

508



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

“INDUCCION DE LA EXPRESION DE
CICLOOXIGENASA₂ (COX₂) POR EL TRATAMIENTO
CON LIPOPOLISACARIDOS EN FIBROBLASTOS
GINGIVALES HUMANOS”

2904/98

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A :
ELIAS ULISES TAFOYA BARAJAS

TUTOR: DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS
ASESOR: M. EN C. AGUSTIN GARCIA CABALLERO
FINANCIADO POR DGAPA IN-224398



MEXICO, D. F.

2001



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: C. D. Lúz del Carmen González García

VOCAL: M. en C. Jaime Esquivel Soto.

SECRETARIO: Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

1ER. SUPLENTE: C. D. Gerardo Martínez Anaya.

2DO. SUPLENTE: D. en C. José Domingo Méndez

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

ASESOR: M.C. Agustín García Caballero.

SUSTENTANTE: Elías Ulises Tafoya Barajas.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica de la división de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología bajo la dirección de la Dra. Gloria Gutiérrez-Venegas. Proyecto apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. DGAPA no. IN224398.

Agradecimientos:

- Con el mayor agradecimiento a la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por su apoyo, paciencia y amistad.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de la máxima casa de estudios.
- A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico por el financiamiento de este proyecto IN 224398.
- A mis compañeros de laboratorio: Carlos Alberto Vázquez, Armando Flores, Luis Contreras, Carolina Barajas, Carla Portillo, Silvia Maldonado, Patricia Román, Elizabeth Ruíz, Erika García, Miguel Pérez Garzón, Mauricio Peña, Perla y Ramiro.
- A mis amigos: Arturo Montoya, Daniel Vara y Alberto Zelocuatecatl. Por su amistad y apoyo.

DEDICATORIA:

- **A MI MADRE:**

Ma. Guadalupe Barajas Morales. Por su amor, su apoyo, y su gran dedicación ya que a sido un gran ejemplo para mi y mis hermanos.

- **A MIS HERMANOS:**

Perla Jazmin y Juan Ricardo. Por su paciencia y cariño.

- **A MI PADRE:**

Elias Tafoya Acosta. Por su apoyo.

- **A LA MEMORIA DE MI MEJOR AMIGO:**

Carlos Vázquez Sandoval. Por su gran amistad, compañía, su paciencia y consejos. Siempre recordaré las cosas que pasamos juntos.

INDICE

1. Resumen.	1
2. Antecedentes.	2
3. Introducción.	4
3.1 Histología del periodonto.	4
3.2 Encía.	5
3.3 Ligamento periodontal.	9
3.4 Hueso.	16
3.5 Cemento.	18
4. Fibroblastos Gingivales Humanos.	20
5. Lipopolisacáridos orales.	21
5.1 Composición y estructura de LPS orales.	22
5.2 Estructura del lípido A obtenido de Bacterias orales.	22
5.3 Región polisacárida de los LPS orales.	22
5.4 Estimulación de mediadores de la inflamación por LPS orales.	22
5.5 Efecto de los LPS sobre las células del parodonto.	22
5.6 Interacción de LPS en células epiteliales.	24
5.7 Interacciones de LPS orales con fibroblastos.	25
6. Planteamiento del problema.	26
6.1. Justificación.	26
7. Objetivos.	26
7.1 Objetivo general.	26
7.2 Objetivo específicos	26
8. Hipótesis	27
9. Tipo de estudio	28
10. Materiales.	28
10.1 Material biológico.	28
10.2 Material.	28
11. Equipo	28
12. Reactivos	29
13. Metodología	30
13.1 Cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos	30
13.2 Aislamiento de LPS	30
13.3 Determinación de concentración de proteína	31
13.4 RT-PCR	32
13.5 Western blot	33
13.6 Ensayo de Pg E ₂	33
14. Presupuesto	33
15. Resultados	34
15.1 Efecto de LPS sobre la transcripción de Cox ₂	34
15.2 RNA obtenido de fibroblastos gingivales humanos	35
15.3 Dosis respuesta de la amplificación de Cox ₂	36
15.4 Cuantificación de proteína total	37
15.5 Efecto de los LPS sobre la traducción de Cox ₂	38
15.6 Efecto de los LPS sobre la producción de Pg E ₂	39

16. Discusión	40
17. Conclusiones	41
18. Bibliografía	42
19. Anexos	46

RESUMEN

Los lipopolisacáridos son el mayor componente de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Este es considerado como el factor de patogénesis de los tejidos periodontales. Dentro de los daños causados por los lipopolisacáridos se encuentra la estimulación de factores responsables de la activación de los recursos naturales de defensa de nuestro organismo en los procesos inflamatorios agudos y crónicos. Se ha visto que Ciclooxygenasa 2 (COX $_2$), es la isoforma inducible en los diferentes tejidos, cuyo sustrato producido como resultado de la catálisis de esta enzima es la prostaglandina E $_2$, quien es un importante mediador de procesos inflamatorios.

El propósito de este estudio es determinar si los lipopolisacáridos inducen la expresión de esta enzima en los fibroblastos gingivales humanos. Para lo cual las células serán retadas con lipopolisacáridos aislados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* este microorganismo está constantemente relacionado con la enfermedad periodontal.¹

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron de explantes de pacientes a partir de los cuales se generaron cultivos celulares primarios y fueron expuestos a los efectos tóxicos de lipopolisacáridos extraídos de *A. actinomycetemcomitans*. Se realizaron estudios dosis respuesta y curso temporal para así determinar los efectos de los mismos sobre la expresión de esta enzima mediante ensayo de RT-PCR, Western blot y la cuantificación de PGE $_2$ por el método de ELISA.

El presente es un estudio prospectivo y experimental. Las variables independientes fueron, la concentración del LPS (dosis) y el tiempo que este estuvo en contacto con la célula, 15, 30 min. 1, 3, 6, 12, 24, horas y las variables dependientes fueron la inducción de la ciclooxygenasa y producción de PGE $_2$.

Los resultados obtenidos de este estudio demuestran que la respuesta en la expresión de RNA-m de Cox $_2$ esta ligada a la dosis (1 μ g/ml) y a un periodo de tiempo determinado (15 min).

ANTECEDENTES

Las prostaglandinas reciben este nombre debido a que fueron aisladas por primera vez a partir del fluido seminal. Aunque algunos de los efectos biológicos de las prostaglandinas fueron descubiertos en la década de los 30, estas moléculas no pudieron ser caracterizadas hasta que en el año de 1957 los investigadores S. Bergstrom y J. Sjovall aislaron y caracterizaron a las prostaglandinas PGE₂ y PGF₂.

Casi todas las etapas de la reproducción y el desarrollo están controladas por las prostaglandinas. Por ejemplo: las Prostaglandinas PGE₂ y PGF_{2α} estimulan la contracción de músculo liso del útero y son empleadas a nivel clínico para inducir abortos.

Entre sus efectos fisiológicos se ha determinado que las prostaglandinas participan en procesos de inflamación tisular, misma que puede ser inhibida mediante el consumo de ácido acetilsalicílico (aspirina). La biosíntesis de prostaglandinas puede así mismo inhibirse con un tipo de hormonas esteroideas denominadas corticoesteroides.

La hidrólisis de fosfolípidos por la enzima fosfolipasa A₂ produce como sustrato ácido araquidónico y este metabolito sirve de sustrato para las isoformas de ciclooxigenasa (COX), que catalizan la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas. Conocemos dos isoformas de esta enzima; uno de estos tipo 1 (COX₁, activada principalmente bajo condiciones psicológicas) y la otra forma es la tipo 2 (COX₂, presente por estímulos inflamatorios)², enzima encargada de sintetizar a las prostaglandinas, que dentro de los principales miembros de esta familia encontramos a la PGE₂, PGH₂, PGF₂, PGD₂, y el Tromboxano A₂, las cuales son uno de los principales blancos de la drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINES)³. La síntesis de COX₂ es inducida dentro de la célula cuando hay algún tipo de lesión tisular y es la encargada de los procesos de inflamación al activar a las prostaglandinas, dando como resultado los procesos quimiotácticos característicos de este estado, dolor, rubor, tumor y calor. Fig. 1

Las prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y prostaciclina forman una familia de efectores celulares derivados del ácido araquidónico. Estas moléculas poseen una extraordinaria diversidad de funciones. Se ha estimado que un tercio de todos los medicamentos conocidos afectan a sistemas que son modulados por las prostaglandinas.

A continuación se hace una revisión somera sobre los procesos biológicos más relevantes en el periodonto.

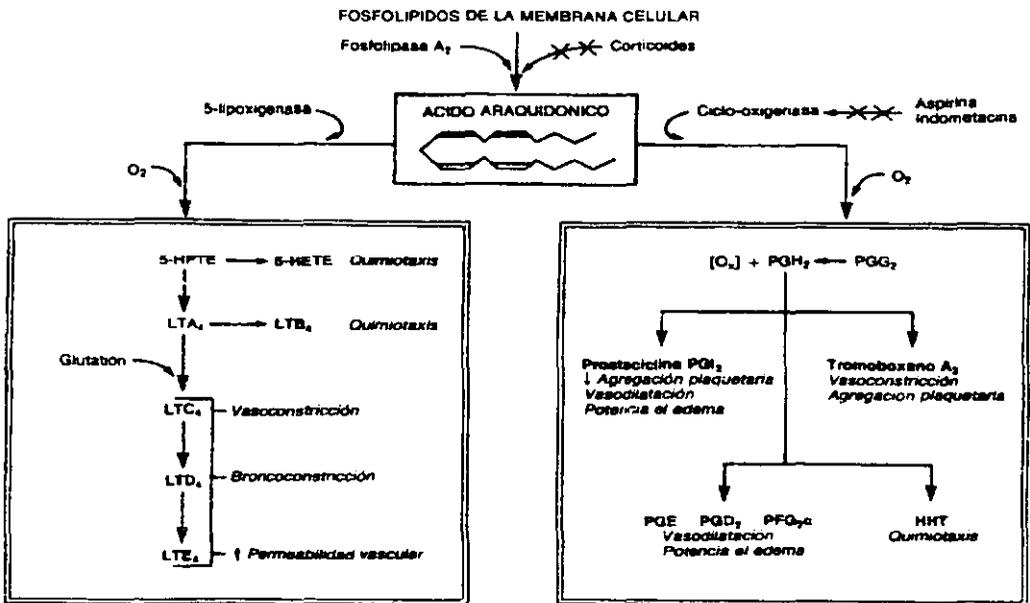


Fig 1 Metabolitos del ácido araquidónico en la inflamación .
 Tomado de patología estructural y funcional de Robbins.

INTRODUCCIÓN

Histología del periodonto.

Desde el punto de vista embriológico y fisiológico el periodonto se constituye en una unidad compuesta por la encía, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Las tres últimas estructuras forman el denominado periodonto de inserción, debido al hecho de constituirse en elementos que posibilitan la articulación del órgano dental al alvéolo.

Por otro lado, la encía en su totalidad es denominada periodonto de protección, en virtud de sus importantes relaciones funcionales con el periodonto de inserción.

El periodonto de inserción se origina del saco o folículo dental, que es una condensación del ectodermo formado en torno del germen dental, nítidamente observado en la fase de campana de la odontogénesis (Fig.2)



Fig. 2 Fotografía de corte histológico de un embrión de ratón (H. E. aumento original 60 X) donde se observa la fase de campana de la odontogénesis. Nótese el folículo dental apuntado por la flecha. (Tomado de diagnóstico y tratamiento del traumatismo dental. Alvares Silvia- Alvares Sérgio. Ac. Med-Odontológicas Latinoamérica A.C. 1997)

El saco dental se constituye en las regiones interna, media y externa, que originan respectivamente el cemento, ligamento periodontal y el hueso alveolar propiamente dicho.

El periodonto de protección corresponde a la adaptación de la mucosa bucal que ocurre durante la erupción de los dientes. Solamente el epitelio especializado en el establecimiento de la unión entre la encía y el esmalte (epitelio de unión) se origina del epitelio reducido del órgano del esmalte.

Encía

La mucosa bucal que se relaciona con los dientes y con el proceso alveolar se compone de encía y mucosa alveolar.

La encía recubre el cuello de los dientes y parte del proceso alveolar, extendiéndose en la cara vestibular del maxilar, así como en el paladar, la encía se une a la mucosa palatina sin que exista una línea de unión distinta, ya que la mucosa palatina también se constituye en una mucosa masticatoria.

La encía se subdivide en libre o marginal y encía insertada, separadas por el surco marginal o surco de la encía libre (Fig.3)

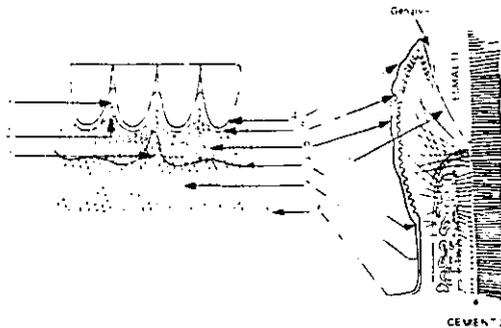


Fig. 3 Ilustración esquemática de la encía clínicamente sana.

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. papila interdental | 6. encía insertada |
| 2. surco interdental | 7. unión mucogingival |
| 3. frenillo | 8. mucosa alveolar |
| 4. encía marginal | 9. fondo de saco vestibular |
| 5. surco marginal | 10. epitelio de unión (unión dentogingival) |

(Tomado de diagnóstico y tratamiento del traumatismo dental. Alvares Silvia- Alvares Sérgio. Ac. Med-
Odontológicas Latinoamericana A.C. 1997)

En los espacios interdientales la encía libre constituye las llamadas papilas interdientales.

La encía libre se divide en tres regiones denominadas:

- a) encía libre o marginal.
- b) pared del surco gingival.
- c) unión dentogingival.

La vertiente libre está separada de la encía insertada, casi siempre, por el surco marginal y se extiende hasta el borde libre de la encía marginal. A partir de ahí se inicia la pared del surco gingival, que va hasta el encuentro con el epitelio de unión.

El epitelio de la encía marginal es esencialmente plano estratificado y se origina del ectodermo. Incluye el epitelio de unión dentogingival, el epitelio del surco gingival y el epitelio de la vertiente libre de la encía marginal.

El epitelio de unión, forma, en dientes humanos erupcionados, un collar de 1 a 2 mm de espesor, que se extiende de la unión cemento-esmalte hasta el fondo del surco gingival (Fig. 4)



Fig. 4 Fotografía de un corte histológico (H. E. aumento original 25X) del diente y su respectiva encía gingival donde se observan. A- epitelio gingival. B- epitelio de unión. (Tomado de diagnóstico y tratamiento del traumatismo dental. Alvares Silvia- Alvares Sérgio. Ac. Med-Odontológicas Latinoamérica A.C. 1997)

Está constituido solamente por dos estratos: el basal y el suprabasal. Las células del estrato basal son cuboidales mientras que las del estrato suprabasal son fundamentalmente aplanadas y orientadas en disposición paralela a la superficie del diente.

El número de líneas celulares en el estrato suprabasal puede variar de 1 a 3 en su terminación apical y de 15 a 30 en su terminación en el fondo del surco gingival. El tiempo de renovación celular de ese epitelio es de 4 a 10 días en primates y las células se mueven continuamente en dirección coronaria para exfoliarse en el fondo del surco gingival. Este epitelio se caracteriza por el hecho de que sus células están interconectadas por un pequeño número de desmosomas y con acontecimiento ocasional de uniones septadas. Los espacios intercelulares son variables en ancho e incluyen un número variable de leucocitos migratorios.

Con la superficie del esmalte o con una banda estrecha de material amorfo y electrodensos, de origen desconocido y denominada cutícula dental. El epitelio del surco gingival o surcular varía en extensión conforme a la profundidad del surco gingival y puede continuar lateralmente a la porción coronaria del epitelio de unión, en dirección apical (Fig. 4), formando una línea de unión con éste que, a veces, es mal definida.

Aunque el epitelio del surco gingival humano presenta una semejanza estructural con el epitelio gingival queratinizado, este no se queratiniza mucho aunque puede exhibir, morfológicamente, tendencia a la queratinización sin producir una línea superficial orto o paraqueratinizada. Sus espacios intercelulares son estrechos y no contienen leucocitos. Su interfase con el tejido conjuntivo se presenta en línea recta y lisa.

El epitelio de la vertiente libre puede ser queratinizado o paraqueratinizado y exhibe una cantidad apreciable de papilas que se interconectan con las papilas conjuntivas de la lámina propia (Fig.5).

La lámina propia de la encía marginal consiste fundamentalmente de células, matriz intercelular, fibras de colágeno, del llamado grupo de fibras gingivales, así como vasos y haces de fibras nerviosas.

Las células observables en la lámina propia son los fibroblastos, mastocitos y un pequeño número de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares. Las células más numerosas son los fibroblastos, responsables por la biosíntesis de componentes de la matriz intercelular tales como los colágenos tipo I, III y V, mucopolisacáridos, elastina y glicoproteínas como la fibronectina. Los fibroblastos también producen colagenasa y fagocitan fibrillas colágenas.



Fig. 5 Fotografía de un corte histológico (H.E. aumento original 125 X) de encía marginal (vertiente libre) humana. Observar el epitelio plano estratificado paraqueratinizado (persistencia de núcleos en las células de las líneas superficiales) papilas epiteliales profundas. (Tomado de diagnóstico y tratamiento del traumatismo dental. Alvares Silvia- Alvares Sérgio. Ac. Med-Odontológicas Latinoamérica A.C. 1997)

Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es el tejido conjuntivo interpuesto entre el cemento radicular y la superficie del hueso alveolar propiamente dicho. Tiene una espesura variable de 0.15 a 0.38 mm, la cual tiende a disminuir con el transcurso de la edad. En el ligamento periodontal se encuentran células, sustancia intercelular, vasos y nervios.

La sustancia intercelular amorfa está constituida fundamentalmente por los mucopolisacáridos.

Además de los mucopolisacáridos, se encuentran, en menor cantidad, glicoproteínas, como por ejemplo la laminina y la fibronectina. Esas glicoproteínas ejercen un papel fundamental por contener proteínas integrales de membrana (ejemplo, integrina) y componentes de la matriz extracelular, tales como el colágeno y los mucopolisacáridos. Se destaca aún, el hecho de que determinadas proteínas integrales de membrana, además de ligarse por la superficie externa de la membrana plasmática con glicoproteínas de la matriz, presentan por la fase interna de la membrana, locales de ligación con proteínas citoplasmáticas (tales como la talina y la vinculina) que a su vez se ligan con las proteínas del citoesqueleto, como por ejemplo la actina.

Las fibras más abundantes en el ligamento periodontal son las colágenas, que fundamentalmente constituyen las llamadas fibras principales, que ejercen la función esencial de ligar el cemento radicular al hueso alveolar propiamente dicho y mantienen la raíz suspendida en el interior del alvéolo. También contribuyen, junto con el epitelio de unión, al establecimiento de un mecanismo armónico de enlace entre la encía y el diente. Esas fibras colágenas principales están formadas por la asociación de fibrillas resultantes de la polimerización de moléculas de tropocolágeno del tipo I, con una discreta participación del tropocolágeno del tipo V.

En los espacios existentes entre las fibras principales, también se aprecian delgadas fibras colágenas (que no están relacionadas con el sistema de suspensión de la raíz en el alvéolo óseo) y fibras reticulares (constituidas por fibrillas colágenas resultantes de la polimerización del tropocolágeno tipo III).

Además de las fibras colágenas, también se ubican en el ligamento fibras oxitalámicas. En el ligamento periodontal humano no fueron descritas fibras elásticas, con excepción de aquellas adosadas a la pared de vasos sanguíneos.

Las células presentes en el ligamento periodontal son: fibroblastos, células ectomesenquimales indiferenciadas, cementoblastos, osteoclastos, células epiteliales de Mallassez, células asociadas a elementos neurovasculares y células de defensa, como macrófagos, linfocitos, polimorfonucleares y mastocitos que pueden apreciarse imprevisiblemente en el periodonto clínicamente sano. El tipo celular que aparece en mayor cantidad es el fibroblasto (Fig.6).

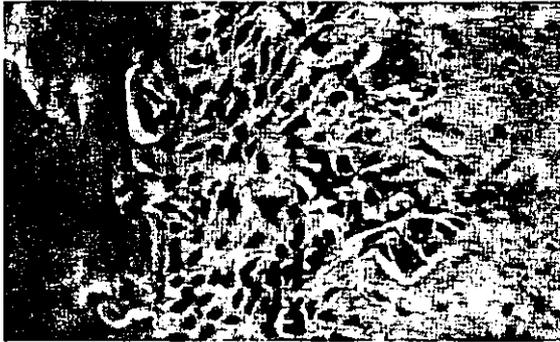


Fig. 6 Fotografía de un corte histológico de periodonto de ratón (H. E. aumento original 125X) mostrando en:

Flecha: Fibroblastos

A- áreas de reabsorción dentaria

B- osteoclastos e la superficie osea.

(Tomado de diagnóstico y tratamiento del traumatismo dental. Alvares Silvia- Alvares Sérgio. Ac. Méd-odontológicas Latinoamérica A.C. 1997)

Al microscopio de luz los fibroblastos exhiben un núcleo alargado con cromatina dispersa y por lo menos un nucléolo. La célula difícilmente puede ser apreciada como un todo, ya que exhibe numerosos procesos citoplasmáticos no observables al microscopio óptico.

Al ser examinadas en el microscopio electrónico de barrido exhiben una morfología variada y dependiente principalmente de las condiciones locales; o sea, localizadas entre haces de fibras principales o en áreas desprovistas de las mismas.

La microscopía electrónica mostró que los procesos citoplasmáticos de diferentes fibroblastos frecuentemente se contactan creando desmosomas, uniones septadas y uniones estrechas.

Desde el punto de vista estructural el fibroblasto se caracteriza por presentar una apreciable cantidad de cisternas del retículo endoplasmático rugoso y uno o más complejos de Golgi bastante desarrollados, lo que concuerda con su función primordial de sintetizar la sustancia intercelular del tejido conjuntivo. Las observaciones de vesículas con fragmentos de fibrillas colágenas y que exhiben reacción positiva con la fosfatasa ácida permiten concluir que los fibroblastos pueden simultáneamente sintetizar y degradar componentes de la matriz extracelular y que la degradación intracelular del colágeno parece ser más significativa.

En experimento en el cual los animales fueron sometidos a la ruptura del ligamento periodontal y a la administración continua de [³H] timidina, las células progenitoras de fibroblastos quedaron identificadas como fibroblastos paravasculares, exhibiendo diferentes grados de citodiferenciación, con tendencia a una indiferenciación relativa. Esas células, entre tanto, pueden representar una población precursora multipotencial pudiendo dar origen a células osteogénicas y no osteogénicas.⁴

La mayor parte de las fibras principales del ligamento periodontal se caracterizan por exhibir una o ambas de las extremidades insertadas en el hueso alveolar propiamente dicho o en el cemento radicular.

El segmento de la fibra principal que está insertado en el tejido mineralizado y que también se presenta mineralizado se denomina fibra de Sharpey. Es importante resaltar que esta fibra está constituida por la asociación de un gran número de fibrillas, y su renovación (degradación e incorporación de nuevas fibrillas) puede ocurrir sin que ella pierda su identidad.

Las fibras principales del ligamento periodontal pueden observarse fácilmente en el microscopio óptico y se clasifican en los siguientes grupos (Fig. 7)

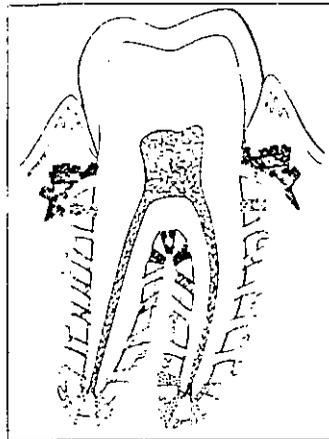


Fig. 7 esquema de los principales grupos de fibras periodontales. Corte mesiodistal.

- | | |
|---------------------------------|------------------------|
| 1- fibras intraradiculares | 4- fibras oblicuas |
| 2- fibras de la cresta alveolar | 5- fibras apicales |
| 3- fibras horizontales | 6- fibras transeptales |

(Tomado de diagnóstico y tratamiento del traumatismo dental, Alvares Silvia- Alvares Sérgio, Ac. Med-
Odontológicas Latinoamerica A.C. 1997)

1) **Grupo de la cresta alveolar:** una extremidad fijada en el cemento más abajo de la unión amelocementaria y la otra en la cresta del hueso alveolar (Fig. 8)

2) **Grupo horizontal:** situado apicalmente con relación al grupo anterior, las fibras se dirigen en ángulo recto al eje longitudinal del diente, del cemento y al hueso alveolar propiamente dicho.

3) **Grupo oblicuo:** es el más numeroso, situado apicalmente con relación al anterior, se extiende hasta las proximidades del ápice radicular. Sus fibras se insertan en el cemento y en el hueso alveolar, describiendo una trayectoria inclinada en conexión con el eje longitudinal del diente, en una condición en la que la inserción ósea se presenta más coronaria que cementaria (Fig. 9).

4) **Grupo apical:** sus fibras parten del cemento de la región apical de la raíz en dirección al hueso alveolar que delimita el fondo del alvéolo.

5) **Grupo interradicular:** Situado entre raíces de dientes multirradiculares, sus fibras se insertan en el cemento de la zona de la bi o trifurcación y en la cresta del septum óseo interradicular.

6) **Grupo supraalveolar o gingival:** Constituido por varios subgrupos (enumerados a continuación) y sus fibras se localizan en la lámina propia de la encía marginal (Fig. 9 y 10).

- Grupo dentogingival
- Grupo alvéologingival
- Grupo dentoperiostial
- Grupo circular
- Grupo transeptal



Fig. 8 Fotografía de un corte histológico (Mallory) aumento original 60 X) mostrando:

A- grupo de fibras de la cresta del hueso alveolar

B- cresta del hueso alveolar

C- cemento acelular

D- dentina

(Tomado de diagnóstico y tratamiento del traumatismo dental. Alvares Silvia- Alvares Sérgio. Ac. Med-
Odontológicas Latinoamérica A.C. 1997)

En el periodonto de los dientes superiores la irrigación deriva de dos ramos principales de la arteria maxilar interna: las arterias alveolar superior e infraorbitaria. Con relación al periodonto de los dientes inferiores el suplemento sanguíneo se origina a partir de la arteria alveolar inferior. Además, el periodonto de los dientes inferiores puede recibir arteriolas provenientes del ramo sublingual de la arteria lingual, de la arteria bucal, de la labial inferior, de la maseterina y de la mentoniana, en cuanto al periodonto de los dientes maxilares puede recibir arteriolas provenientes de la arteria palatina mayor anterior y de los ramos labiales de las arterias facial e infraorbital. La irrigación arterial del ligamento periodontal se deriva de tres fuentes:

1. Ramos de la arteria dentaria, es decir las arteriolas periodontales longitudinales que se originan en el ligamento periodontal apical y corren en dirección gingival.
2. Ramos de las arteriolas interalveolar e interradicular que se originan en los espacios medulares de los septus interalveolares e interradiculares y penetran en el ligamento periodontal por numerosos orificios en el hueso alveolar propiamente dicho. Esos ramos, denominados ramos alveolares perforantes, son los más numerosos.

3. Ramos de las arteriolas supraparietales que corren a través de la mucosa bucal y lingual, recubren el proceso alveolar y se aproximan a la encía. Esos ramos se comunican a nivel cervical con arteriolas del ligamento.

Las vénulas que drenan el ligamento periodontal y el hueso alveolar propiamente dicho se juntan con aquellos de los septos óseos, aún no siguen el curso de las arteriolas. Ellas se anastomosan en los septos interalveolar para formar vasos mayores que a su vez se juntan con la red venosa de los espacios medulares adyacentes al fondo de cada alvéolo.

Histológicamente los vasos del ligamento periodontal se observan en los espacios intersticiales de tejido conjuntivo flojo localizados entre las fibras principales (Fig. 9) Ramos de la arteria dentaria, es decir las arteriolas periodontales longitudinales que se originan en el ligamento periodontal apical y corren en dirección gingival.

Además de los vasos sanguíneos el ligamento periodontal contiene una red apreciable de capilares linfáticos.⁵

Los nervios sensitivos que suplen el ligamento periodontal de los dientes maxilares se originan del nervio alveolar superior posterior, medio y anterior, mientras que en el caso de los dientes mandibulares el suplemento nervioso se origina a partir del nervio alveolar inferior. Los ramos nerviosos destinados al ligamento periodontal pasan a través de dos caminos:

1. A partir del nervio dentario, antes de que él penetre en la pulpa por el foramen apical.
2. Ramos de los nervios que transitan por los septos interdientales e interradiculares alcanzan el ligamento periodontal a través de los orificios existentes en el hueso alveolar propiamente dicho.

En el ligamento periodontal humano, las fibras amielínicas tienen un diámetro variable entre 0.5 y 1 micrómetro, mientras que en el caso de las mielínicas la variabilidad fluctúa entre 1 y 16 micrómetros. Parte de las fibras amielínicas se constituyen en fibras posganglionarias del sistema nervioso autónomo. Con relación a las fibras sensoriales, una porción de ellas muestra las prolongaciones de origen en el ganglio trigeminal, mientras que en otras se localizan en el núcleo mesencefálico del nervio trigémino. Las fibras sensoriales originan varios tipos de receptores de organización morfológica variable, según la especie animal.



Fig. 9 Esquema de fibras periodontales del grupo supraalveolar o gingival -corte en sentido vestibulo-bucal- dientes anteriores.

- | | |
|---|--------------------------|
| 1. grupo circular | C. ligamento periodontal |
| 2. grupo dentogingival | D. cemento |
| 3. grupo dentoperiosteal | E. dentina |
| A. grupo alvéolo-gingival epitelio surcular | |
| B. epitelio de unión | |

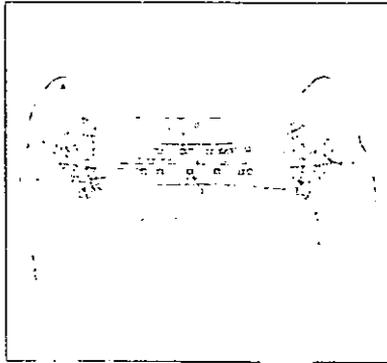


Fig. 10 Esquema de las fibras periodontales del grupo supraalveolar o gingival corte en el sentido vestibulo-bucal entre dientes posteriores.

- | | |
|--------------------------|---|
| 1. grupo circular | 4. grupo alvéolo-gingival |
| 2. grupo dentogingival | A. grupo alvéolo-gingival epitelio surcular |
| 3. grupo dentoperiosteal | B. epitelio de unión. |

(Tomadas de diagnóstico y tratamiento del traumatismo dental. Alvares Silvia- Alvares Sérgio. Ac. Med-odontológicas Latinoamérica A.C. 1997)

Hueso Alveolar

Por proceso alveolar se designan los segmentos óseos de la mandíbula que contienen los alvéolos dentales y que consisten de tablas corticales externas, de un hueso esponjoso central y de un hueso compacto que delimita los alvéolos. Este último se denomina, desde el punto de vista histológico, hueso fasciculado, porque proporciona anclaje para las fibras principales del ligamento periodontal (fibras de Sharpey) y, desde el punto de vista embriológico, se origina de la porción más externa del ectomesénquima del folículo dental. Por otra parte, por poseer una gran cantidad de perforaciones por las cuales pasan las fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos, también es conocido desde el punto de vista anatómico como placa cribiforme.

Las tablas corticales y el hueso que delimita los alvéolos (hueso alveolar propiamente dicho) se unen en la cresta alveolar, generalmente 1.5 a 2 mm bajo de la unión amelocementaria del diente.

En la superficie del alvéolo, podemos observar histológicamente que el hueso alveolar propiamente dicho se presenta constituido por:

- a) hueso fasciculado (laminillas óseas paralelas a la superficie del alvéolo que contienen fibras de Sharpey insertadas perpendicularmente a las laminillas).
- b) hueso laminar (laminillas óseas paralelas a la superficie del alvéolo, sin inclusión de las fibras de Sharpey).
- c) hueso haversiano (presencia del sistema de Havers).

El hueso fasciculado ocupa una significativa porción, aunque no toda la pared alveolar. Parece sobrepuesto al hueso laminar y hueso haversiano, así como, a veces, en algunas regiones constituye la única variedad de hueso a formar la pared del alvéolo.

La remodelación ósea de los procesos alveolares es constante; sin embargo, es particularmente drástica durante la erupción de los dientes deciduos y la sustitución por los dientes permanentes. Entre tanto, aun con una dentición permanente funcional, el grado de renovación del hueso alveolar parece ser mayor que en otras partes del esqueleto. Esto se debe probablemente a la migración poscriptiva fisiológica oclusal y mesial, así como a las alteraciones de fuerzas que actúan sobre los dientes. La célula responsable por la reabsorción del tejido óseo se denomina osteodasto y se presenta multinucleada. Se admite que los osteocitos también pueden reabsorber el cemento y la dentina. (Fig. 6)

Utilizando ratones adultos Wistar, los investigadores Kuribara y Enlow⁶ describieron a nivel estructural tres tipos de ligamento entre el hueso alveolar propiamente dicho y el ligamento periodontal, características para las superficies de remodelación de la pared alveolar:

1) el patrón más encontrado fue denominado "tipo adhesivo", que se forma subsecuentemente a la retirada de los osteoclastos y envuelve una línea de matriz extracelular producida por fibroblastos, a la cual se ligan nuevas fibrillas colágenas,

2) un "tipo continuo", con algunos haces de fibras de Sharpey resistiéndose a la reabsorción,

3) un "tipo intermedio" con ambos tipos "adhesivo" y "continuo" de ligamento de lado a lado.

Cemento

El cemento es un tejido conjuntivo mineralizado que recubre la superficie externa de la raíz de los dientes. La formación del cemento ocurre después del inicio de la formación de la dentina radicular con influencia de la vaina epitelial radicular de Hertwing. Una vez iniciada la formación de la dentina radicular ocurre una desorganización de la vaina de Hertwing, desencadenada aparentemente por una disolución de su lámina basal. Algunas células de la vaina emigran, separándose de la dentina y formando cordones epiteliales en la intimidad del folículo dental, denominados restos epiteliales de Mallassez (Fig. 9)

Las células que permanecen próximas a la superficie dentinaria terminan incorporadas al cemento. Inmediatamente después de la desorganización de la vaina radicular de Hertwing, las células ectomesenquimales indiferenciadas de la porción interna del folículo se diferencian en cementoblastos e inician la secreción de la matriz orgánica del cemento. La formación del cemento se considera un proceso incremental, lo que posibilita la observación al microscopio de luz de líneas hipocalcificadas que marcan el límite entre dos líneas y que son denominadas líneas incrementales de Salter.

Es importante resaltar el hecho de que la superficie del cemento se presenta recubierta por una matriz orgánica no mineralizada (cementoide), sobre la cual se disponen cementoblastos en posición semejante a la de un epitelio simple. Tradicionalmente se habla de dos tipos de cemento, el acelular y el celular.

En 1969, Listgarten y Kamin⁷ observaron en el cemento radicular una gran variación en la cantidad de cemento fibrilar, afibrilar y celular. Los términos fibrilar y afibrilar se refieren a la presencia o no de fibras colágenas producidas por los cementoblastos (fibras intrínsecas). En 1981, Jones⁸ propuso una clasificación detallada tomando en cuenta la presencia o ausencia de fibras colágenas intrínsecas, de fibras colágenas del ligamento (fibras de Sharpey extrínsecas) producidas por los fibroblastos del ligamento y de cementoncitos (cementoblastos aprisionados en la matriz mineralizada). Ella distinguió fundamentalmente el cemento relacionado funcionalmente al mecanismo de soporte del diente en oclusión, del cemento no relacionado a la inserción de fibras principales del ligamento.

El cemento acelular puede recubrir la dentina radicular desde la unión amelocementaria hasta el ápice, sin embargo, usualmente no se observa en el tercio apical de la raíz, donde encontramos apenas el tipo celular. El espesor del cemento es menor junto al esmalte (20 a 50 μm) y mayor junto al ápice (150 a 200 μm).

Las células incorporadas en el cemento celular, los cementocitos, son semejantes a los osteocitos, o sea, exhiben un cuerpo celular que se aloja en un espacio denominado laguna, del cual parten prolongamientos citoplasmáticos que se alojan en los canaliculos.

De la misma manera como ocurre en el tejido óseo, los canaliculos de los cementocitos vecinos se anastomosan, para permitir el establecimiento de un flujo de líquido intersticial de la superficie periodontal del cemento para las líneas celulares más profundas. Ese mecanismo posee una eficiencia relativa, de tal manera que a medida que se van formando nuevas, los cementocitos situados más profundamente, tienden a recibir menos líquido intersticial y acaban degenerándose. Cuando el cemento es relativamente delgado, las fibras de Sharpey pueden ser observadas cruzando todo su espesor. Con la producción continua de nuevas líneas, una cantidad apreciable de fibras de Sharpey termina quedando incorporada al cemento, sin establecer continuidad con fibras principales del ligamento. El anclaje propiamente dicho de las fibras del ligamento queda restringida a las líneas superiores o recién depositadas.

FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS

El fibroblasto es el elemento celular predominante en el tejido conectivo gingival. Entre los haces de fibras se encuentran abundantes fibroblastos. Como sucede en el tejido conectivo de cualquier otro sector del organismo, los fibroblastos sintetizan y secretan las fibras colágenas, así como elastina, proteínas colagenasas, glucoproteínas colagenasas, glucoproteínas y glucosa-aminoglucanos. La renovación de las fibras colágenas y otros componentes químicos, así como su degradación, son reguladas por los fibroblastos. Estos también regulan la cicatrización de heridas después de intervenciones quirúrgicas, traumatismo ó como resultado de un proceso patológico.

En encías aparentemente normales, podemos encontrar, leucocitos y células plasmáticas en el tejido conectivo. Los mastocitos están distribuidos por todo el organismo y son abundantes también en el tejido conectivo de la mucosa bucal y la encía. En una encía clínicamente normal, se encuentran pequeños focos de células plasmáticas y linfocitos en el tejido conectivo cerca de la base del surco. Los neutrófilos pueden observarse en alto número, tanto en el tejido conectivo gingival como en el surco. Estas células inflamatorias están normalmente presentes en pequeñas cantidades de las encías clínicamente sanas.⁹

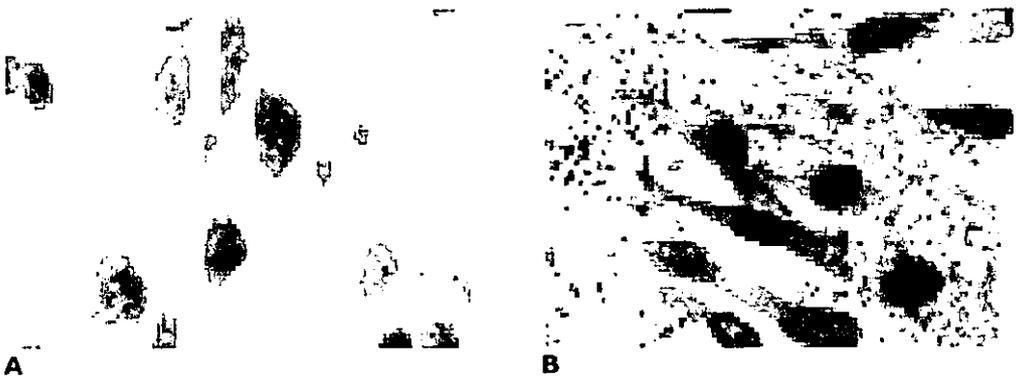


Fig. 12 Microfotografía de fibroblastos Gingivales Humanos A) Sanos y B) tratados con LPS. Tinción de GIEMSA (Aumento 100 X). Tomada por Miguel Perez Garzón. Lab. Bioquímica Unidad de Estudios de Posgrado F.O.

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatoso, consideradas por algunos autores como células diferenciadas de los pericitos. Su aspecto varía notablemente en los distintos tejidos, en tejido conectivo maduro normal se observan como células bastante grandes, achatadas o ahusadas con finas prolongaciones, tomando distintos aspectos según su ubicación. Son células glandulares activas ocupadas en la síntesis y secreción de componentes extracelulares, de los cuales algunos de los más importantes son la colágena o las fibras elásticas. Se cree que poseen una estimulación mediada por un polipéptido que puede ser liberado por macrófagos y plaquetas.

En estado no activo los fibroblastos se observan con escaso retículo endoplásmico y un pequeño aparato de Golgi por lo que algunos autores los denominan fibrocitos. Los fibroblastos son capaces de expresar COX₂ en presencia de diversos estímulos como: inflamación y componentes endotóxicos bacterianos como los lipopolisacáridos.

LIPOPOLISACARIDOS ORALES.¹⁰

El número total de bacterias que pueden ser aisladas de un sitio sano, oscila entre 100 y 1000 diferentes bacterias en una muestra de placa dentobacteriana de las cuales aproximadamente el 10 % corresponde a bacterias del tipo gram-negativo que son las involucradas en la liberación de LPS.

La gingivitis es una enfermedad caracterizada por el incremento en el enrojecimiento e inflamación de la encía que rodea la superficie dental conjuntamente con un incremento en el número y tipo de células inflamatorias; se produce de igual forma un aumento en las cuentas microbianas de hasta 10,000 a 100,000 microorganismos de los cuales del 15 al 50% son bacterias gram negativas. En la periodontitis, enfermedad en la que se produce una inflamación crónica que conlleva a la destrucción del hueso alveolar y pérdida de tejido conectivo se presenta un incremento en el número de bacterias de hasta 100,000 a 10,000,000 de microorganismos, este incremento se produce con una clara asociación de microorganismos de tipo gram negativo.

Entre los organismos gram-negativos más frecuentes asociados con la enfermedad periodontal se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Actynobacillus actinomycetemcomitans*.

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatoso, consideradas por algunos autores como células diferenciadas de los periocitos. Su aspecto varía notablemente en los distintos tejidos, en tejido conectivo maduro normal se observan como células bastante grandes, achatadas o ahusadas con finas prolongaciones, tomando distintos aspectos según su ubicación. Son células glandulares activas ocupadas en la síntesis y secreción de componentes extracelulares, de los cuales algunos de los más importantes son la colágena o las fibras elásticas. Se cree que poseen una estimulación mediada por un polipéptido que puede ser liberado por macrófagos y plaquetas.

En estado no activo los fibroblastos se observan con escaso retículo endoplásmico y un pequeño aparato de Golgi por lo que algunos autores los denominan fibrocitos. Los fibroblastos son capaces de expresar COX₂ en presencia de diversos estímulos como: inflamación y componentes endotóxicos bacterianos como los lipopolisacáridos.

LIPOPOLISACARIDOS ORALES.¹⁰

El número total de bacterias que pueden ser aisladas de un sitio sano, oscila entre 100 y 1000 diferentes bacterias en una muestra de placa dentobacteriana de las cuales aproximadamente el 10 % corresponde a bacterias del tipo gram-negativo que son las involucradas en la liberación de LPS.

La gingivitis es una enfermedad caracterizada por el incremento en el enrojecimiento e inflamación de la encía que rodea la superficie dental conjuntamente con un incremento en el número y tipo de células inflamatorias; se produce de igual forma un aumento en las cuentas microbianas de hasta 10,000 a 100,000 microorganismos de los cuales del 15 al 50% son bacterias gram negativas. En la periodontitis, enfermedad en la que se produce una inflamación crónica que conlleva a la destrucción del hueso alveolar y pérdida de tejido conectivo se presenta un incremento en el número de bacterias de hasta 100,000 a 10,000,000 de microorganismos, este incremento se produce con una clara asociación de microorganismos de tipo gram negativo.

Entre los organismos gram-negativos más frecuentes asociados con la enfermedad periodontal se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Actynobacillus actinomycetemcomitans*.

Estos microorganismos están asociados con la enfermedad y participan de manera importante en la promoción de la periodontitis; estas bacterias presentan en su superficie unas macromoléculas denominadas lipopolisacáridos.

Los lipopolisacáridos participan como mediadores de procesos inflamatorios. Se ha determinado que estas macromoléculas son permeables en todas las células que componen la encía y que inician una cascada de procesos que deterioran las estructuras orales. Algunos estudios muestran que al tratar los tejidos con diversos tipos de lipopolisacáridos se promueve la expresión de mediadores inflamatorios nocivos sobre el tejido huésped.

Composición y Estructura de Lipopolisacáridos Orales.

El grupo de lipopolisacárido más ampliamente caracterizado corresponde al de la familia *Enterobacteriaceae*, en particular *Escherichia coli*, que están formados por cuatro dominios consistentes en un lípido A, que es la región tóxica de la molécula, el núcleo interno de oligosacáridos, el núcleo externo y la región polisacárida O-antigénica.

Región polisacárida de los LPS orales.

Las porciones polisacáridas de las moléculas de LPS de las bacterias orales no han sido caracterizadas con gran detalle como las enterobacterias. El LPS más ampliamente estudiado corresponde al de *A. actinomycetemcomitans*; éste presenta una estructura repetida de (3 α -D fucosa (1-2)- α - L ramosa- (3-1)- β - D,N acetil-galactosamina). Biotipos de la misma especie contienen estructuras repetidas de deoxi-L-talosa y deoxi-D-talosa.

Estimulación de mediadores inflamatorios por LPS orales.

La actividad biológica de los LPS se presenta en la estructura denominada lípido A. Estudios en los que se utiliza, análogos del lípido A han demostrado que al modificar esta estructura, se afectan las actividades endotóxicas.

El efecto de los LPS sobre las células del periodonto.

Recientemente se ha demostrado que los tejidos gingivales sanos presentan un bajo nivel de expresión de mediadores inflamatorios. La molécula E-selectina se encuentra en la superficie del endotelio y su función es facilitar la salida de leucocitos del flujo sanguíneo a los tejidos circundantes con el fin de atacar a las bacterias presentes en el sitio de la infección. La expresión de IL-8 guía a los leucocitos al sitio de la colonización bacterial.

La distribución de los leucocitos en los tejidos gingivales aumenta cuando las bacterias, proteínas y lipopolisacáridos son reconocidos por el huésped en particular mediante la asociación de estas moléculas con los monocitos. De igual forma las células epiteliales de la encía, que constituyen el primer punto de contacto con los lipopolisacáridos en el parodonto liberan IL-4.¹¹

Las endotoxinas actúan también sobre los fibroblastos gingivales que si son estimulados liberan tanto IL-8 como la proteína quimotáctica monocítica. Se ha demostrado así mismo que en fibroblastos obtenidos de encías inflamadas, la respuesta a la producción de IL-8 disminuye cuando se tratan a estas células con lipopolisacáridos extraídos de *P. gingivalis*.

En los macrófagos los LPS promueven la síntesis de IL-1 β , que a su vez estimula células no mieloides (endoteliales, epiteliales y fibroblastos) secretan prostaglandinas y metaloproteínas mismas que se encuentran en altas concentraciones en los tejidos periodontales y en particular en el fluido crevicular, con lo que se inicia la destrucción ósea y de los tejidos de soporte como el ligamento periodontal.

De los mediadores de los procesos inflamatorios, el más ampliamente caracterizado es IL-1, entre cuyos efectos se encuentra la inducción de la proliferación de células T, degranulación de neutrófilos, liberación de citocinas y prostaglandina E₂ por parte de los fibroblastos gingivales y de los monocitos.

Los monocitos son el recurso principal de la secreción de TNF- α en respuesta a LPS. El TNF- α estimula la resorción ósea pero es menos potente que la IL-1. Incrementa así mismo la permeabilidad vascular, la degranulación de los neutrófilos e induce la respuesta de varios tipos celulares incluyendo la liberación de PGE₂ por los fibroblastos y de IL-1 por los monocitos. En el fluido crevicular los niveles de PGE₂, se incrementan durante los procesos inflamatorios. Se ha determinado que el tratamiento con agentes anti-inflamatorios participan en la disminución del proceso destructivo lo que nos sugiere que la PGE₂ participa de manera importante en la enfermedad periodontal.¹²

Los LPS presentes en la cavidad bucal pueden estimular a los macrófagos a secretar MMP que participan en la destrucción tanto de tejidos blandos como óseos.

Los lipopolisacáridos constituyen la característica dominante de la superficie de las bacterias gram-negativas; son los objetos principales de los anticuerpos producidos por el sistema inmune en respuesta a la infección bacteriana.

La porción lipídica de los lipopolisacáridos de algunas bacterias es tóxica para el organismo humano y de otros animales; es por ejemplo, responsable del peligroso descenso de la presión sanguínea que se produce en el síndrome tóxico causado por la infección de humano con bacterias gram-negativas. Los lipopolisacáridos han sido aislados en el laboratorio de muestras de *A. actinomicetemcomitans* por el método de Westphal.¹³

Los lipopolisacáridos (LPS) son complejos de alto peso molecular, componentes estructurales y funcionales de la pared celular externa de las bacterias gram negativas y responsables directos de la actividad endotóxica de las mismas. Presentan muy poca variabilidad estructural de una especie a otra pero en general todos se componen de tres regiones: una porción lipídica conocida como lípido A, responsable de la actividad endotóxica de la bacteria; un núcleo de polisacárido central y una región polisacárida de cadenas O específicas formada por unidades repetidas de 3 a 5 azúcares que sobresalen de la pared y confieren antigenicidad a la molécula.

INTERACCIONES DE LPS ORALES EN CÉLULAS EPITELIALES.

Aunque las células epiteliales sean presumiblemente el primer tipo de célula en entrar en contacto con los LPS presentes en las encías, poco se conoce sobre como estas responden a LPS obtenidos de bacterias orales. Sugiyama¹⁴ informó que el contacto primario en células epiteliales humanas produjo la actividad de IL-1 en respuesta a LPS de *E.Coli*, pero no examinó LPS de ninguna otra bacteria oral. Por otra parte, un estudio reciente encontró que las células epiteliales gingivales no produjeron IL-8 con respecto a LPS de *E.coli*, si bien las mismas células respondían a LPS de varios tipos de bacterias excluyendo *P. gingivalis*.¹⁵

INTERACCIONES DE LPS ORALES CON FIBROBLASTOS.

Los fibroblastos son el tipo de célula mas completamente estudiada debido a la facilidad con que son obtenidos así como su importante papel en la degradación tisular. Algunos investigadores han reportado que el LPS de *P.gingivalis* puede estimular la secreción de citocinas (IL-8, MCP-1), han encontrando que la mayor potencialidad se encuentra en el LPS de *E.Coli*, mientras otros sugieren que el LPS de *P. gingivalis* es incapaz de estimular este tipo de células.^{16,17,18,19,20}

Watanabe¹⁹ reportó que la proteína quimioestática monocítica es responsable de la respuesta de LPS aislados de *P.gingivalis* y es similar al LPS de *E. coli* en presencia de suero humano, pero aún más alta en ausencia del mismo. Por lo tanto los cultivos de fibroblastos son heterogéneos en cuanto a su nivel celular y de población.

Koka,¹⁷ ha observado que el LPS de *P. gingivalis* induce mediadores de la inflamación liberados por fibroblastos humanos y esta respuesta depende de:

- A) el sujeto de donde fueron aisladas las células,
- B) la superficie de la muestra usada para preparar las células, (fibroblastos gingivales o fibroblastos de el ligamento periodontal) y
- C) el mediador examinado (IL-1, IL-6 o PGE₂).

Ogawa,¹⁶ reportó que fibroblastos gingivales aislados de pacientes con periodontitis crónica tuvieron una respuesta de IL-8 reducida al ser retados con LPS de *P. gingivalis*. Comparó que fibroblastos aislados de pacientes periodontalmente sanos tienen resultados diferentes exponiéndolos a LPS de *E. coli* siendo este mismo el agente causal de la enfermedad. Afirma que preexponiendo por corto tiempo a LPS de *P. gingivalis* encontró una potencialidad normal en la respuesta de los fibroblastos, mientras que una exposición mas larga reduce significativamente ésta. Lo cual sugiere tolerancia, ésta a su vez juega un papel importante en la hiporespuesta observada clínicamente en pacientes. Informó que esa respuesta observada en fibroblastos del ligamento periodontal puede ser alterada in vitro por la adición de TNF- α a el medio de cultivo.²⁰ Sugiriendo que este aparente confluctuar de resultados obtenidos por diversos laboratorios puede representar una variabilidad en la respuesta de fibroblastos en periodonto enfermo y que estos puede tener un diferente nivel de reacción innato a LPS como resultado de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Establecer si los lipopolisacáridos estimulan la expresión de mensajeros intercelulares que activen la respuesta inflamatoria en fibroblastos gingivales humanos.

JUSTIFICACIÓN

Los procesos inflamatorios agudos del periodonto son una de las principales causas por las cuales los pacientes visitan el consultorio. La hiperemia pulpar, la gingivitis ulcero necrozante aguda (GUNA) y la alveolitis son procesos que se caracterizan por un dolor agudo insoportable. Al conocer la manera en que interactúan los LPS con las células las dosis (1mg/ml de LPS) y los tiempos (15 min.) a los que se activa la máxima respuesta de esta enzima (COX₂) podremos posteriormente buscar bloqueadores de estas vías que sean más efectivos y menos agresivos para los pacientes.

OBJETIVOS GENERALES.

- Determinar si es que se lleva a cabo la expresión de la enzima ciclooxigenasa COX₂ por medio de LPS en fibroblastos gingivales.
- Cuantificar la dosis a la que se lleva cabo la expresión de esta enzima.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Establecer si los lipopolisacáridos promueven la expresión de Ciclooxigenasa₂ (COX₂) en fibroblastos gingivales humanos en ensayos dosis-respuesta y curso temporal.
- Comprobar si la síntesis de mensajeros para estas enzimas es dependiente de la dosis y del tiempo por el tratamiento de los lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos.
- Determinar la actividad de la enzima mediante la producción de PGE₂ en fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacáridos.

HIPOTESIS.

El propósito de este estudio es la determinación de la producción de esta enzima. Si los lipopolisacáridos participan en procesos inflamatorios entonces el tratamiento con estas endotoxinas induce la expresión de genes mediadores de procesos inflamatorios en específico de la enzima ciclooxigenasa 2 en fibroblastos gingivales humanos, que en conjunto están íntimamente relacionados con las enfermedades periodontales.

Si la expresión de la enzima está condicionada a la concentración de LPS y el tiempo en contacto con el FGH entonces podremos observar la producción de ésta utilizando diferentes diluciones de LPS y marcándolos con anticuerpos anti-COX₂ para poder comprobar la inducción de la misma por el método de Western Blot.

La obtención de productos (RNA-m) derivados del tratamiento de fibroblastos gingivales humanos con LPS podrá ser amplificado y comprobado utilizando electroforesis para DNA en geles de agarosa.

El tratamiento de FGH con LPS activa mensajeros intracelulares tales como COX₂ las cuales producen productos finales como PGE₂ la cual podrá ser cuantificada por medio de la técnica de ELISA.

TIPO DE ESTUDIO

El ensayo que realizamos es del tipo experimental, prospectivo y comparativo.

MATERIALES.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Fibroblastos gingivales humanos.

Lipopolisacáridos aislados de *A. actinomycetemcomitans*.

MATERIAL

- Cajas petri
- Pipetas
- Tubos para centrifugar
- Micropipetas

EQUIPO.

- Agitadores
- Balanza. (OHAUZ)
- Baño a temperatura controlada. (Fisher)
- Cámara de Electroforesis vertical. (Hefter)
- Cámara de flujo laminar. (MAIRE)
- Cámara de revelado. (Farmacia)
- Espectrofotómetro. (LKB)
- Incubadora. (NUIARE)
- Microscopio de objetos invertidos. (Olympus)
- Multiscreen. (Bio-Rad)
- Orbit shaker. (Fisher)
- Pipetas. (Finepipette)
- Potenciómetro. (LKB)
- Termociclador. (Perkin-Elmer)
- Vortex. (Scientific Industries)

REACTIVOS

REACTIVO	MARCA O LABORATORIO
Acrilamida	Sigma
Agarosa	Sigma
Antibiótico antimicótico	Gibco
Anticuerpos para COX ₂	Santa Cruz Biotechnology
Azida de sodio	Gibco
Azul de bromofenol	Sigma
Bis-acrilamida	Sigma
Folin-fenol ciocalteuss	Sigma
Fosfato de sodio	Baker
Glicina	Baker
Hidróxido de calcio	Baker
Leche descremada	Nestle
Marcador de peso molecular	Sigma
Marcadores de peso molecular	Gibco
Medio de cultivo de Hanks	Gibco
Metanol	Baker
Nitroblue tetrazolium	Sigma
Persulfato de amonio	Sigma
Suero bovino fetal	Gibco
Sueroalbúmina de bovino	Sigma
Sulfato de cobre pentahidratado	Baker
Tartrato de sodio y potasio	Baker
Temed	Baker
Tripsina	Gibco
Trisma-base	Sigma
Tween	Sigma

METODOLOGÍA.

CULTIVO Y PREPARACION CELULAR. ANEXO 1

Para realizar este tipo de ensayo debemos recopilar los datos de nuestras pruebas en las cuales debemos tratar las células y prepararlas para el experimento.

Las condiciones deben ser óptimas para el buen manejo de nuestra prueba, y se deben cumplir con los siguientes requisitos.

La células deben estar subconfluentes (mínimo el 90%) y estar sincronizadas, esto lo haremos dejándolas en ayuno durante 24 horas para que al realizar el ensayo se encuentren en estado G-0.

Se colocaron 1×10^6 células en un volumen de 2 ml, en 12 cajas falco para cultivo celular.

Este es el primer paso y uno de los mas importantes ya que las condiciones en las que realizaremos el resto de las pruebas deberán contar con las mismas condiciones. Ya que el experimento se realizará por triplicado y de manera comparativa.

El siguiente paso es el de retar nuestras células con LPS de A.a. a diferentes concentraciones. El stock está a una concentración de 1mg/ml. disuelto en amortiguador de fosfatos-salino. ANEXO 2

Se coloca el LPS a las siguientes concentraciones:

- 1) 0.001 μg
- 2) 0.01 μg
- 3) 0.1 μg
- 4) 1 μg
- 5) 10 μg
- 6) 100 μg

Una vez realizadas las diluciones de la muestra de lipopolisacárido se retan los fibroblastos por el tiempo indicado y se lisan las células con triton al 10%. (Buffer de Lisis).

Se toman las muestras y se cuantifica proteína por el método de LOWRY. ANEXO 3

Una vez realizados los cálculos y conociendo la cantidad de proteína presente se toman los μl necesarios de muestra y se procesan para aplicarlos en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%.

La cantidad de proteína necesaria para correr una buena electroforesis es de $50 \mu\text{g}$.^{ANEXO 4} Al correr nuestra muestra colocaremos estos en el siguiente orden.

# CARRIL	MUESTRA
1	MARCADOR DE PESO MOLECULAR
2	CONTROL CON 24 HRS DE AYUNO
3	CONTROL + SBF 0.2%
4	LPS 1 mg
5	LPS 5 mg
6	LPS 50 mg
7	LPS 100 mg

El marcador de peso molecular nos permitirá identificar a COX_2 , cuyo peso molecular es equivalente a 82 Kdaltons.²¹ El tiempo de corrida es de 12 hrs / 20 milampères.

Se recupera nuestro gel y lo teñimos con coomassie 250 por 1 hr. Se destiñe nuestro gel y se observa el patrón obtenido.

OBTENCIÓN DE RNA-m DE FGH TRATADOS CON LPS.^{ANEXO 5}

La extracción de RNA se hace con una mezcla de tiocianato de guanidina, Fenol saturado, Acetato de sodio y β -mercaptoetanol. El RNA se obtiene al precipitar con isopropanol y se lava con etanol, las pastillas obtenidas se resuspenden en agua con dietilpirocarbonato y se cuantifican con un espectrofotómetro por medio del coeficiente 260/280. El RNA se analiza por electroforesis en geles de agarosa con formaldehído y su tinción con bromuro de etidio.

El ensayo de RT-PCR se deben disolver primero los oligonucleotidos de GADPH y COX₂.²¹

Se coloca en un tubo ependorf para amplificación los siguientes componentes para llevar a cabo la reacción:

Componentes	Volumen/50MI μ l	concentración final
2X mezcla de reacción	25 μ l	1 x
Templado de RNA	x μ l	2 μ g
Promer sense (10 μ l)	1 μ l	0.2 μ M
Antisense-Primer (10 μ l)	1 μ l	0.2 μ M
RT/Taq mix	1 μ l	-----
agua destilada	a completar 50 μ l	-----

Se agitan suavemente las muestra y asegurarse de que todos los componentes estén en el fondo del tubo de amplificación. Si no fuere el caso centrifugar suavemente.

Se colocan las muestras en el termociclador con los siguientes ciclos:

1. Correr 1 ciclo de 45-50°C por 30 min. (síntesis y pre-desnaturalización).
2. Correr de 35 a 40 ciclos a 94°C por 15 seg. (desnaturalización),
3. 55-60 °C por 30 seg. (Alineamiento).
4. 68-70 °C por 1 min. (Extensión).
5. 1 ciclo final de 72°C por 5 a 10 seg. (Extensión final).

El análisis de los productos amplificados se realiza en una electroforesis para DNA en gel de agarosa al 1 %.

La secuencia del oligonucleótido²² utilizado para la amplificación es la siguiente:

COX₂:

Sense: 5-TGCCCAGCTCCTGGCCCCGCCGCTT-3

Antisense: 5-GTGCATCAACACAGGCGCCTCTTC-3

GADPH:

Sense: 5-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3

Antisense: 5-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3

ENSAYO DE WESTERN BLOT. ^{ANEXO 7}

Para estudiar los efectos de lipopolisacáridos sobre la expresión de la COX₂, se sembraron fibroblastos gingivales humanos en cajas petri de 100 x 20 mm hasta confluencia. Se dejaron durante 24 horas en DMEM libre de suero bovino fetal y posteriormente se trataron con el lipopolisacárido a los tiempos y concentraciones indicadas. Al término de la incubación se retiró el DMEM y se lavaron las células durante tres ocasiones con buffer de fosfatos. Se tomaron las muestras de 2×10^6 células para hidrolizarlas en solución de Laemmli. (Tris pH 6.8, SDS 10%, glicerol 10% y azul bromofenol 0.1%) hirviéndolas durante 5 min y colocándolos en refrigeración durante 10 min. La muestras se someten a una electroforesis desnaturalizante al 10%. Al término las muestras se transfieren a una membrana de nitrocelulosa durante 12 horas a 20 mA. La proteína transferida en la membrana de nitrocelulosa se analizó con anticuerpos anti Cox₂ (Santa Cruz Biotechnologies) y se reveló por NBT-BCIP y quimioluminiscencia.

ENSAYO DE PGE₂:

Para el inmunoensayo se utilizó un kit de Life Tech. La muestra se cuantificó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, el ensayo se basó en la competencia entre PGE₂ y la PGE₂ marcada con la molécula de acetilcolinaesterasa por el sitio de asociación de anticuerpos específicos a PGE₂. Las muestras se leyeron a una absorbencia de 412 nm y el rango de concentración de la curva de calibración fue de 39 a 5000 pg/ml.

PRESUPUESTO.

El proyecto de investigación fue financiado por el responsable del Laboratorio de Bioquímica y el Proyecto PAPIIT IN 224398.

RESULTADOS:

Efecto del LPS sobre la transcripción COX_2 .

Con el propósito de establecer si los lipopolisacáridos inducen la expresión del gene a ciclooxigenasa tipo 2, los fibroblastos gingivales humanos se trataron con LPS ($1\mu\text{g/ml}$) por diferentes tiempos (Fig. 1). Nuestros resultados muestran que la máxima expresión de ciclooxigenasa se efectúa a los 15 minutos de tratamiento (305 pb) y posterior a este tiempo descubrimos que la expresión de este gene se ve disminuida.

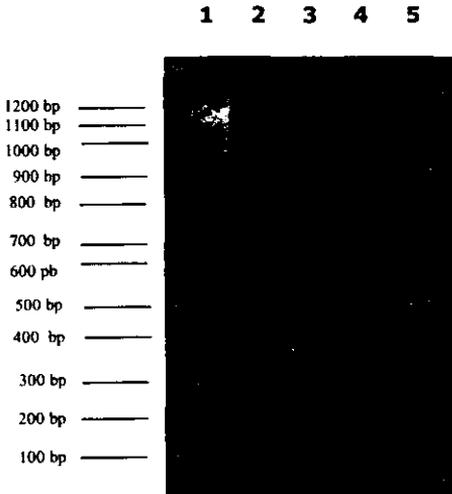


Fig. 1 Curso temporal de los productos amplificados por RT-PCR de GADPH y COX_2 . Se procedió a tratar las células en ausencia y presencia de LPS ($1\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos. Se aisló el RNA-m y se sometió a ensayo de RT-PCR por método de one-step. 1) Marcador de peso molecular; 2)Control; 3) 15 min; 4)30 min; 5)60 min.

A pesar de que la amplificación del gene a gliceraldehideido 3 fosfato deshidrogenasa se observa de igual intensidad decidimos así mismo correr un gel de agarosa al 1% a fin de observar el patrón del RNA total, en el gel encontramos que no se presentaban diferencias en el patrón de corrimiento entre la muestra control y las tratadas con lipopolisacárido por lo que se descartó la posible degradación del mismo (Fig 2).



1 2 3 4 5

Fig. 2 RNA total obtenido de fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron a semiconfluencia y se trataron en ausencia (1,5) y presencia de lipopolisacárido 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2,3) y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4). Al término de la reacción se extrajo el RNA total de estas células de acuerdo al método descrito por Chomczynski ²⁵. El experimento es el representativo de 3 ensayos individuales.

A fin de determinar la dosis máxima en la expresión de la enzima ciclooxigenasa en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS a diferentes concentraciones. Se realizó un ensayo dosis respuesta (Fig. 3), nuestros resultados muestran que la máxima expresión de COX₂ se produce al tratar a las células con LPS 10 µg/ml durante 15 minutos.

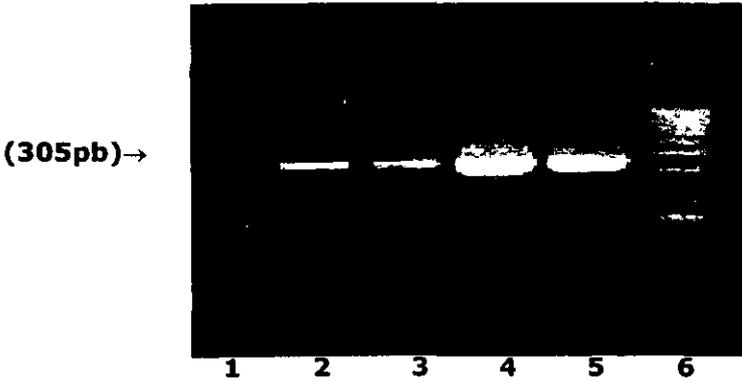


Fig. 3 Dosis Respuesta de la amplificación de Cox2 en fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacáridos.

Observamos la expresión de Cox₂ en el gel de agarosa en el cual las células fueron tratadas con 1) control, 2) 0.01 µg/ml, 3) 0.1 µg/ml, 4) 1.0 µg/ml, 5) 10 µg/ml 6) marcador de pares de bases. Este es un experimento representativo de 3 ensayos.

Cuantificación de proteína total.

Con el objeto de establecer si los transcritos de COX₂ se traducen en una enzima activa se procedió a realizar un ensayo western-blot utilizando para su identificación anticuerpos policlonales a esta enzima. Para el análisis, las muestras se corrieron en geles de acrilamida al 10% en presencia de SDS . En la figura 4 se muestra el patrón proteico de los fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS a diferentes tiempos, encontramos que el patrón de proteínas es idéntico en cada condición de tratamiento.

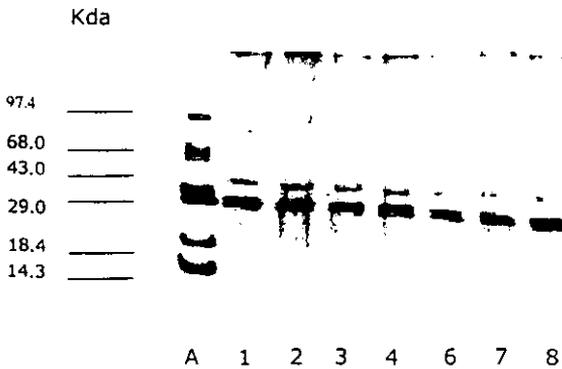


Figura 4. Electroforesis de lisado de fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS.

Se crecieron las células a semiconfluencia y se trataron con LPS 1 µg/ml a diferentes tiempos. Observamos que el peso aproximado de esta proteína es de 29 Kda. Se recuperaron las células 1×10^6 y se separaron en electroforesis desnaturizante. Se observa que la cantidad de proteína es la misma en los 8 carriles y es adecuada para empezar el ensayo de western blot. A) Marcador de peso molecular; 1) 15 min.; 2) 30 min.; 3) 60 min.; 4) 1:30 hrs.; 5) 3:00 hrs. 6) 6:00 hrs.; 7) 12:00 hrs.; 8) 24:00 hrs.

Efecto de los LPS sobre la traducción de Cox₂.

Mediante el análisis de Western blot para la identificación de Cox₂ en fibroblastos gingivales humanos, mostró que la expresión de Cox₂ se efectúa desde la dosis de 1µg/ml a las 24 hrs de tratamiento.

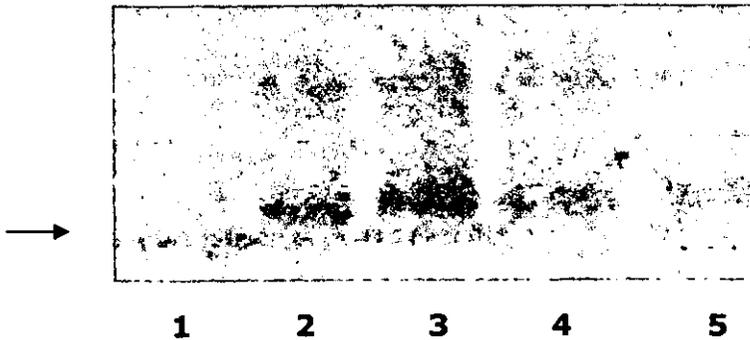


Fig. 5 Análisis de Western Blot de proteína Cox₂ en fibroblastos gingivales humanos, Se observa que el mayor incremento en la producción de este gene es a la concentración de 10 µg observando una disminución de esta a dosis mas bajas 1 µg. Podemos determinar que la respuesta a la expresión del gene no aumenta de manera proporcional a la dosis, en contraste a dosis mas altas la expresión es disminuida lo cual nos sugiere tolerancia a la concentración del LPS. **1)** control no hay expresión de Cox₂, **2)** 1 µg LPS, la expresión es positiva para los anticuerpos de Cox₂, **3)** 10 µg LPS, Expresión positiva y aumentada para anticuerpos de Cox₂, **4)** 50 µg LPS, la expresión se observa disminuida lo cual sugiere cierta tolerancia de los fibroblastos al tratamiento con LPS, **5)** 100 µg LPS, la respuesta ha disminuido en casi un 50% a altas concentraciones de LPS. **Flecha:** Cox₂

Efecto de los lipopolisacáridos sobre la producción de PGE₂ en fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron a semiconfluencia en cajas de cultivo de 96 pozos y se trataron a diferentes tiempos con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos. Nuestros resultados muestran que desde concentraciones de 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las células responden a la endotoxina bacteriana produciendo 20 $\text{pg}/0.1 \text{ ml}$ de PGE₂ a las 12 horas, aumento en la concentración de prostaglandina E₂ es del doble con respecto a la concentración basal.

La máxima producción se produce al tratar las células con el lipopolisacárido a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ el aumento en la producción es de 44 $\text{pg}/0.1 \text{ ml}$ a las doce horas de tratamiento (Fig.5).

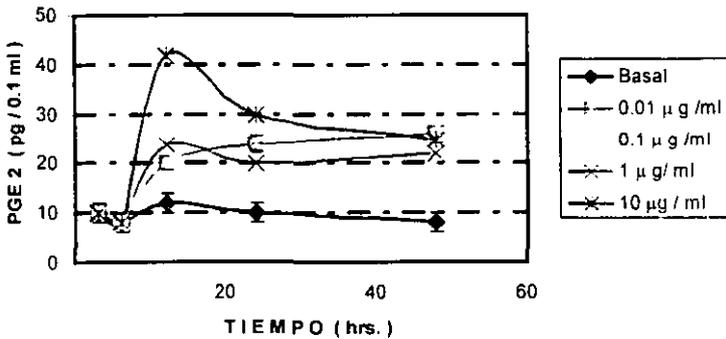


Fig.5 Efecto de los lipopolisacáridos sobre la producción de PGE₂ en fibroblastos gingivales humanos. Las células se crecieron a semiconfluencia y se trataron con diferentes dosis de lipopolisacáridos a diferentes tiempos. La placa se leyó a una longitud de onda de 412 nm y el rango de cuantificación del patrón fue de 39 a 5000 pg/ml .

Discusión.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo resulta interesante señalar que el LPS de *A. a.* es capaz de inducir la expresión del RNA-m de Cox₂ in vitro y en contraste a los investigadores predecesores se puede afirmar que los fibroblastos gingivales humanos son un buen modelo para estudiar las acciones de los LPS, sobre la expresión de mediadores de la inflamación y los efectos de ésta sobre las prostaglandinas.

Anteriormente Mitchell² menciona que la importancia de la activación de las prostaglandinas, vía Cox₁ o Cox₂ es diferenciada de acuerdo al estímulo que la activó. Bajo un estímulo psicológico la isoforma que está involucrada en la síntesis de prostaglandinas es la Cox 1, la cual esta ligada a receptores celulares como la bradicinina (Bk), mediante la vía de transducción de fosfoinosítidos-calcio. Este incremento de Ca²⁺⁺ activa directamente a la PLA₂ que sintetiza al ácido araquidónico desde los fosfolípidos de la membrana. El ácido araquidónico intracelular es metabolizado por Cox₁ para sintetizar el producto final de esta reacción, las prostaglandinas.

En contraste en condiciones inflamatorias, la activación de las ciclooxigenasas por citocinas o la estimulación vía LPS, actúan sobre la superficie de la célula causando la inducción de la isoforma Cox₂ y PLA₂ vía tirosinasa, bajo estas condiciones la inducción de Cox₂ y PLA₂ da como resultado un incremento en los niveles de prostaglandinas.

La evidencia de que la expresión de este gene esta ligado a una dosis-respuesta la observamos incubando las células y retándolas con diferentes concentraciones de LPS en contraste en los controles libres del mismo no existe un efecto y la expresión de la Cox₂ no esta presente.

Gary P. O Neill³ publicó que la expresión de isoformas de Cox₁ y Cox₂ son inducibles en diferentes tejidos humanos, mediante ensayos de Northern Blot y análisis de RT-PCR en las cuales observa que la isoforma que mejor se induce en tejido humanos es la isoforma Cox₂, encontrando altos niveles de esta enzima en próstata, estómago, útero, pulmón e intestino delgado entre otros y que la expresión de Cox₁ en comparación con Cox₂ se ve disminuída.

En cuanto a la expresión de RNA-m de Cox₂ en fibroblastos gingivales humanos observamos un barrido similar en nuestras muestras a lo largo del gel de agarosa en el cual podemos observar el producto aislado intacto .

La expresión de este gene es visible a dosis bajas (10 mg/ml) y la acción de ésta es producida en tiempos relativamente cortos (25 min).

Conclusión.

En resumen con los datos obtenidos de los experimentos realizados en este trabajo se concluye que los fibroblastos gingivales humanos pueden ser estimulados con LPS de A.a. y que la expresión de PGE₂ está ligada a la activación de la Cox₂.

Por otra parte la dosis máxima para la inducción de Cox₂ es de 50 mg/ml. De los experimentos en los cuales las células fueron pretratadas con LPS a diferentes tiempos la mayor expresión del gene de RNA-m de Cox₂ es a los 30 minutos .

Finalmente puede considerarse a los fibroblastos gingivales humanos como un buen modelo para estudiar las acciones de los LPS en procesos inflamatorios.

Las prostaglandinas , leucotrienos, tromboxanos y prostaciclina forman la familia de efectores celulares derivados del ácido araquidónico . Estas moléculas poseen una extraordinaria diversidad de funciones. Tabla 1. Así se ha determinado por medio de el ensayo de Western blot, RT-PCR y Elisa con la cuál podremos cuantificar la expresión final de la acción de la Cox₂ por la producción de PGE₂ en fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacáridos aislados de A. a.

Tabla I. Caracterización de los efectos biológicos de las prostaglandinas.

Efectos biológicos de la PGE₂	
1.	Inhibición de la agregación plaquetaria.
2.	Estimulación de la agregación plaquetaria.
3.	Regulación de transmisión nerviosa.
4.	Sensibilización frente al dolor.
5.	Mediación de la respuesta inflamatoria.

En cuanto a la expresión de RNA-m de Cox₂ en fibroblastos gingivales humanos observamos un barrido similar en nuestras muestras a lo largo del gel de agarosa en el cual podemos observar el producto aislado intacto .

La expresión de este gene es visible a dosis bajas (10 mg/ml) y la acción de ésta es producida en tiempos relativamente cortos (25 min).

Conclusión.

En resumen con los datos obtenidos de los experimentos realizados en este trabajo se concluye que los fibroblastos gingivales humanos pueden ser estimulados con LPS de A.a. y que la expresión de PGE₂ está ligada a la activación de la Cox₂.

Por otra parte la dosis máxima para la inducción de Cox₂ es de 50 mg/ml. De los experimentos en los cuales las células fueron pretratadas con LPS a diferentes tiempos la mayor expresión del gene de RNA-m de Cox₂ es a los 30 minutos .

Finalmente puede considerarse a los fibroblastos gingivales humanos como un buen modelo para estudiar las acciones de los LPS en procesos inflamatorios.

Las prostaglandinas , leucotrienos, tromboxanos y prostaciciinas forman la familia de efectores celulares derivados del acido araquidónico . Estas moléculas poseen una extraordinaria diversidad de funciones. Tabla 1. Asi se ha determinado por medio de el ensayo de Western blot, RT-PCR y Elisa con la cuál podremos cuantificar la expresión final de la acción de la Cox₂ por la producción de PGE₂ en fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacáridos aislados de A. a.

Tabla I. Caracterización de los efectos biológicos de las prostaglandinas.

Efectos biológicos de las PGE₂	
1.	Inhibición de la agregación plaquetaria.
2.	Estimulación de la agregación plaquetaria.
3.	Regulación de transmisión nerviosa.
4.	Sensibilización frente al dolor.
5.	Mediación de la respuesta inflamatoria.

BIBLIOGRAFIA.

1. HELMUT BRADE "Endotoxin in Health and Disease". 10a. Edición E.U.A. 1999. Editorial DEKKER.
2. JANE A. MITCHELL, SIMON LARKIN. Cyclooxygenase-2 Regulation and relevance in inflammation. Biochemical pharmacology Vol. 50 No. 10 pp. 1535-1542. 1995.
3. GARY P. O NEILL. "Expression of mRNA for Cyclooxygenase 1 and Cyclooxygenase 2 in human tissues". FEBS; Volumen 330, Numero 2 156-160. 1993.
4. GOULD T.R.L. Ultrastructural characteristic of progenitor cell population in the periodontal ligament. J. Dental Res. 62: 873-876.1983.
5. BERNICH Y GRANT D. A. Lymphatic vessels in healthy and inflamed gingiva. J. Dent. Res 57: 249, 1978.
6. KURIHARA Y ENLOW D. H. A histochemical and electron microscopic study of an adhesive type of attachment of collagen fibrils on to resorptive surface of alveolar bone. Am. J. Orthod. 77. 536- 546. 1980.
7. LISTGARTED M.A Y KAMIN A. The development of a cementum layer over the enamel surface of rabbits molars. A light and a electron microscopic study. Archs Oral Bio 14: 961-985 1969.
8. JONES. S. J. Cement In: Osborn J.W. Dental Anatomy and embryology . Blackwell Scientific. Pp. 193-205-286-294. 1981.
9. CARRANZA FERMIN A. Periodontología Clínica de Glickman. México 1987. Tercera Edición. Editorial Interamericana.
10. Gutiérrez Venegas Gloria, Peña Parraga Mauricio y Flores Lides Armando. "Los lipopolisacáridos como promotores de procesos inflamatorios en cavidad oral. Lab. Bioquímica. División de estudios de posgrado de la Facultad de Odontología. Boletín de Educación Bioquímica. En proceso. 2001

11. SUGIYAMA A, ARAKAKI R, ONSHI T, ARAKAKI N, DAIHUHARA Y, TAKADA H. (1996). Lipoteichoic acid and Interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblast in culture. *Infect Immun* 64 1426-1431. 1996.
12. MORRISON DCM, RYAN JL, Eds. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*. Vol I Boca Raton CRC Press. 1992
13. ROMAN ALVARES PATRICIA. TESIS. "Aislamiento de LPS de A.a." Facultad de Química. UNAM. En proceso.
14. SUGIYAMA A, ARAKAKI R, OHNISHI T, ARAKAKI N, DAHIKUHARA Y. Lipoteichoic acid and Interleukin-1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) In Human Gingival Fibroblast in culture. *Infect Immun* 64: 1426-1431. 1996
15. DARVEAU RP, BELTON CM, REIFE RA. Local chemokine gene expression in human periodontal ligament fibroblast stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun*. 66:1660-1665. 1998
16. OGAWA T, OZAJAI A, SHUMAUCHI H, UCHIDA H. Hyporesponsiveness of inflamed human gingival fibroblast from patients with chronic periodontal diseases against cell surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 18: 17-30. 1997
17. KOKA S, MAZE C, REINHART R, DYER J. Variability of inflammatory mediator production by human periodontal fibroblast stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *In vitro Cell Dev Biol*. 32: 528-530. 1996
18. REIFFE R. "Endotoxin in Health and Disease". 10a. Edición E.U.A. Editorial DEKKER. 1999.
19. WATANABE A, TAKESHITA A, KITANO S, HANASAWA S. CD14 mediates signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblast. *Infect Immun* 64:448-449. 1997
20. QUINTERO JC, PIESCO NO, LANGKAMP HH, BOWEL L, AGARWAL S. LPS responsiveness in periodontal ligament cells is regulated by tumor necrosis factor. *J Dent Res* 74: 1802-1811. 1995
21. SantaCruz Biotechnology Inc. Research antibodies 97-98

22. GIBCO BRL. Random Primers DNA Labeling System.
23. Brill M and Björn H : Passage of tissue fluid into human gingival pockets, *Acta Odontol Scand* 17 :11, 1959.
24. BRILL N AND BRÖNNESTAM R : Immuno-electrophoretic study of tissue fluid from gingival pockets, *Acta Odontol Scand* 1895,1960.
25. CHOMCZYNSKY, P AND SACCHI, N. *Anal. Biochem*, 162, 156. 1987.
26. EGELBERG J : Blood vessels of the dento-gingival junction, *J Periodontol* 1 :163,1996.
27. GOTTLIEB B : Histologic consideration of the supporting tissues of the teeth, *J Am Dent Assoc* 30 1872,1943.
28. LÖE H, THEILADE E, AND JENSEN SB : Experimental gingivitis in man, *J Periodontol* 36 :177,1965.
29. PAGE R et al "Collagen fiber bundles of the normal marginal gingiva , *Arch Oral Biol* 19 :1039, 1974.
30. REVERT S AND EGELBERG J "Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid conditioning of the root surface, *J Clin Periodontol* 8 :459, 1981.
31. RITCHEY B AND ORBAN B : The crests of the interdental alveolar septa. *J Periodontol* 24 :75, 1953.
32. SELVING KA et al : An ultrastructural study of cementum formation. *Acta Odontol Scand* 22 :105, 1964.
33. TOONEY NM et al "solution and surface effects on plasma fibronectin structure, *J Cel Biol* 97 : 1686, 1983.
34. BRUCE A. WHITE. PCR PROTOCOLS Current Methods and Applications. HUMANA PRESS. Totowa, New Jersey 1993.
35. LEHNINGER "Principios de Bioquímica". 2a. Edición. Editorial OMEGA. Barcelona, España. 1993.
36. VOET. "Biochemistry". 3a. Edición. Editorial Jhon Wiley & Sons. Canada, 1990.

37. CHRISTOPHER D. BREDER "Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide.. Brain Research. 713 64-69.1996
38. AINAMO J AND LÖE H : Anatomical characteristics of gingival . I. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. J Periodontol 37 :5, 1996.
39. BECKS HV : Normal and pathologic pocket formation, J Am Dent Assoc 16 :2167, 1929.
40. BERNICK S : Inervation of the teeth and periodontium, Kent Clin North Am, p 503, July 1959.
41. BOYKO GA, MELCHER AH, AND BRUNETTE KM : formation of new periodontal ligament, by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro, J Periodont Res 16 :73, 1981.
42. Chunyu Cao, Kiyoshi Matsumara. "induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. BRAIN RESEARCH 697 187-196. 1995
43. MAKIO HAYAKAWA. Col. Role of ceramide in Stimulation of the Transcription of Cytosolic Phospholipase A2 and Cyclooxygenase 2. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 220, 681-686, 1996.
44. MORRISON DC. RYAN JL. eds. Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides. Vol.1 Boca Raton: CRC Press, 1992.
45. GALANOS C, LUDERITZ O, RIETSCHEL E, WESTPHAL O. Newer aspects of the chemistry and biology bacterial lipopolysaccharides. In: Goodwin T, De. Biochemistry of Lipids Baltimore: University Park Press, 239-335. 1977
46. MASHIMO J, MICHAIKO Y, IKEUCHI K. HATA S. Fatty acid composition and Schwartzman activity of lipopolisaccharides from oral bacteria. Microbiol Immunol 29(5): 395- 403.1985
47. SILVIA ALVARES. SÉRGIO ALVARES. Diagnóstico y tratamiento del traumatismo Dental. Actualidades Médico Odontológicas Latinoamerica C.A. Colombia. 1997.

ANEXO 1

AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.

1. Después de realizar el explante se obtiene una muestra de tejido y se coloca en solución de Hanks (Solución salina con Ab-Am al 1 %)
2. Se realiza el raspado del tejido sano (encia) colocándolo en una caja petrí y se corta el tejido tratando de hacerlo lo más delgado posible.
3. Se coloca el tejido en tubo para centrifugar de 15 ml. y se adicionan 2,5 ml de solución de Hanks.
4. Se centrifuga por 90 seg. Y se extrae el sobrenadante.
5. Se coloca 2,5 ml de solución de Hanks y se repite la operación mínimo 3 veces.
6. Se extrae el sobrenadante y se coloca 1 ml de tripsina.
7. Se incuba por 20 min en baño maria y se colocan 2ml de DMEM con SBF para detener la reacción de la tripsina, y se resuspende con DMEM,
8. Se centrifuga durante 2 min.
9. Se agregan 2 ml de DMEM y se resuspende la muestra.
10. Se deja sedimentar y se recupera el sobrenadante, ya que en éste se encuentran los fibroblastos.
11. Se deja sedimentar y se siembran en una caja falco.
12. Se incuban a 37 °C y se etiqueta con la fecha.

ANEXO 2

CONCENTRACION DE LIPOPOLISACÁRIDO PARA OBTENCIÓN DE RNA- m de Cox₂

MUESTRA	CONCENTRACION
1	CONTROL
2	100 µg
3	50 µg
4	10 µg
5	1 µg
6	0.1 µg

ANEXO 3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY.

Solución A: 2 % de Carbonato de sodio
0.4% de Hidróxido de sodio
0.02 % de tartrato de sodio

Solución B: 0.5 % de sulfato de cobre pentahidratado.

Solución C: 50 ml de sol. A y 1 ml de sol. B.

Solución D: Folin-Fenol y agua 1:1

Añadir 0.2 ml de muestra y un ml de sol. C esperar durante 10 min. Agregar 0.1 ml de Sol. D y esperar 30 min. Leer en espectrofotómetro a 660 nm.

Curva patrón se utiliza una solución stock de suero albúmina de bovino a una concentración de 1 mg/ml.

Después de realizar esta técnica se interpolan los valores en una gráfica o se lleva a cabo una regresión lineal para cuantificar nuestras lecturas y determinar así nuestra cantidad de proteína.

La técnica de determinación de proteínas de Lowry, consiste en utilizar una solución alcalina (sol A), formando un complejo con la proteína. Este complejo reduce un grupo fosfomilídico a fosfogustato dando como resultado un color azul intenso. A mayor cantidad de proteína mayor coloración.

Las variables en la utilización de esta técnica son: el tiempo, la técnica es sensible a cambios iónicos y la presencia de mercaptanos puede hacer variar o dar resultados erróneos.

ANEXO 4

ELECTROFORESIS

Se preparen geles de poliacrilamida para correr las muestras de los fibroblastos retados con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos y se colocan los marcadores de peso molecular; lo que esperamos ver es la expresión de la Cox₂ con un peso molecular de 82 k^(v)

Se dejan correr las muestras por todo el gel (12 hrs /20 miliamperes) y se tiñen con azul de coomasie. Para proceder a realizar la transferencia de proteínas del gel a el papel de nitrocelulosa.

Para realizar una buena electroforesis necesitamos cuando menos 50 microgramos de proteína para poder realizarlo. Para el Western Blot necesitamos 100 microgramos.

Se colocan las muestras en geles desnaturizantes al 10% y se utilizan marcadores de peso molecular se toma la muestra y se colocan 10 microlitros de azul de Coomasie. Se colocan las muestras

TESTIGO DE PESO MOLECULAR PARA ELECTROFORESIS.

PROTEÍNA	REPORTE (Peso mol.)	APARENTE (Peso Mol.)
Lysosime	14,300	14,690
B-Lactoglobulina	18,400	19,200
Anhidrasa carbónica	29,000	28,410
Ovalbúmina	43,000	43,935
BSA	68,000	67,270
Fosforilasa B	97,400	97,145
Miosina	200,000	197,605

ANEXO 5 AISLAMIENTO DE RNA

Reactivos y equipo.

Tratar el agua durante 24 hrs. con DEPC (1 ml por cada litro de agua) y esterilizar.
Todas las soluciones se preparan con agua tratada de acuerdo al renglón anterior.

Solución D

Acetato de sodio tri-hidratado . 2M

Pesar 27.2 gr de acetato de sodio tri-hidratado

Disolver en 20 ml de agua tratada con DEPC ajustar el pH a 4.0 con ácido acético
glacial aproximadamente 80 ml y aforar a 100 ml Esterilizar.

Componentes de la solución D

5 ml. de Tiocianato de Guanidina 4 M

5 ml de fenol saturado (Parte inferior del frasco)

0.5 ml de acetato de sodio 2M pH 4.0

180 µl de β-mercaptoetanol.

Esta solución se puede utilizar durante las primeras 48 hrs.

ANEXO 6 RT-PCR.

La técnica de PCR es la síntesis enzimática que se utiliza para amplificar secuencias de ADN específicas en este caso la secuencia de COX₂; la técnica de PCR es la síntesis enzimática que se utiliza para amplificar secuencias de ADN específicas en este caso la secuencia de COX de los "primers" y finalmente la extensión de los primers a 72°C que dará como resultado 2 moléculas idénticas del ADN blanco. De ahí que el número de moléculas de ADN se incrementa geométricamente después de cada ciclo. Un promedio general para obtener suficiente ADN blanco es de 40 ciclos.³

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

El Método de PCR se basa en tres pasos básicos para la síntesis de cualquier DNA:

1. Desnaturalización de la hebra de DNA en una sola
2. Análisis de los primers de la hebra para la síntesis de su complementaria
3. Extensión de la nueva hebra de DNA a partir de los primers.

La técnica para elaborar este proyecto se basa en la síntesis repetida de ADN. Con el descubrimiento de un ADN termoestable (polimerasa) ha dado a los científicos una técnica muy poderosa conocido como reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), esta tiene como base tres pasos simples, los cuales se requirieren para cualquier reacción de Síntesis de ADN: 1) la desnaturalización de la plantilla en hebras únicas, 2) de a cada hebra original para la síntesis nueva de hebra; y 3) Extensión de las hebras nuevas de ADN apartir del molde existente.

Estas reacciones pueden efectuarse con cualquier ADN y resulta en la síntesis de porciones definidas del ADN original. La secuencia sin embargo, a fin de la prueba asciende a más de un ciclo de síntesis, las plantillas deben nuevamente ser desnaturalizadas, ya que requieren de temperaturas muy altas que inactivan a la mayoría de las enzimas. Por lo tanto, los intentos iniciales en la síntesis cíclica de ADN son efectuados agregando polimerasa fresca después del paso de desnaturalización. La utilización de una técnica para descargas repetidas de síntesis de ADN.

El costo de tal protocolo llega a ser tan alto que es rápidamente prohibitivo. Con el descubrimiento de un ADN estable aislado de una bacteria termofílica (TAQ), permite sintetizar una nueva trenza de ADN rápidamente. Este es amplificado de manera exponencial tomando una región definida del material, con esto nace una nueva tecnología.

Desde el descubrimiento de las enzimas de restricción esta nueva técnica ha revolucionado la biología molecular. Hay centenas de artículos publicados en donde se utiliza la técnica de PCR la cual utilizaremos en este estudio.

ANEXO 7

ENSAYO DE WESTERN BLOT.

Las variaciones del método de Southern blotting son conocidas como Western transfer y Northern transfer, quienes detectan respectivamente RNA y proteínas. En el Northern blot el RNA es inmovilizado en papel de nitrocelulosa y detectado a través del uso del RNA o DNA complementario radiomarcado. En el Western blot, la mezcla de proteínas es transferida a papel de nitrocelulosa y las proteínas específicas identificadas por su transferencia de anticuerpos contra ellos. La nitrocelulosa de cualquier modo afianza a las proteínas tenazmente que en algunos casos esto puede interferir con su identificación inmunológica.

En algunos casos el papel de nitrocelulosa puede ser remplazado con papel con grupos derivados de diazobenzoyloxymethyl, el cual reacciona con los grupo amino de las proteínas covalentemente al papel.

1. Hidratar la nitrocelulosa en agua introduciendo la membrana en una inclinación de +5° (no mojarla de golpe por que no se hidrata).
2. Después se equilibra en el buffer de transferencia (5 min).
3. El gel se equilibra en buffer de transferencia 30 min para enviar que cambie el tamaño durante la transferencia.
4. Se coloca en la cámara de transferencia a:
 - 60 mA por 12 horas
 - 40 mA de 4-8 horas
 - 100 Volts por 1 hora.

**ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Se coloca la nitro en el multiscreen y se coloca el primer anticuerpo (500 microlitros por pozo). 8 horas a 4 grados centigrado o 4 horas a temperatura ambiente. El control de la temperatura es importante ya que el anticuerpo esta colocado en la solución y puede desnaturalizarse. El anticuerpo está diluido 1: 1000. La solución queda de la siguiente manera:

5% de leche

0.2% de Tween.

0.02 % de ácido de sodio en PBS 1X

Se coloca 1 ½ a 2 horas o toda la noche a 4 grados centigrados.

Terminado esto se debe lavar por lo menos 3 veces 5 min en Tween 0.05%-PBA 1X, antes de colocar el segundo anticuerpo.

Se coloca el segundo anticuerpo de la siguiente manera:

*0.01 % de leche

* 0.05 % de Tween

* 10 ml de PBS 1X

La función del segundo anticuerpo es la de visualizar la reacción acoplada de COX₂ y ésta se puede llevar a cabo por: Peroxidasa, Fosfatasa o Quimioluminiscencia.

En esta última se realiza con una película de rayos X para poder registrar la reacción.