presencia de cobre de acuerdo con el método propuesto por Lowry [59], usando albúmina sérica bovina como estándar. El reactivo se preparó de mezclar 50 volumenes del reactivo A (2% carbonato de sodio, 1% tartrato de sodio-potasio y 0. 1% hidróxido de sodio) y una parte de solución B (1% sulfato de cobre pentahidratado).

Se preparó la curva patrón las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente al término se adiciona 0.1ml del Reactivo Folin-Fenol-Ciocalteuss mezclado 1:1 en agua. Las muestras se leen a 660 nM.

⇒Electroforesis nativa:

Para realizar la electroforesis nativa a una concetración de 10% de acuerdo a la técnica de Laemli [60]

SOLUCIÓN	GEL SEPARADOR 10%	GEL CONCENTRADOR
30% Acrilamida-0.1% Bis acrilamida	2,7 ml	1.072 ml
Tris 1 M pH 8.8	2.5 ml	---
Tris 0.5 M pH 6.8	---	2 ml
Agua	4.6 ml	4.75 ml
Persulfato de amonio 10%	0.1 ml	0.07 ml
TEMED	0.006 ml	0.01 ml

Se vierte la solución entre dos placas de vidrio y se deja polimerizar. Se aplican las muestras y se corre a 60 mA por 2 hrs. El gel se reveló por actividad.

Para los ensayos por Western- blot, las muestras se trsnsfieren a una membrana de nitrocelulosa.

⇒ Ensayo Western-blot.

Para la transferencia de las muestras a una matriz de nitrocelulosa se coloca el gel en una cámara de transferencia durante 12 horas a 30 mAmp. El amortiguador de corrida fue: 20 mM de Tris, 150 mM de glicina y metanol al

20% con un pH de 8.3; el alcohol se agregó con el objeto de incrementar la unión de las proteínas a la matriz. La nitrocelulosa se coloca en un recipiente durante una hora a 37° C cubierta con una solución de albúmina sérica bovina al 3% y Tween 20 al 0.05%; este último funciona como bloqueador. Posteriormente se lava repetidas ocasiones con PBS; la enzima se detecta por incubación con anticuerpos anticatalasa obtenidos de conejo, durante 1 hora a 37°C. Finalmente la matriz de nitrocelulosa se lava 3 veces con PBS y se le agrega una solución de sustrato cromogénico, agitando continuamente para observar las bandas reveladas. La reacción se detiene agregando agua destilada. [61]

⇒ Revelado por actividad:

El método de tinción se realizó en electroforesis nativa de 10% acrilamida. Se tiñó con una mezcla de la solución de ferrocianuro de potasio 1% y cloruro férrico 1% (1:1) de acuerdo a la metodología de Sun [62]

⇒Ensayo de catalasa:

La actividad de la enzima catalasa se determinó de acuerdo al método descrito por Beer[63] La actividad enzimática se describe en términos de la desaparición de agua oxigenada a 240 nm. Una unidad de actividad de enzima catalasa descompone 1 μmol de agua oxigenada min a 25°C y pH 7.

10. RESULTADOS.

En este trabajo se estudió el efecto de los lipopolisacáridos sobre la actividad y síntesis de la enzima catalasa en fibroblastos gingivales humanos. Encontramos que el tratamiento con diferentes dosis de lipopolisacáridos induce la expresión de la actividad de esta enzima; como se muestra en el gel nativo (Fig.1), detectamos una máxima actividad a la dosis de 100 μg/ml. A esta dosis se presenta un incremento de 4 veces sobre la actividad basal.

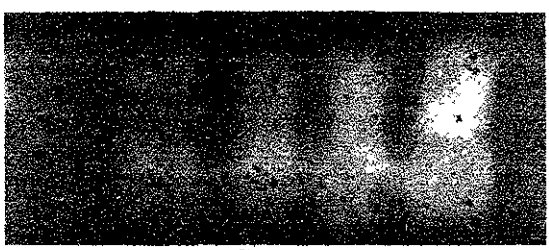

Fig. 1 Dosis Respuesta al tratamiento con lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos.
Los fibroblastos gingivales humanos se trataron durante 24 hrs. con diferentes dosis de lipopolisacáridos. A) control; B)1μg/ml; C) 10 μg/ml; D) 50 μg/ml; E) 100 μg/ml. Al término de la reacción se recuperaron las células se contaron y se tomaron 10 x 10^5 células que se lisaron en solución nativa de Laemli , las muestras se procesaron mediante la técnica de electroforesis nativa a 3 mA por carril al término de la corrida el gel se reveló por actividad.

En otra serie de experimentos encontramos que el tratamiento con 50 μg/ml a diferentes tiempos induce la activación de esta enzima, el efecto máximo de inducción se encontró a las 24 horas de tratamiento. (Fig., 2). Y desaparece su actividad al tratar durante 48 hrs.

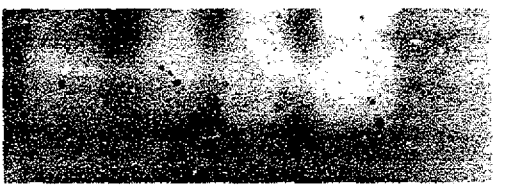

Fig. 2 Curso Temporal del tratamiento con lipopolisacáridos sobre la actividad de la catalasa en fibroblastos gingivales humanos.
Los fibroblastos gingivales humanos se trataron con lipopolisacárido a una dosis de 50 μg/ml durante diferentes tiempos. A) control; B)6 hrs; C) 12 hrs; D) 24 hrs; E)48 hrs. Al término de cada reacción se recuperaron las células se contaron y se tomaron 10 x 10^5 células que se lisaron en solución nativa de Laemli , las muestras se procesaron mediante la técnica de electroforesis nativa a 3 mA por carril al término de la corrida el gel se reveló por actividad.

A fin de determinar si el incremento o disminución en la actividad de la enzima se debía a un incremento en la síntesis de la misma se realizaron estudios western-blot, en el ensayo dosis respuesta encontramos que el tratamiento con 100 μg/ml de lipopolisacárido promueve una disminución en el contenido celular de esta enzima (Fig.3).

Fig. 3 Dosis respuesta de la inducción de la actividad de catalasa por lipopolisacáridos.
Muestras de fibroblastos gingivales humanos se incubaron durante 24 con diferentes dosis de lipopolisacárido A) 100 μg/ml; B) 50 μg/ml; C) 10 μg/ml; D) 1 μg/ml E) Control .Al término de la incubación se hicieron extractos celulares para ser analizados por western-blot.

Resultados similares se obtuvieron cuando se trataron las células a diferentes tiempos con lipopolisacáridos, en el ensayo western blot encontramos que el tratamiento con lipopolisacáridos no produce cambios en la inducción de la enzima.

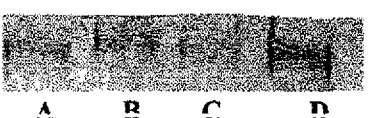

Fig.4 Curso temporal de la inducción de la expresión de catalasa por lipopolisacáridos.
Muestras de fibroblastos gingivales humanos se incubaron con lipopolisacáridos (50 μg/ml) a diferentes tiempos A) 24 hrs; B) 12 hrs; C) 6 hrs.; D) Control. Al término de la incubación se hicieron extractos celulares para ser analizados por western blot.

En los ensayos de actividad encontramos que el tratamiento con lipopolisacárido (50 μg/ml) induce un incremento en la actividad a partir de las dos horas de tratamiento y a las 24 horas se detecta un incremento de cuatro veces sobre la actividad basal.

Tabla I Efecto de los lipopolisacáridos sobre la actividad de la catalasa en fibroblastos gingivales humanos tratados durante 24 horas. (μmol/mg proteína)

Control	**970 ± 150**
LPS 50μg/ml	**4000 ± 50**

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

11. DISCUSIÓN.

Con la finalidad de determinar el efecto antioxidante inducido por lipopolisacárido, un conjunto de enzimas antioxidantes debe responder con la regulación coordinada de la actividad de enzimas antioxidantes. Encontramos sin embargo que después del tratamiento con lipopolisacáridos se produce un efecto bifásico sobre la actividad de la catalasa a tiempos cortos y hasta las 24 horas se incrementa la actividad y después de 48 horas disminuye su actividad por debajo de la actividad basal. El tratamiento con lipopolisacáridos produce un incremento en la concentración de peróxido, pero la disminución en la actividad de la catalasa significaría que la célula falla al reto de disminuir los radicales, sin embargo es posible que el peróxido sirva como un agente bacteriostático. En cuanto a la concentración de la enzima encontramos que la enzima catalasa se conserva estable solo a dosis altas se produce la degradación de la enzima.

La función fisiológica de la catalasa no ha sido esclarecida del todo pero se conoce que la regulación de la expresión de esta enzima es sensible a potenciales redox. [64] es posible quizá que por el incremento en el estado oxidativo de las células por el tratamiento con lipopolisacáridos los sitios regulatorios se oxiden lo que impide la traducción de mensajeros. A fin de demostrar este efecto deberá caracterizarse si los lipopolisacáridos actúan a nivel traduccional o transcripcional.

La respuesta bifásica en el tratamiento con lipopolisacáridos representa una mala adaptación al estrés oxidativo inducido por lipopolisacáridos. Es posible que estos cambios se deban a cambios en las concentraciones de superóxido y peróxido en la célula como resultados de mecanismos bacteriostáticos y no por mala adaptación celular.

12. CONCLUSIONES

Con este trabajo se puede concluir que los lipopolisacáridos son capaces de inducir la expresión de la enzima catalasa en fibloblastos gingivales humanos a fin de combatir el estrés oxidativo.

Así mismo se demostró que se induce la expresión de la enzima catalasa hasta 4 veces sobre su actividad basal, pero este aumento en la actividad de la enzima no se refleja en la síntesis de la misma.

También concluimos que la máxima expresión de la enzima se ve reflejado a una dosis de 100 μg /ml de LPS a las 24 hrs y desaparece a las 48 hrs. Y lo mismo se ve reflejado en una dosis de 50 μg /ml.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1.- Genco, R.J. (1990).Periodoncia. Ed. Interamericana. 2.- Davidson, D and Mc Culloch CAG (1986) Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations. J. Periodont. Res. 21:414-418

3.-Bordin, S (1984) Fibroblast subtypes in the periodontum. J. Periodont Res. 19: 642.

4.- Mc. Colloch, CAG, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. L.Periodont Res. 26:144-154

5.- Embery, G, Picton D.C., Stanurry, J.B. (1987). Biochemical changes in periodontal ligament ground substance associated with short intrusive loading in adult monkeys. Arch. of Oral Biol. 32: 545-549.

6.- Person C.H., Gibson, G.J. (1982). Proteoglucans of bovine periodontal ligament and skin. Biochem. J. 201:27-37.

7.- Shuttleworth, C.A. and Smalley, J.W. (1983) Periodontal ligament. Int.Rev. Connec. Tiss Res. 10:211-247.

8.- Embery, G. (1990). An update on the biochemistry of the periodontal ligament.Eurl J. of Orthodont. 12: 77-80.

9.- Burn-Murdoch, R. (1990) The role of the vasculature in tooth eruption. Eur. J. of Orthodont. 12: 101-108

10.-Terranova, V.P., Martin, GR (1982) Molecular factor determining gingival tissue interaction with tooth structure, J. Periodon Res 17:530-533

11.-Knox, B., Aukhill, I.(1988) Ultrastructural study of experimental cementum regeneration in rats. J. Periodont. Res.23: 60-67.

12.- Shakti, P,(1986) Chondrogenic potential of mesenchymal cells elicited by bone matrix in vitro. Differentiation 32: 353-359

13.- Arzate, H., Olson, S.W., Page, R.C., Allen, M.G. and Narayanan, S. (1992) FASEB J. 6:2990-2995

14.- Yonemura, K.,Raines, E.W., Ahn, N.G. and Narayanan, S. (1993) Mitogenic signaling mechanisms of human cementum-derived growth factor. J. Biol Chem. 268: 26120-26126.

15.-Somerman MJ, Argraves, WS, Foster, RA, Dickerson,K., Norris, K. and Sauk, JJ. (1991) Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. J. Periodont Res 26: 10-16

16.- Yonemura, K., Narayanan, AS, Miki, Y., Page, RC, Okada, H. (1992) Isolation and practical characterization of a growth factor from cementum. Bone Mineral. Res.18: 187-198.

17.- Mac Niel RL, Thomas, HF. (1993) Development of the murine periodontum. II Role of epithelial root sheath in formation of the periodontal atachment J. Periodont 64: 285-291.
18.Mac Neil, RL, Thomas HF.(1993) Development of the murine periodontum. 64: 95-102
19.Bartold PM. 1987 Proteoglucans of the periodontum. Structure, role and function. J. Periodontol. Res. ; 22:431-444
20. Glossary of Periodntic Terms. 1986.J. Periodontol. 57 (Suppl.), 21. Page, R.C., and Schroeder, H.E.: Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab. Invest. 4: 235, 1976.
22.Seymour, G.J., Powell, R.N., Cole, K.L. (1983) Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. J. Periodontol. 54: 522.
23.Seymour, G.J., Powell, R.N., Cole, K.L. (1983). Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell supopulations. J. Periodontol. Res. 18: 375.
24.Saglie, F.R., Pertuiset, J., Resende, M.T., Nest, M., Marfany, A., and Cheng, J. (1988) In situ correlative immuno-identification of mononuclear infiltrates and invasive bacteria in disease gingiva. J. Periodontol. 59:688.
25.- Suzuki, J.B. (1988) Diagnosis and classificationof the periodontal diseases. Dent. Clin. North Amer. 32:295.
26.Loesche, W.J., Syed, S.A., Laughton, B.E., and Stoll, J. (1982) The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J. Periodontol. 38: 379.
27.Carranza F.,Sznajder,N.G.(1996) Compendio de periodoncia. Ed. Panamericana.
28.Fine, D.H. and Mandel, I.D. (1986) Indicators of periodontal disease activity: an evaluation. J. Clin. Periodontol. 13: 533.
29. Raetz, Ch. R. H. (1990) Biochemistry of endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 50: 120-170.
30.Higashida-Guerrero C. y Gutiérrez-Venegas G. (1999) Lipopolisacáridos: Extraordinarias moléculas activadoras de señales de transducción celular. BEB 99 vol 18:28.
31.Sterrett, J.D. (1986) The osteoclast and periodontitis. J. Clin. Periodontol. 13: 258-269.
32.Iino Y., Hopps R.M. (1984) The bone reabsorving activities in tissue culture of lipopolysaccharides from the bacteria Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Capnocytophaga ochracea isolated from human mouths. Arch. Oral Biol. 29: 59-63.

33.Kawahara, I.K., Sawamura, S., Arakaki, R., Sakuta, T.,Sugiyama, A., Tamura, H., Sueda, T., Hamada, S., Takada H. (1997) A novel component different from endotoxin extracted from Prevotella intermedia ATCC 25611 activates lymphoid cells from C3H/HeJ mice and gingival fibroblasts from humans. Infect. Immun. 65: 4531-4538.
34.Takiguchi, H., M. Yamaguchi, M. Okamura, aän Y. Abiko. (1997) Contribution of IL-1 beta to enhancement of Campulobacter rectus lipopolysaccaride-stimulated PGE2 production in old gingival fibroblasts in vitro. Mech. Ageing. Dev. 98: 75-99
35.Hayashi, J., T., Masaka, I., Ishikawa (1996) Soluble CD14 mediates lipopolysaccharide induced intercellular adhesion molecule 1 expression in cultured human gingival fibroblasts. Infect. Immun. 64: 4946-4951.
36.Watanabe, A. Takeshita A, Kitano, S. Hanazawa, S. (1996) CD-14 mediates signal pahtway of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. Infect. Immun. 64: 4488-4494.
37. Bartold, P.M. and Haynes, D.R. (1991) Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. J. Periodontol. Res. 26:339-345.
38. (Bartold, P.M. (1991) Arch. Oral Biol 36: 791-797. Takada, H., MIkara, J., Morisaki, I., Hamada, S. Infect. Immun. 59:295-301.
39.Bartold, P.M. and Millar, S.J.(1988). Effect of lipopolysaccharide on proteoglycan synthesis by adult human gingival fibroblast in vitro InfectImmun. 56: 2149-2155.
40.Faar,S.B y Kogoma, T. (1991) Oxidative stress responses in escherichia coli and salmonella typhimurium. Microbiol . Rev. Dec . 561-585
41.Smith, J. M, Mkoji, G. M y Prichard, R. K. (1989) Depression of hidrogen peroxide dependent killing of schistosomula in vitro by peritoneal exudate cells from Schistosoma mansoni infected mice. Am . J .Trop.Med.40 (2):186-194 .
42.Bropy,P.M y Barrett, J (1990).Strategies for detoxificacion of aldehydic products of lipid peroxidation in helminths.Mol.Biochem.Parasitol 42:205-212
43.Demple y Cuevas 1991
44.Ossowski,Y.,hausner,G.y Lowen,P.C.,(1983).Molecular analysis based on the aminoacid secuence of catalase.J.Mol.Evol.37:71-76.
45.Yi Sun. 1997.Multiplicity of antioxidant enzyme catalase in mouse liver cells Free.Rad.Res. vol.26. p.p 343-350

46.Clerch Biadasz Linda ,Angelique Wright,David J.y Donald Massaro. (1996) Early divergent lung antioxidant enzyme expression in response to lipopolysaccharide. American physiological Society.271(Lung cell .Mol.Physiol.15): L949-L954 .

47. Bautista, A.P.K., Mészáros, J. Bojta, and J.J. Spintzer.(1990) Superooxide anion generation in the liver during the early stage of entoxemia in rats. J. Leukoc. Biol. 48:123-128.

48.Inoe, M (1994) Protective mechanism against reactive oxygen species. In: The liver Biology and Pathology edited by I.M. Arias, J.L. Boyer, W.B. Jakoby, N. Fausto, D. Schacter, and D.A. Shafritz. New York. Raven. p: 443-459.

49.Pinteaux E, CopinJC,Ledig M ,Tholey G. (1996) Modulation of oxigen – radical-scavenging enzymes by oxidative stress in primary cultures of rat astroglial cells.Dev Neurosci.; 18 (5-6): 397-404.

50. Michiels C., RAES M, Toussaint O., y Remacle J.(1994) Importance of se-glutathione peroxidase, catalase,and Cu/-Zn SOD for cell survival against oxidative stress .Free Radical Biology y Medicine.vol. 17. N° 3.pp.235-248.

51.Bautista, A.P.K., Mészáros, J. Bojta, and J.J. Spintzer.(1990) Superooxide anion generation in the liver during the early stage of entoxemia in rats. J. Leukoc. Biol. 48:123-128.

52.Deforge L., Preston A.M, takeuchie, Kenncy J, Boxer L, and Remick D . (1993) .Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress.The Journal of biological Chemistry vol.268 dec.5,.Pp.25568-25576.

53.Zóltan and Jun-xi Wu.1997 Role of glutathione and catalase in H_2O_2 detoxificacion in LPS –activated hepatic endothelial and kupffer cells.AM.Journal Physiol 273 Gastrointest.LiverPhysiol.36: G1304-G1311.

54.Rubio R.M.E. (1997) Tesis Estudio del metabolismo de radicales libres de taenia crassiceps. Puebla

55.Visner, GA, Block, ER, Burr, IM, Nick, HS.(1990) Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflamatory respons. J.BiolChem. 265: 2856-2864.

56.Portoles, T.M., Catalá, M, Antón, A. And Pagani, R. Hepatic response to the oxidative stress induced by E. Coli endotoxin:Glutathione as an index of the acute phase during the endotoxic shock.

57.Fantone JC, Ward PA. (1982). Role of oxigen derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reaction. Am. J. Physiol. 107:307-401.

58. Narayananan AS, Page, RC, Lab. Invest. (1978) 39: 61-65)
59.Lowry, O.H., Rosenbrough, N.H., Farr, A.L. and Randall, R.L. (1951) Protein measurament with the folin Phenol reagent. J.Biol. Chem. 193: 265-275.
60.Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
61.Abbas AK, Lichman AH, Pober JS.(1994) Cellular inmunology.E D.WB Saunders Company.
62. Sun Y., Elwell, H., and Oberley, L.W. (1988) A simultaneous visualization of the antioxidante enzymes gluthatione peroxidase and catalase on poliacrilamide gels. Free Rad. Comms 5: 65-75.
63. Beers, R.F. and I. W. Sizer. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 195: 133-140.
64. Burd, C. G. and Dreyfuss G. 1991.Conserved structures and diversity of functions of Rna-binding proteins. Science 265: 615-621.

14.ANEXOS

14.1 EQUIPO

- Agitador magnético Thermolyne.
- Centrífuga Beckman.
- Potenciómetro.
- Refrigeradores 4°C, -20°C, -70°C.
- Equipo de electroforesis Hoeffer.
- Equipo de transeferencia Hoeffer.
- Espectrofotómetro visible
- Espectrofotómetro ultravioleta.
- Transiluminador.
- Equipo de Fotografía.
- Balanza análitica Ohauz.
- Agitador orbital. Lab-Line.

14.2 REACTIVOS.

- Acrilamida. SIGMA
- Acido acético.
- Agua oxigenada SIGMA
- Anti-catalasa Upstate Biotechnology.
- Azul de Coomasie LKB
- Bis- acrilamida SIGMA
- Carbonato de sodio SIGMA
- Cloruro de sodio.SIGMA
- Cloruro férrico.SIGMA
- EDTA SIGMA
- Ferrocianuro de potasio.
- Glicina SIGMA
- Glicerol SIGMA
- Hidróxido de potasio. SIGMA
- Hidróxido de sodio. SIGMA
- Leche descremada.
- Mercaptoetanol. SIGMA
- Metanol
- Membrana de Nitrocelulosa BIO-RAD
- Tris. SIGMA
- Triton SIGMA
- Tween 20