

952



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

## ACCIÓN DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS EN LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE PDK 1-B EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS

**T E S I S**  
DE INVESTIGACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
CIRUJANO DENTISTA  
P R E S E N T A  
**SERGIO OROZCO PEÑA**

DIRECTORA:  
DRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS



MÉXICO, D.F.

2002.  
TESIS CON  
FALDA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MI ALMA MATER:**

Universidad Nacional Autónoma de México  
Por haberme permitido desarrollar ese  
cariño hacia lo que soy y  
puedo ser profesionalmente.

### **A DIOS:**

Que aunque sabe que no me acuerdo de él mucho  
sabe que se encuentra en mi corazón siempre.

### **ESPECIALMENTE:**

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.  
Por su infinita paciencia, preocupación, capacidad  
y deseos de sobresalir siempre que  
terminan por ser altamente contagiosos.

### **A PERLA, RAMIRO, BLANCA, ARMANDO, MIGUEL, YURIA, CARLOS Y LOS QUE EN SU MOMENTO:**

Me brindaron su apoyo para la realización  
de ésta investigación.

### **AL JURADO:**

Por sus consejos, comentarios y tiempo  
para la revisión del trabajo.

### **A MI FAMILIA:**

Por su confianza, apoyo y cariño.

### **A JAZZ, MIROS, JULIAN, PERLA, NANCY, ROSY, RUBÉN, RICARDO, RAMIRO:**

Por brindarme su amistad, confianza y amistad.

### **A MIS PROFESORES:**

Arturo, Gabriel, Fabiola, Carlos, Gloria, Jose Luis, Víctor, Tatiana, Sara, por  
compartir sus conocimientos y su amistad.

### **A TODO AQUEL:**

Que se ha cruzado en mi camino, y que ha contribuido a  
moldear lo que hoy soy.

## **DEDICATORIA**

La tesis y mi carrera van dedicados a los que siempre han estado conmigo soportandome, ayudandome y lo principal brindandome su amor.

### **A TI MINI:**

Por enseñarme el significado de la palabra amor, que se refleja en ti en todo momento, por los días que lloramos juntos, Por tu sacrificio y principalmente por amarme de esa forma. Recuerda que eres mi heroína y mi ejemplo. ¡Gracias por ser mi Madre Rosita!.

### **A TI NEGRO:**

Por ser mi Robin, por entender y apoyar mis locuras, por ser mi compañero, mi amigo, y mi cómplice. Por tu amor. ¡Gracias Gabriel!.

### **A TI PONY:**

Por tus consejos, tu preocupación, tu tolerancia, por soportar los abusos; por ser mi chiquito. También por tu Amor. ¡Gracias Luis!

### **A MI PADRE:**

Porque sin su apoyo, no hubiera sido posible la conclusión De mi carrera profesional, por su cariño oculto, por brindarme la oportunidad de desarrollarme como profesional. ¡Gracias Enrique!

**A MI ABUELA CARMELITA, MI ABUELO JESUS y, MI HIJA.**

**A MIS AMIGOS.**

**“Porque sin su amor no hubiera sido posible realizar mi sueño”**

## JURADO ASIGNADO

**Presidente:**

**Vocal:**

**Secretario:**

**1er. Suplente:**

**2do. Suplente:**

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica, de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología. U.N.A.M. bajo la tutoría de la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

**Directora:**



---

**Dra. Gloria Gutiérrez Venegas**

**Sustentante:**

---

**Sergio Orozco Peña**



## ÍNDICE.

1. Resumen .....	2
2. Introducción .....	3
3. Antecedentes .....	5
3.1. Lipopolisacáridos como mediadores de procesos inflamatorios ..	6
3.2. Biosíntesis del Lípido A .....	6
3.3. Biosíntesis del Polisacárido central .....	8
3.4. Biosíntesis O- Polisacárido .....	8
3.5. Estructura .....	9
3.6. Función .....	10
3.7. Mecanismos de Acción .....	11
3.8. Receptores .....	11
3.9. Señalización celular .....	13
3.10. Expresión de genes .....	13
3.11. Efectos en el parodonto .....	14
3.12. Células epiteliales .....	14
3.13. Fibroblastos .....	15
4. Generalidades .....	16
4.1. PDK-1 .....	16
4.2. AKT/PKB .....	17
4.3. GSK - 3 .....	19
4.4. $\beta$ - Catenina .....	20
5. Planteamiento del problema .....	23
6. Justificación .....	24
7. Objetivos .....	25
8. Hipótesis .....	26
9. Materiales .....	27
10. Métodos .....	28
10.1. Cultivo de fibroblastos gingivales humanos .....	28
10.2. Tratamiento celular .....	28
10.3. Extracción de proteínas nucleares .....	29
10.4. Análisis de western blot .....	29
11. Resultados .....	30
12. Discusión .....	34
13. Conclusión .....	36
14. Bibliografía .....	37
15. Anexos .....	43



## 1. RESUMEN

Los LPS son moléculas que encontramos como un componente de la pared bacteriana de microorganismos gram-negativos y son capaces de activar diferentes vías de transducción por sí mismas o por la unión con otras proteínas formando complejos, de esta forma se asocian a receptores que se localizan en la membrana celular produciendo una señal hacia el interior y de forma descendente hasta llegar a la respuesta celular.

Estas señales de transducción van activando rutas principales de respuesta del metabolismo celular esto es de gran importancia e interés debido a que todavía está por descubrirse de que forma la célula interpreta las señales activadas por factores propios del metabolismo del organismo y las endotoxinas. Es posible que exista alguna diferencia en la cantidad de receptores que son activados, y que de esta forma exista en el interior señalización cruzada que produzca la diferencia en la respuesta celular. La capacidad de promover procesos inflamatorios es bien conocida y la forma en que los fibroblastos gingivales humanos responden es desconocida. El motivo del siguiente trabajo consistió en demostrar si existe activación de la ruta de Pdk-1 hasta la movilización al núcleo de  $\beta$ -catenina lo que significa la existencia de transcripción de genes en respuesta a los LPS.

Nuestros resultados muestran que los lipopolisacáridos inducen la translocación de  $\beta$ -catenina desde los 30 minutos de tratamiento y la translocación de PDK1 a los 15 minutos de tratamiento por otra parte encontramos que GSK3 se fosforila desde los cinco minutos de tratamiento.



## 2. INTRODUCCIÓN

El lipopolisacárido (LPS) de los microorganismos gram-negativos es el más conocido de todos y es un componente vital de la pared celular de estas bacterias, en particular la molécula "lípidio A" de éste, que es la verdadera fracción antigénica capaz de inducir la producción de interleucina 1 (IL1), factor de necrosis tumoral (FNT), interferón  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), inhibidor del plasminógeno, factor hístico de adhesión, y prostaglandinas (PG). La porción lipídica de los lipopolisacáridos es dañina para el organismo humano y de otros animales, ya que se consideran agentes causales del choque séptico.

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

Entre las bacterias gram-negativas que presentan en su pared celular lipopolisacáridos podemos mencionar a *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, entre otras; los LPS de estas bacterias presentan muy poca variabilidad estructural de una especie a otra, pero para la realización de este estudio se ha trabajado con los LPS de la bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que para nuestro interés algunos autores e investigadores han mostrado que es la bacteria principal en la Periodontitis Juvenil localizada.



UNIVERSIDAD DE  
EL PACÍFICO  
VALPARAÍSO

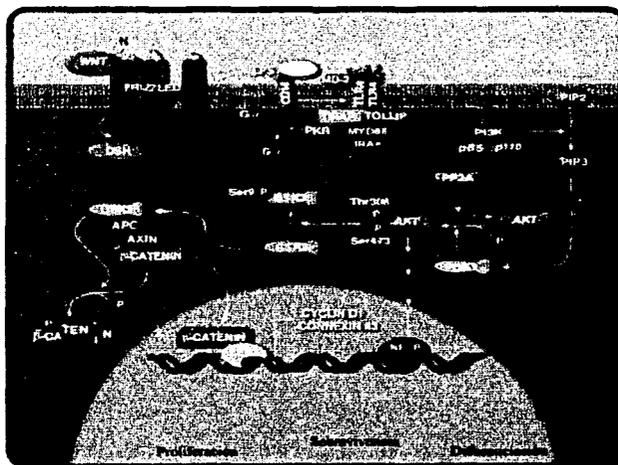


En Investigaciones recientes realizadas en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Odontología se ha demostrado la activación de la enzima Akt(16) en fibroblastos gingivales humanos, es por esto que el propósito de este estudio es seguir investigando esta vía ya que por medio de la fosforilación de Akt puede darse la activación y/o inactivación de otras enzimas o factores de transcripción (GSK-3,  $\beta$ -Catenina) que alteran las actividad sintética de las células además de ser las moléculas mediadoras de la transducción de los LPS.

### 3. ANTECEDENTES

Hunninghake y cols. (5) reportaron que los lipopolisacáridos activan a PDK-1 y AKT vuelve inactivo a GSK-3 y evaluaron observando la acumulación nuclear de  $\beta$ -Catenina. Estos estudios fueron realizados en macrófagos de los alvéolos pulmonares. Por otro lado, mencionan que los LPS activaron a genes que son dependientes en la actividad de  $\beta$ -catenina.

#### Modelo sobre la vía de transducción de PDK-1.



**Fig. 1 Mecanismos de Transducción de la Vía de Señalización de AKT**

En la figura se muestra que en macrófagos alveolares la activación del receptor TLR-4(5) conduce a la activación de la cinasa PI3k ( Fosfatidilinositol-3 –cinasa) lo que conlleva a la síntesis de PIP3, induciendo la activación y translocación de PDK1 lo que conduce a la fosforilación de AKT, que en su forma fosforilada fosforila a GSK3 y a la translocación de  $\beta$ -catenina. En el núcleo  $\beta$ -catenina promueve la expresión de ciclina D1 y conexina A3, con lo que se promueve la expresión de genes y la supervivencia, proliferación y diferenciación celular. (tomado de Biocarta)



### 3.1. LIPOPOLISACÁRIDOS COMO MEDIADORES DE PROCESOS INFLAMATORIOS.

El lipopolisacárido (LPS) de los gérmenes gram negativos es un componente vital de la pared celular de estas bacterias, la molécula del lípido A" es la verdadera fracción antigénica capaz de inducir la producción de interleucina 1 (IL1), factor de necrosis tumoral (FNT),  $INF\gamma$ , inhibidor del plasminógeno, factor hístico de adhesión y prostaglandinas (PG). Se han estudiado también otros componentes de la pared bacteriana como el peptidoglicano, muy relacionado con citotoxicidad y edema cerebral, y el ácido murámico característico de los gérmenes gram positivos, que tienen un alto poder inductor como mediadores proinflamatorios( 3).

Estudios en los que se utiliza análogos del lípido A han demostrado, que al modificar esta estructura, se afectan las actividades endotóxicas. También se ha demostrado, que la remoción de una cadena de ácido graso o la modificación de alguno de los grupos fosfato, promueve la alteración de las actividades pirogénicas, sin embargo la inducción de la síntesis de interleucinas es menos estricta en cuanto a los requerimientos estructurales. Se ha establecido del mismo modo, que moléculas de LPS estructuralmente diferentes de la cavidad oral tienen una actividad biológica alterada. Los LPS obtenidos de *Porphyromonas gingivalis* son menos potentes que los LPS de *Escherichia Coli* porque carecen del grupo 4-fosfato. Sin embargo los LPS de *A. actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *E. corrodens* y *Fusobacterium nucleatum* presentan actividades similares a los de *Escherichia coli*( 2).

### BIOSÍNTESIS.

#### 3.2. BIOSINTESIS DEL LÍPIDO A

La mayoría de las actividades biológicas de los LPS se atribuyen a la región del lípido A, debido a que posee actividad endotóxica por sí mismo. El lípido A ancla al



LPS a la membrana celular. La estructura básica del lípido A es común entre bacterias gram negativas, incluyendo enterobacterias, neisserias, pseudomonas y otras que presentan propiedades endotóxicas.

Recientemente se descubrieron varias enzimas en *Escherichia coli* capaces de convertir a los siguientes precursores UDP, GlcNAc, R-3-hidroximiristoil-ACP, ATP, CMP, KDO, lauroil-ACP y miristoil-ACP en Re LPS(4) y se han encontrado enzimas similares entre varios gram-negativos patógenos.

El primer paso en la biosíntesis de la endotoxina es la acilación de la UDP-GlcNAc con R-3 hidroximiristato, catalizado por la proteína codificada en el gen *lpxA*. UDP-GlcNAc está situado en un punto de bifurcación en el camino metabólico, puesto que también se utiliza para la biosíntesis de peptidoglicano. R-3-hidroximiristoil-ACP, localizado en otro punto de bifurcación, puede ser elongado a palmitoil-ACP e incorporado a los glicerofosfolípidos. Se han observado al menos 2 genes para la biosíntesis de ReLPS (*lpxA* y *lpxB*), los cuales están contenidos en un operón en el cromosoma de *Escherichia coli*.

UDP-3-O-(R-3-hidroximiristoil)-GlcNAc es desacetilado y luego es N-acilado con un segundo R-3-hidroximiristato, generando al nucleótido UDP- 2,3-diacilglucosamina. Tanto O- como N- aciltransferasa exhiben una especificidad muy precisa por el R-3-hidroximiristato.

UDP-2,3-diacilglucosamina es el precursor inmediato para la unidad no reductora de lípido A, pero una parte es unida por una pirofosfatasa específica para generar una molécula muy inestable que ha sido designada como lípido X, el cual es el precursor directo del extremo reductor del lípido A. El producto del gen *lpxB* cataliza la formación de disacárido(8), y después una cinasa específica incorpora al 4'-monofosfato, generando al lípido A, un Intermediario que posee algo de bioactividad, por lo cual tiene utilidad en la detección de proteínas receptoras de endotoxina en células animales.



Antes de que se complete el lípido A, la enzima codificada por el gen *kdtA* incorpora dos residuos de KDO estereoquímicamente distintos. Finalmente se incorpora un residuo de laureato y uno de miristato al extremo no-reductor del lípido A.

Se desconoce el mecanismo por medio del cual el LPS se exporta desde su sitio de biosíntesis en la superficie interna de la membrana interna hacia la superficie externa de la membrana externa.

Las variaciones menores en la estructura del lípido A modifican sus señales biológicas. La remoción de todos los ácidos grasos resulta en la pérdida completa de actividad biológica. También, la ausencia de solo uno de los grupos fosfatos, ya sea en C1 o C4, resulta en la pérdida significativa de toxicidad.

### **3.3. BIOSÍNTESIS DEL POLISACÁRIDO CENTRAL**

Esta porción une al lípido A con el O-polisacárido. Es menos variable entre géneros y especies que el O-polisacárido que está compuesto por 5 azúcares: un amino azúcar (N-acetilglucosamina), glucosa, galactosa, L-glicerol-O-manoheptosa, y la octosa 2 ceto-3-desoxioctonato (KDO). El polisacárido central se separa en área interna y área externa. El área interna contiene heptosa, fosfato y ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), el cual está unido covalentemente al lípido A por uniones cetosídicas ácido-lábiles. Las bacterias mutantes incapaces de sintetizar KDO no son viables.

### **3.4. BIOSÍNTESIS DEL O-POLISACÁRIDO**

El O-polisacárido determina la especificidad antigénica de las bacterias y sus LPS. Los constituyentes del polisacárido O-específico varían entre especies y aún



entre cepas, pero los miembros de un serogrupo tienen al menos uno de los determinantes O-antigénicos en común con miembros de un serogrupo distinto.

El análisis bioquímico del O-polisacárido ha revelado la existencia de una secuencia de 10 a 100 o más unidades de oligosacáridos repetitivas compuestas de 3 a 4 monosacáridos. Cuando las condiciones del medio son estresantes, como temperaturas muy altas, bajo pH, bajos niveles de fosfato o magnesio o altos niveles de sales, pueden darse cadenas más cortas. Los siguientes monosacáridos han sido aislados de distintas bacterias: pentosas, 4-aminopentosa, hexosas, 2-aminohexosas, 3,6-desoxihexosas, 6-desoxiazúcares, etc. Las bacterias entéricas que producen O-antígenos con un grupo amino altamente hidrofóbico (ej: dideoxi-azúcares), tienden a ser más patógenos. ( 1 )

### 3.5. ESTRUCTURA

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 al lípido A, que en un extremo tiene ácidos grasos y en el otro grupos fosfato, por lo cual es anfílico; Cuando los LPS están aislados, forman micelas biológicamente activas.

### **3.6. FUNCIÓN**

Los lipopolisacáridos (LPS) presentan la capacidad de inducir respuestas fisiopatológicas en los tejidos y dependiendo de la cantidad de exposición del huésped, puede producirse colapso cardiovascular o la muerte dentro de una hora o dos.

Estudios experimentales indican que un shock hemorrágico irreversible es el resultado principalmente de la adsorción de LPS por el intestino.

La mayoría de las propiedades de las endotoxinas biológicas son directamente atribuibles al lípido A; sin embargo, la mitad del polisacárido confiere la resistencia a los neutrófilos; es el antígeno más importante para muchas especies bacterianas, y también tiene las funciones para neutralizar los componentes del suero.

El papel específico del LPS en muchas enfermedades crónicas no está muy bien definido, pero muchas características de la fiebre tifoidea y septicemia meningococcica son comparables con los efectos conocidos del LPS.

Existe evidencia de que el LPS puede contribuir en el daño a tejidos, especialmente en la resorción ósea en las enfermedades periodontales, el mecanismo por el cual el LPS produce resorción ósea es desconocido, pero se sabe que la captación de calcio se inhibe. Además de sus efectos en el hueso,



los LPS son también factores mitogénicos para las células B y el LPS de *A. actinomycetemcomitans* agrega plaquetas y es tóxico a los macrófagos. (3)

### 3.7. MECANISMOS DE ACCIÓN

El descubrimiento en 1986 de una proteína plasmática llamada LBP (lipopolysaccharide binding protein), fue el evento más importante para descifrar los mecanismos de activación celular inducidos por LPS. La proteína LBP(6) es una glucoproteína sérica de 60-kDa, presente en el suero normal a concentraciones menores a 0.5 µg/ml, y que se eleva hasta 5.0 µg/ml después de una respuesta de fase aguda. LBP es sintetizada en los hepatocitos como un polipéptido sencillo de 50-kDa y luego es liberada en plasma como la forma glucosilada de 60-kDa (6). Después de una inyección con LPS, hay un aumento de 20 veces sobre la expresión basal de los niveles de RNAm en hepatocitos, lo que sugiere que el LPS estimula la expresión de LBP. Se sugiere que la síntesis de LBP por los hepatocitos es controlada por LPS, IL-1, TNF IL-6 y glucocorticoides y que el pretratamiento con LPS predispone a los hepatocitos a responder a LPS, TNF e IL-1 para la síntesis de LBP.

La unión específica de la LBP al LPS se da a través del lípido A. La caracterización de la función de LBP como determinante de las respuestas celulares a LPS reveló un mecanismo para la activación celular inducida por LPS que involucraba un receptor de membrana para el complejo LPS- LBP. ( 1 )

### 3.8. RECEPTORES

Higashida y Gutiérrez mencionan que al caracterizar la función de LBP como determinante de las respuestas celulares a LPS, se reveló un mecanismo de activación celular que involucraba un receptor de membrana para el complejo LPS LBP. El segundo gran avance se hizo cuando se identifica a este receptor como CD 14, una glucoproteína de 55. kDa originalmente descrita como un



antígeno de diferenciación de monocitos y macrófagos Hoy se sabe que CD 14 juega un papel clave en la activación celular inducida por LPS, CD14 puede encontrarse como una proteína sérica soluble (sCD14) y también puede estar anclada a la membrana de células mieloides a través del glucosilfosfatidilinositol (GPI) (mCD14) mCD14 participa en la activación de células mieloides, mientras que sCD 14 participa en la activación de células no mieloides, como células endoteliales o epiteliales, que normalmente no expresan mCD14 <sup>(1)</sup>.

Al entrar el LPS a la circulación, la proteína LBP se le une rápidamente, y los complejos LPS-LBP resultantes son reconocidos por el receptor CD 14 de células mononucleares. Éste, unido al complejo, puede activar la síntesis de TNF en estas células, ya sea de manera directa o indirecta, transportando al LPS a la superficie celular, de manera que otras proteínas son estimuladas, en cualquiera de los 2 casos, el mecanismo de acción entre CD 14 y LBP difiere de los mecanismos usuales por medio de los cuales las células eucarióticas responden a otros agonistas, como hormonas o linfocinas. La unión del agonista (LPS) es mediada por una proteína soluble, en vez de una proteína unida a membrana. Únicamente después de la formación de un complejo soluble, es posible que el LPS se asocie con un receptor de membrana.

Se ha sugerido la existencia de otras proteínas de superficie que actúan como receptores para LPS; aunque CD14 es la única proteína de estructura bien definida que se une a LPS y es el mediador de la activación celular inducida por LPS <sup>(5)</sup>. Se tiene evidencia que existen caminos alternativos coexistentes. Parece ser que CD 14 es el receptor a LPS que predomina en los monocitos periféricos y es el agente que está mayormente involucrado en las respuestas agudas de citocinas ante gram negativos. Sin embargo, se ha visto que CD11/CD18R(8), un miembro de la familia de integrinas leucocíticas, también funciona como un receptor de señal transmembranal para LPS.



Estas glucoproteínas transmembranales se expresan en la superficie de monocitos, macrófagos y granulocitos y participan en numerosas interacciones célula-célula y célula-sustrato.

### 3.9. SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las señales intracelulares probablemente estén mediadas por la interacción con un receptor adicional. El LPS induce fosforilación de tirosinas de una proteína de 74-kDa que es estrictamente dependiente de CD 14. Por otro lado, anticuerpos anti-CD 14 bloquearon la fosforilación de tirosinas inducida por LPS de proteínas de 41 y 42-kDa a concentraciones de LPS menores a 100 ng/ml, pero no hubo bloqueo cuando se utilizaron concentraciones mayores de LPS. Estos hallazgos sostienen la existencia de un camino dependiente de CD 14 y otro camino independiente de CD14 para la secreción de citocinas inducida por LPS. <sup>(10)</sup>

### 3.10. EXPRESIÓN DE GENES

Una de las cinasas que fosforila directamente a J.KB es la PKC, cuando J.KB es fosforilada, NFKB se disocia y se transloca al núcleo en una forma activa que se une al DNA, permitiendo la transcripción génica y la síntesis de *TNF*  $\alpha$  y de IL-1 $\beta$ .

Otro camino intracelular de señales activado por el LPS es el de la MAP cinasa (*mitogen activated protein kinase pathway*). La MAP es una proteína asociada a los microtúbulos del citoesqueleto, y a través de ella, el LPS podría afectar la fisiología celular al perturbar el sistema de cinasas y fosfatasa asociadas con el citoesqueleto, un organelo que tiene efectos profundos sobre transcripción génica, síntesis de proteínas, transporte intracelular, endocitosis, secreción y forma celular. Varios ligandos extracelulares, como el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento nervioso, ésteres de forbol e insulina pueden



estimular el camino de la MAP cinasa. Entre los miembros de este camino está una familia de proteínas cinasas dependientes de serina/treonina de 40-45-kDa, llamadas ERKs (*extracellularly regulated protein kinases*). Al menos tres diferentes miembros de las ERKs, ERK1, ERK2 y otra proteína de 38-kDa son activadas por la fosforilación de tirosinas en monocitos después de la estimulación con LPS. <sup>(11)</sup>.

### **3.11. EFECTOS EN EL PARODONTO.**

Recientemente se ha demostrado que 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 LPS son reconocidos por el huésped en particular mediante la asociación de estas moléculas con los monocitos. (2)

### **3.12 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. Sugiyama (7) informó que el contacto primario en células epiteliales humanas produjo la actividad de IL-1 en respuesta a LPS de *Escherichia Coli*, pero no examinó LPS de ninguna otra bacteria oral. Por otra parte, un estudio reciente demostró 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 *Porphyromonas gingivalis*.

### 3.13. FIBROBLASTOS

Las endotoxinas actúan también sobre los fibroblastos gingivales que sintetizan y liberan tanto IL-8 como la proteína quimiotáctica monocítica (MCP-1). Se ha demostrado de la misma forma, 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 *Porphyromonas gingivalls*.

Los monocitos, son capaces de responder a concentraciones muy bajas de lipopolisacárido produciendo una amplia variedad de mediadores de procesos inflamatorios que estimulan a otros tipos celulares como los linfocitos y los osteoclastos. Para la activación de fibroblastos humanos se requieren dosis mas elevadas en comparación de los anteriores tipos celulares.

Watanabe (9), reportó que la proteína quimiotáctica monocítica es responsable de la respuesta de LPS aislados de *Porphyromonas gingivalis* y es similar al LPS de *Escherichia 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, (4) ha observado que el LPS de *P. gingivalis* induce mediadores de la inflamación liberados por fibroblastos humanos y esta respuesta depende del sujeto, de donde fueron aisladas las células, de la superficie de la muestra usada para preparar las células, fibroblastos gingivales o fibroblastos de el ligamento periodontal y de el mediador examinado (IL-1, IL-6 o PGE2).



## **4. GENERALIDADES**

### **4.1. PDK-1 Estructura y características**

Es una proteína de 65 kDA con un dominio en su porción amino terminal, está muy íntimamente relacionado a las AGC cinasas como PKA, AKT, PKC y posee un dominio SH carboxi-terminal. Se fosforila en serina/treonina en la secuencia S/TFCGT. Se localiza en el citosol y la membrana, ésta última se transloca después de la activación directa de PI3K. La actividad cinasa de PDK-1 es constitutiva. La regulación es de una forma sustrato dependiente o de tipo competitiva. Los sustratos de PDK-1 son las AGC cinasas en las cuales fosforila el residuo "T loop" y de esta forma consigue su activación (excepto GSK-3 $\beta$ ). Esta relacionada con la supervivencia celular.

Uno de sus sustratos es Akt/PKB que es fosforilada en treonina 308 aunque también puede ser fosforilada en serina 473 cuando un fragmento PRK está perdido. Otro sustrato es la enzima p7056k que es fosforilada en treonina 389. Se encarga de inactivar a GSK-3 por fosforilación en serina 9. También actúa sobre Rsk que es una enzima constitutiva de la vía de transducción de las MAP cinasas y ERK-1. Para su activación se requiere que ambas se activen ERK 1/2 y PDK-1. Una vez activa Rsk se transloca al núcleo, y fosforila a factores de transcripción como c-Fos y Nurr77. También la forma activa es capaz de activar a NF $\kappa$ B vía i $\kappa$ B además de que probablemente regule el ciclo de Krebs. Es responsable de la activación de isoformas atípicas de PKC relacionadas y las "novels". Así entendemos que PDK-1 es una enzima muy versátil que fosforila a las proteínas AGC que a su vez están relacionadas con numerosas funciones dentro de la célula.



## 4.2. AKT/PKB ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS

### A) Estructura

Es un homólogo celular de un oncogén transformador (v-Akt) de un retrovirus AKT 8. Existen tres isoformas en los seres humanos akt1, akt2, akt3. Contienen un dominio central ser/treo que fosforila el motivo RXRXXS/T además de que posee un dominio SH en la posición amino terminal que permite la interacción de proteína/proteína o lípido/ proteína. De estas uniones con fosfoinosítidos son consideradas las más significativas (localización y regulación).

Enzimas encargadas de su activación:

Akt es totalmente activada por fosforilación de treonina 308 y serina 473

1. Su activación es dependiente de PI3K

PI3K es activada por diversos estímulos de factores de crecimiento y es inhibida por wortmanina y LY294002. PI3K fosforila PIs en posición D3, creando PIP2 (3,4) y PIP3 (3,4,5), el cual recluta el dominio pH que contienen Akt y PDK1 a la membrana plasmática.

La forma activa constitutiva de PDK1 tiene la capacidad de encontrarse con Akt, y fosforilar treonina 308, llevando a la activación de Akt en la mayoría de los casos.

Quedan algunas interrogantes como ¿qué cinasa fosforila a la serina 473? Puede ser PDK 1, puede ser por autofosforilación, ILK, o alguna forma no descubierta de PDK2.

2.- Activación independiente de PI3K

Por la ruta de PKA que incrementa en función del  $Ca^{2+}$ .

Por unión del calcio con la calmodulina, este complejo activa a CaMKK, que fosforila treonina 308 de Akt.



### 3.- Inactivación de Akt por PTEN

PTEN es una fosfatasa lipídica que desfosforila la posición D3 de Pls, así de esta manera antagoniza con PI3K.

### 4 . Enzimas blanco de Akt

a) BAD miembro de la familia de las Bcl-2 que regulan la liberación del citocromo c. La liberación de citocromo C lleva a la nucleación del complejo apoptosómico de la caspasa 9 y activación de la apoptosis .

Akt fosforila ser 136 de BAD, causando que esta se una con 14-3-3 (lo secuestre en el citosol) en ausencia de Akt, BAD es desfosforilada, y se une con la proteína pro-supervivencia Bcl-XL.

Bcl-XL es por mucho tiempo capaz de bloquear la liberación del citocromo C, y la apoptosis ocurre.

### b) Caspasa-9

Esta proteína es un importante componente de la apoptosis inducida por la mitocondria. La estimulación mediada por factores de crecimiento conduce a la activación de AKT, que puede bloquear la apoptosis aún después de la liberación del citocromo C.

AKT fosforila e inactiva a Caspasa-9.

### c) Miembros de la familia de las proteínas horquilla.

#### 4.. IKK (lleva a la activación de NF-kB).

Opuestos a la familia de proteínas Forkhead, NF-kB es un factor de transcripción que induce la expresión de genes ligados a la supervivencia de la célula como c-IAP(inhibidores de caspasa) y Bfl-1(miembro de la familia Bcl-2 pro supervivencia).



Akt fosforila a IKK, que a su vez fosforila I $\kappa$ B. Los objetivos de I $\kappa$ B cuando esta se encuentra fosforilada son dirigidas hacia la ubiquitinización. La degradación de I $\kappa$ B libres produce que NF- $\kappa$ B se transloque al núcleo e induce la transcripción.

## 5. GSK-3 (Glucógeno sintetasa cinasa 3)

### 4.3. GSK-3 Estructura y características.

Es una cinasa que posee dos isoformas una alfa de 51kD, y una reciduo terminal N-largo y la forma beta de 47kD. Posee una especificidad dual debido a que puede ser fosforilada en residuos S/T y Y. Se localiza únicamente en el citosol. Su estructura según la clasificación de Hank's pertenece al grupo de las CMGC cinasas. Posee un dominio "N-lobe" que se parece mucho a una tirosincinasa. El dominio N-terminal para el pseudosustrato funciona preparando la fosforilación de AKT/PKB. Dimeriza en sentido de la cabeza a la cola. En lo que corresponde a regulación, posee una actividad basal alta y es inhibida por la insulina y la activación de la señal de Wnt. Akt/PKB fosforilan a GSK-3 en serina 9 en la isoforma beta mientras que en serina 21 en la isoforma alfa. La isoforma beta forma un complejo proteínico con axin, APC, y  $\beta$ -catenina. Las señales producidas por Wnt inhiben la actividad de GSK-3 por mecanismos aún desconocidos por medio de la inducción de la unión entre axin y otros factores desalineados. Es estimulada por la fosforilación de Y216 (beta) en el "T-loop" por una cinasa que se encuentra por arriba probablemente la Zak1. Con respecto a su función in vivo es mediadora de las señalización provocada por la insulina debido a que es una enzima blanco de Akt/PKB, que se encarga de la activación de la glucógeno sintetasa, la translocación de proteínas, y la transcripción dependiente de C/EBP. Mediada por las señales de Wnt, que son requeridas para los patrones de formación y proliferación celular. La forma beta en particular fosforila axina, APC,  $\beta$ -catenina además de inducir la degradación de ésta última. Ambas señales de

Wnt e insulina son mediadas por GSK-3, sus funciones son independientemente reguladas.

Fosforila sustratos(preparados)"primed" S/T-x-x-x-S/T-(PO<sub>4</sub>) en la señalización por insulina mientras que fosforila el sustrato (sin preparar) "unprimed" S/T-Px-x-S/T-P en las señales producidas por Wnt. La fosforilación primaria se da en la glucógeno sintetasa que es inducida por CKII y esta usualmente induce la fosforilación secuencial por GSK-3 (Fig. 2).

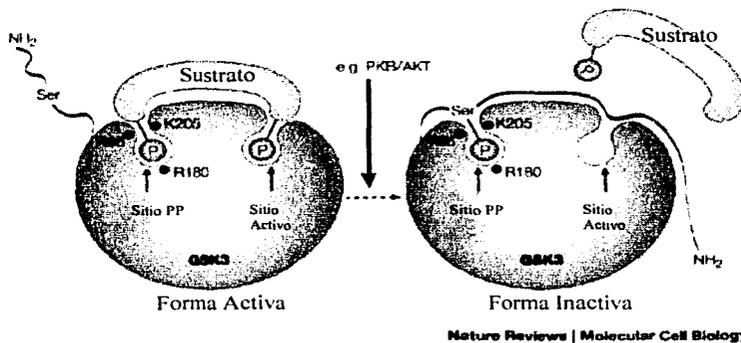


Fig. 2 Mecanismo de Regulación de GSK-3

Sitios de activación serina 9 en la isoforma alfa y serina 21 en la forma beta. Se muestra la forma activa (derecha) y forma inactiva (izquierda), donde se observa que es necesaria la fosforilación del sitio activo de GSK-3 y un sitio de fosforilación para sustratos que pueden ser preparados o sin preparar (tomado de Nature Reviews).

#### 4.4. $\beta$ -catenina estructura y características.

##### Regulación

$\beta$ -catenina es una proteína citoplásmica con una función dual en las señales de transducción de adherencia y de la señal de célula-célula. En la membrana plasmática,  $\beta$ -catenina se asocia a las caderinas de las moléculas de adherencia proporcionando así un acoplamiento entre las caderinas y el citoesqueleto, que es



esencial para asegurar una adherencia fuerte. Sin embargo,  $\beta$ -catenina es también un componente en sentido descendente del camino de transducción de la señal de Wnt, un camino implicado en muchos aspectos del modelado embrionario, incluyendo la determinación dorsal-ventral del eje en *Xenopus*. La función que señala  $\beta$ -catenina es distinta de su papel en la adherencia, e implica una piscina citosólica "libre". En células sin estimular, esta poza soluble de  $\beta$ -catenina es mantenida extremadamente inactiva por fosforilación, ubiquitinación y por la degradación de elementos constitutivos. La activación del camino de Wnt inhibe la maquinaria de fosforilación/ubiquitinación, creando así una poza grande de  $\beta$ -catenina no fosforilada que se encuentra en forma soluble y que después se incorpora el núcleo, y éste actúa recíprocamente con los factores de la transcripción de la familia de la caja de HMG, y de esta forma modula la expresión de los genes específicos blanco.

### **1. Regulación $\beta$ - catenina por Axina**

Axina es una proteína de la familia novel identificada primero en ratón (22). Los embriones del ratón que carecen Axina desarrollan el eje duplicado, indicando que la función normal de Axina es inhibir la formación del eje (Axina para el "inhibidor del eje"). Axina inhibe específicamente la vía de transducción dependiente de Wnt que es la responsable de la inducción dorsal primaria. También se ha determinado que axina se activa por debajo de la activación de GSK y modula desde  $\beta$ -catenina a lo largo del camino de Wnt.

La caracterización molecular adicional ha demostrado que Axina actúa como proteína de andamio debido a que une directamente a  $\beta$ -catenina así como los componentes del camino implicado en la regulación de la fosforilación de  $\beta$ -catenina, en especial GSK-3 y el supresor del tumor APC.



Esta asociación es esencial para la fosforilación específica y la degradación subsecuente de  $\beta$ -catenina. Además, Axina también recluta los reguladores por arriba del camino. Axina se localiza en compartimientos subcelulares distintos, incluyendo las vesículas intracelulares y la membrana plasmática, y se cree que existe un intercambio dinámico entre estos compartimientos implicados en la regulación del camino (37). En resumen, la caracterización de Axina ha provisto una explicación molecular para la especificidad del camino de Wnt: esta especificidad se alcanza dentro de un complejo multimérico muy grande, donde los reguladores positivos y negativos se traen en contacto directo.

En la actualidad está en proceso la caracterización dinámica del complejo de Axina en respuesta a Wnt, en términos de la composición bioquímica y de la localización celular. Esto nos conducirá a la comprensión de cómo se modula el complejo, habiendo una gran parte sin resolver.

## **2. transporte al núcleo de $\beta$ -catenina**

La acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo, donde obra recíprocamente con factores de la transcripción actuando de una forma crucial en señales de Wnt. El hecho que  $\beta$ -catenina se incorpora el núcleo ha sorprendiendo, porque  $\beta$ -catenina no tiene ninguna secuencia nuclear de localización. Partes de  $\beta$ -catenina poseen una homología intrigante (repeticiones de Arm/HEAT) con la familia de receptores/transportadores nucleares solubles, llamadas importinas. La importación ocurre independientemente del camino nuclear clásico de la importación. Estudios indicaron que  $\beta$ -catenina se incorpora el núcleo directamente y de forma similar a las importinas (38).

Recientemente se ha observado que  $\beta$ -catenina también se exporta eficientemente del núcleo. Como la importación, la exportación es muy "anormal", puesto que es independiente de receptores de la exportación.



Además, es insensible a la regulación por GTPasas, uno de los paradigmas principales del transporte nuclear clásico. Por otra parte, la exportación  $\beta$ -catenina comparte características comunes con la exportación (reciclaje) de "importinas". Esto es evidente de la capacidad de  $\beta$ -catenina de competir específicamente con la exportación del importina beta (39). Estos resultados consolidan el acoplamiento entre los miembros distantes relacionados de la superfamilia "HEAT/armadillo repiten". El transporte  $\beta$ -catenina representa una versión simplificada del camino convencional de importina, por medio de las lanzaderas  $\beta$ -catenina dentro y fuera del núcleo sin la direccionalidad impuesta. Ahora se está analizando el mecanismo potencial que puede controlar el tráfico de la fracción nuclear a la citoplásmica y la distribución de  $\beta$ -catenina.

### **3. Mecanismos celulares de la formación embrionaria del límite**

El anlagen embrionario es separado físicamente por los límites, que previenen el mezclarse de la célula. Virtualmente no se sabe nada sobre la base celular de estas estructuras y sobre los procesos que conducen a su formación. Sin embargo, la adherencia de célula-célula es obviamente un parámetro crucial, y los varios modelos que se han propuesto de como las diferencias en la adherencia pueden conducir a clasificar a la célula. Los progresos recientes han proporcionado penetraciones en los mecanismos potenciales que regulan la adherencia, y las herramientas moleculares están disponibles ahora para probar estos mecanismos en el embrión.

### **5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De acuerdo a la influencia que tienen los LPS en los procesos de transducción en fibroblastos gingivales humanos, es de gran importancia reconocer y comprobar la activación de la vía PDK 1 hasta  $\beta$ -catenina este último es un factor de transcripción que regula eventos como la síntesis de c-myc, determinando así



mismo que la función específica que tienen estas enzimas probablemente es promover eventos como la muerte celular.

## 6. JUSTIFICACIÓN

Después de que se realizaron las investigaciones, los experimentos necesarios y a partir de la actividad comprobada de los LPS sobre la activación de esta vía en macrófagos; por lo que investigaciones anteriores en éste laboratorio de investigación comprobaron que la enzima AKT/PKB es activada, es necesario proseguir con el análisis e investigaciones de ésta vía para determinar, qué enzimas van a ser activadas o inactivadas al ser fosforilada la enzima antes mencionada.

Conociendo las señales intracelulares que producen los LPS dentro de los fibroblastos gingivales humanos, podremos conocer mejor la enfermedad periodontal, de esta forma podremos diseñar en un futuro un medicamento para bloquear los procesos de la enfermedad periodontal.



## 7. OBJETIVOS GENERALES

- Determinar si existe activación de la vía PDK-1 y de beta catenina en fibroblastos gingivales humanos, estimulados con LPS.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si el tratamiento con LPS induce la traslocación de PDK-1 del citoplasma a la membrana.
- Determinar si existe la activación de GSK-3 mediante la aplicación de LPS en un curso temporal.
- Determinar por medio del curso temporal con aplicación de LPS a FGH, si existe activación de  $\beta$ -catenina y su traslocación al núcleo.



## 8. HIPÓTESIS

- Conociendo que en anteriores investigaciones se ha comprobado la actividad de LPS sobre CD14 y sus actividades en esta vía en macrófagos, esperamos la reproducción de los eventos en fibroblastos gingivales humanos, así que si se estimulan los fibroblastos gingivales humanos deberá existir activación en las enzimas pertenecientes a ésta vía PDK-1, GSK-3 y  $\beta$ -catenina.



## **Materiales y Métodos:**

### **9. MATERIALES**

Acrilamida. Sigma.

Antibiótico - antimicótico. Life Technologies

Anticuerpos para GSK 3 $\beta$  001-A Santa Cruz

Anticuerpos para PDK 1 C 20 Santa Cruz

Anticuerpos para  $\beta$ - Catenina H102 Santa Cruz.

Cajas de seis pozos

Cajas Falco

Cajas Petri

Camara de Newbauer.

ECL-plus. Amersham.

HGF

LPS Laboratorio de bioquímica DEPel

Medio de cultivo DMEM Dubelco's Modified Eagle Medium enriquecido con SBF suero bovino fetal al 2%

Medio de cultivo DMEM Dupleco's Modified Eagle Medium enriquecido con SBF suero bovino fetal al 10%

Nitrocelulosa. Bio-Rad.

Película de alto contraste. Amersham

Persulfato de amonio Sigma

Pipetas

Pipetas Pasteur

TEMED. Sigma.

Trisma base. Sigma.

Wortmanina. Sigma.



UNIVERSITY OF PUERTO RICO  
RISQUESS



## **EQUIPO**

Agitador orbital. Lab line.  
Cámara de electroforesis. Hoeffer.  
Cámara de transferencia. Hoeffer.  
Campana de Flujo laminar. Nuaire.  
Centrífuga clínica. Cole Palmer.  
Fuente de Poder. Pharmacia.  
Incubadora de dióxido de carbono. Nuaire.  
Microcentrífuga. Sorvall.  
Micropipetas. Gilson.  
Microscopio de objetivos invertidos. Olympus.

## **10. MÉTODOS**

### **10.1. CULTIVO DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.**

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron mediante la técnica de explante a partir de encías sanas de pacientes que acudieron a la clínica de exodoncia (41). Las células se mantuvieron en medio de cultivo Eagle modificado por Dubelco suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2mM de glutamina en presencia de 1% antibiótico-antimicótico en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%.

Las células se utilizaron hasta el 15º pase y en estado de semiconfluencia.

### **10.2 TRATAMIENTO CELULAR**

Las células se crecieron hasta la subconfluencia en DMEM + 10% SBF + 1% Antibiótico-antimicótico. Se colocaron en ayuno durante 24 hrs y se trataron con el LPS a diferentes tiempos ( 0, 0.25, 0.5, 1, 3, 6 hrs) y a diferentes dosis



(0.001 a 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células se recuperaron mediante raspado en buffer de fosfatos salino con 1mM de ortovanadato de sodio se lavaron durante 2 ocasiones, mediante centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en buffer de lisis.

### **10.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES**

Las células se trataron a diferentes tiempos y dosis con el LPS. Al término de la reacción las células se obtuvieron por raspado con buffer de fosfatos salino con 1mM de ortovanadato de sodio. Las células se centrifugaron se retiró el sobrenadante y la pastilla se congeló en baño de hielo seco y etanol por 15 min. Al término las células se lisaron en buffer Hepes 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, DTT 1mM pH 7.9 . Se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min a 4°C., en el sobrenadante se recuperó la fracción citosólica. La pastilla se resuspendió en un buffer hipertónico ( Hepes 20mM, NaCl 0.4M; MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, Glicerol 25%, EDTA 0.2 mM; DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM pH 7.9). Los núcleos se incubaron durante 30 minutos en agitación a 4°C y se cuantificó la proteína por Lowry (13).

### **10.4. ANÁLISIS DE WESTERN BLOT**

Se tomaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína de las células y se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 10%, a 50 mA. Al término de la corrida las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 12 hrs a 40 mA. Al término de las transferencia las membranas se bloquearon durante 60 minutos en una solución de buffer de fosfatos-salino (PBS); 1% leche descremada, posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones en PBS; 0.1% Tween. Se incubaron a temperatura ambiente durante 4 hrs con el primer anticuerpo (1:1000) y se lavaron durante tres ocasiones en PBS; 0.1% Tween. Posteriormente se incubaron con el segundo anticuerpo (1:5000) acoplado a peroxidasa durante 2 hrs a temperatura ambiente, la membrana se lavó durante 3 ocasiones en PBS; 1% Tween y se reveló por quimioluminiscencia (Santa Cruz).

La activación de la enzima estudiada en cada experimento se observará como una banda oscura en la zona que corresponda a su peso molecular de dicha proteína y la ausencia de la banda representará su inactivación.

## 11. RESULTADOS.

### Inducción de la translocación de PDK-1 asociado a LPS.

PDK-1 es una cinasa activa constitutiva que se encuentra regulada por la unión a  $pl_{3,4}$  y  $pl_{3,4,5}$  en el plasma intracelular (14,15). Para evaluar el efecto de LPS en esta cinasa, aislamos la porción membranal de la citoplásmica con el objeto de identificar su translocación a la membrana. Encontramos que existe activación de PDK-1 de una manera dependiente al curso temporal y por consiguiente aumento en la translocación a la membrana celular en fibroblastos gingivales humanos fig3 y fig. 4. Estas observaciones sugieren verificar si existe la activación de las cinasas conocidas en esta vía de transducción.

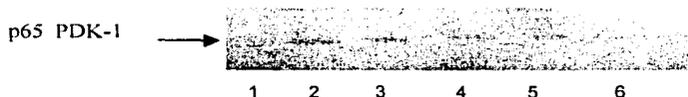


Fig. 3 Efecto de los LPS sobre la translocación PDK-1 en la fracción citosólica.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia en ausencia (1) y presencia de LPS  $1\mu\text{g/ml}$  se trataron a diferentes tiempos 2) 5; 3) 10; 4) 15; 5) 30; 6) 60 minutos. Al término las muestras se obtuvieron y se procesaron para obtener las fracciones citosólica y membranal. Se cuantificó la proteína y  $50\mu\text{g}$  se separaron por electroforesis y se transfirieron a nitrocelulosa del primer anticuerpo se utilizó (1:1000) y del segundo (1:5000).

p54 PDK-1

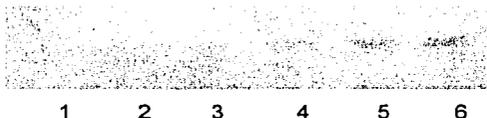


Fig. 4 Efecto de los LPS sobre la translocación de PDK1 en la fracción nuclear.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia en ausencia (1) y presencia de LPS 1 $\mu$ g/ml se trataron a diferentes tiempos 2) 5; 3) 10; 4) 15; 5) 30; 6) 60 minutos. Al término las muestras se obtuvieron y se procesaron para obtener las fracciones citosólica y membranal. Se cuantificó la proteína y 50  $\mu$ g se separaron por electroforesis y se transfirieron a nitrocelulosa del primer anticuerpo se utilizó (1:1000) y del segundo (1:5000)

La inducción con LPS a tiempos cortos resulta en la activación y translocación de PDK-1 del citosol a la membrana celular que puede observarse por la aparición de bandas oscuras en el análisis de western.

#### **LPS produce activación y fosforilación de AKT/PKB.**

Estudios realizados con anterioridad en este mismo laboratorio(16) se demostró la activación de AKT por el efecto directo de los LPS en HGF, apoyándonos en estos estudios y conociendo que uno de los sustratos principales de PDK-1 después de su translocación a la membrana es PKB (15) sugiere demostrar que esta vía continua activándose.

#### **Curso temporal para la determinación de la activación de GSK-3 inducida por LPS.**

Uno de los principales sustratos de AKT/PKB es GSK-3. La fosforilación en serina 21 en la isoforma  $\alpha$  y serina 9 en la isoforma  $\beta$  da como resultado que esta forma fosforilada sea inactiva, y se separe del complejo al que pertenece (GSK-3,axina, APC, y  $\beta$ -catenina) (17).

Encontramos que tratar HGF con LPS da como resultado la fosforilación en serina 9 (figura 5), así que por medio de curso temporal demostramos fosforilación de GSK-3 $\beta$ .

Así como AKT, GSK-3 ha demostrado un aumento en su activación a los 15 minutos, con incrementos hasta periodos de 6 hrs.

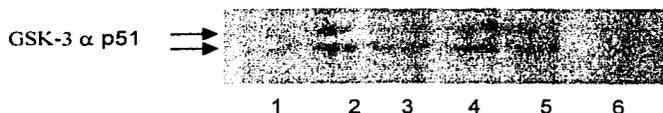


Fig. 5 Efecto de los LPS sobre la fosforilación de GSK3.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia en ausencia (1) y presencia de LPS 1 $\mu$ g/ml se trataron a diferentes tiempos 2) 15 min ; 3) 30 min; 4) 60 min ; 5) 3 hr; 6) 6 horas. Al término las muestras se obtuvieron y se procesaron, se cuantificó la proteína y 50  $\mu$ g se separaron por electroforesis y se transfirieron a nitrocelulosa del primer anticuerpo se utilizó (1:1000) y del segundo (1:5000)

El tratamiento a HGF con LPS (1 $\mu$ g/ml) provoca fosforilación de GSK-3 a distintos tiempos.

### **Curso temporal y separación de las fracciones nuclear y citosólicas para determinación del acumulo de $\beta$ -catenina nuclear inductada por LPS.**

En la vía de Wnt, la fosforilación e inactivación de GSK-3 resulta en la acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo debido al decremento en su degradación. Éste incremento ha sido ligado a la activación transcripcional de genes que contienen sitios TCF/Lef-1 (34,35,36,39). Demostrar que la fosforilación e inactivación de GSK-3 inducida por LPS podría copiar las señalización de la ruta Wnt en HGF (5).

Los HGF fueron tratados con LPS a diferentes tiempos, posteriormente fué aislada la proteína nuclear, a ésta se le practicó un análisis de Western blot (fig 6) donde queda demostrado que en HGF, la endotoxina es inductora de la acumulación de  $\beta$ -catenina probablemente debido a la fosforilación e inactivación de GSK-3.

Es importante mencionar que no se demostró que la activación de  $\beta$ -catenina es debida a la activación directa de GSK-3 y falta determinar los receptores que utiliza.



Fig. 6 Efecto de los LPS sobre la translocación al núcleo de  $\beta$ -catenina en fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia en ausencia (1) y presencia de LPS  $1\mu\text{g/ml}$  se trataron a diferentes tiempos 2) 15 min; 3) 30 min ; 4) 60 min ; 5) 3 hrs ; 6) 6hrs. Al término las muestras se obtuvieron y se procesaron para obtener las fracciones citosólica y membranal. Se cuantificó la proteína y  $50\mu\text{g}$  se separaron por electroforesis y se transfirieron a nitrocelulosa del primer anticuerpo se utilizó (1:1000) y del segundo (1:5000)

La exposición de LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) resulta en la acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo de HGF a distintos tiempos que van desde 10 min hasta 6hrs.

Se realizaron los experimentos por triplicado y solamente se muestra un representativo de cada uno, en donde la cantidad de fibroblastos gingivales humanos corresponde a  $6 \times 10^6$ , tomados de paciente femenino de 24 años de edad con salud periodontal, de la clínica del departamento de periodoncia de DEPeI los datos obtenidos se agruparán y analizarán de acuerdo al experimento correspondiente que se realizó.



## 12. Discusión

El presente estudio evalúa el rol de LPS en la activación de algunos componentes de la vía de transducción de PI3-K como son PDK-1 y GSK-3. En estudios previos se ha demostrado que en macrófagos de alvéolos pulmonares existió un aumento en la activación de PI3-K debido a la exposición con LPS (18). Como punto de inicio, esta información invita a demostrar que existe una activación por debajo de los receptores que se encuentran involucrados. En numerosos estudios se ha observado que LPS se une a CD14 (19,20) produciendo activación de rutas de transducción; a su vez PI3-K es responsable de activar variados grupos enzimáticos como la familia de tirosin cinasas (21), GTPasas, y (ptins)novels. Conforme a los estudios realizados la translocación de PDK-1 en HGF es evidente en el estudio de Western debido al aumento en el tamaño de la porción membranal con una disminución proporcional en la porción citoplásmica (fig 1,2). Sugerimos continuar este estudio confirmando por medio de una densitometría que efectivamente existe un aumento en la cantidad de PDK-1 en la porción membranal, y una disminución proporcional en la porción citoplasmática. Otro punto que debe ser aclarado completamente es el tipo de receptor que activa esta ruta, así como su secuencia hasta demostrar claramente que la activación de PDK-1, se da a través de CD14 y PI3-K en HGF. La importancia de la activación de esta ruta metabólica se relaciona directamente con factores de transcripción de genes como *c-fos*, *nurr77*, NFKB (24,25).

En este laboratorio hemos demostrado por medio de las pruebas de Western blot que la activación de Akt resulta en la inactivación de GSK-3 (fig 3) y el incremento de  $\beta$ -catenina en el núcleo (fig 4). GSK-3 es una enzima muy importante y constitutiva de esta vía que es regulada negativamente por la vía de Wnt que se ha visto se encuentran en íntima relación así como la fosforilación de GSK-3 (26,27,28).



Otro regulador previamente reportado de GSK-3 se localiza en el cáncer de colon en donde PKC  $\beta 2$  la inactiva, resultando en un incremento en la división celular y tumorigénesis (29). La fosforilación de GSK-3 en serina 21/9 da como resultado la disociación del complejo APC, axina, y  $\beta$ -catenina. Cuando GSK-3 es removido de este complejo, no puede fosforilar a  $\beta$ -catenina y marcarla para ubiquitinarla con esto estimular su degradación proteosomal (30). Esta regulación negativa de GSK-3 ha sido ligada a la señalización íntima existente con Wnt, factores de crecimiento, insulina, y fibronectina celular (31). La única señal que ha sido ligada a la acumulación y actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina es la inactivación de GSK-3 por la ruta de Wnt. En macrófagos pulmonares, el resultado de la acumulación de  $\beta$ -catenina inducida por LPS era desconocida. En otros sistemas,  $\beta$ -catenina estabiliza la actividad transcripcional del complejo que lo contiene así como el factor de transcripción TCF/lef-1. El complejo  $\beta$ -cateninaTCF/lef-1 puede activar o suprimir la transmisión de genes (32,33).

Los genes que han demostrado tener sitios para tcf/lef-1 y que son positivamente regulados por  $\beta$ -catenina son c-myc, fibronectina, ciclina D1, c-jun, fra-1, e cadherina, matrilisina, y conexina 43 (34,35).

Existen puntos por determinar como la actividad de esta ruta y su "crosstalk" con otros sistemas enzimáticos y su relación en la enfermedad periodontal, queda mucho por confirmar en el presente estudio sólo se buscó identificar que componentes de ésta vía se encontraban activos, falta determinar aún si esta actividad esta relacionada directamente una con la otra. Entendemos como una prioridad de la investigación en éste laboratorio describir la actividad que poseen los HGF en su interior para responder a la acción de los microorganismos. Falta por determinar si LPS es capaz de inducir un aumento en los productos de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina y si existe una influencia en la proliferación celular de los HGF.



### 13. CONCLUSIÓN

Podemos concluir de acuerdo a los resultados obtenidos que los LPS son activadores de señales de transducción de los diferentes componentes de la ruta PDK-1/  $\beta$ -catenina en fibroblastos gingivales humanos. Son promotores de la translocación a la membrana celular de PDK-1 en fibroblastos gingivales humanos además de producir la fosforilación e inactivación GSK-3 $\beta$  con la consecuente acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo de los mismos interviniendo enzimas importantes como PKB.

Inducen la expresión de genes involucrados en importantes funciones celulares; cabe mencionar que aún queda por determinarse si la activación de los elementos de esta ruta se produce de forma directa y descendente a lo largo del camino de ésta vía de transducción así como los receptores que intervienen en la respuesta celular.



## 14. BIBLIOGRAFÍA

1. Carolina Higashida, Guerrero y Gloria Gutiérrez Venegas. Lipopolisacáridos: extraordinarias moléculas activadoras de señales de transducción celular., Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Gloria Gutiérrez-Venegas, Mauricio Peña-Párraga y Armando Flores-Ildes. Los Lipopolisacáridos como promotores de procesos inflamatorios en cavidad oral. Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Juan Carlos Velázquez Acosta. (1998). Principales protagonistas de la respuesta inflamatoria a la infección. Hospital Pediátrico Docente "William Soler". Servicio de Infectología; Rev. Cubana Pediatra; 70(2):84-91.
4. Koka S, Maze C, Reinhart R, Dyer J. (1996) . Variability of inflammatory mediator production by human periodontal fibroblast stimulated with bacterial lipopolycchacaride. In vitro Cell Dev Biol 32: 528-530.
5. Monick M. Martha, Carter Brent, Robeff K., Flaherty M., Peterson W., Hunninghake W. (2000). Lipopolysaccharide Activates Akt in Human Alveolar Macrophages Resulting in Nuclear Accumulation and Transcriptional Activity of  $\beta$ -Catenin. Immun..
6. Ramadori G, Meyer zum Buschenfelde K H, Tobias P S, Mathison J C y Ulevitch R J (1990). Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. Pathobiology 58: 89-94.



7. Sugiyama A, Arakaki Ri Ohnishi T, Arakaki N, Dahikuhara Y. (1996). Lipoteichoic acid and Interleukin-1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) 111 Human Gingival Fibroblast in culture. *Infect Immun* 64: 1426-1431.
8. Uleyitch R J y Tobias P S (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev. Immunol*, 13: 437-457.
9. Watanabe A, Takeshita A, Kitano S, Hanasawa S. (1997). CD14 mediates signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblast. *infect immun*; 64:448-4494.
10. Weinstein S L, June C H y De Franco AL (1993) Lipopolysaccharide-induced protein tyrosine phosphorylation in human macrophages is mediated by CD14. *J Immunol*. 151: 3829.
11. Willis S y Nisen P (1996) Differential induction of the mitogen-activated protein kinase pathway by bacterial lipopolysaccharide in cultured monocytes and astrocytes. *Biochem. J* 313:519-524.
12. Jian Ren , Yongging Li, Donald Kufe (2002). Protein Kinase C Regulates function of the DF3/MUC1 Carcinoma antigen in B-catenin signaling. *JBC*. March Manuscript M200436200.
13. Terrance G. Cooper, *The tools of Biochemistry* , ed 1<sup>a</sup>. Ed. Wiley Interscience, 1977, pp 423.
14. Toker, A. , L . C . Cantley. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-oh kinase. *Nature* 387:673.



15. Toker, A., L. C. Newton. (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical pdk-2 site. *J. Biol. Chem.* 275:8271.
16. Blanca Esmeralda Delgado Acevedo, Gutierrez Venegas Gloria,. Efectos de I $\beta$ s sobre la activaci3n de Akt. Tesis en tr3miteme.
17. Eastman, Q., R. Grosschedl. (1999). Regulaci3n de LEF-1 /TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:233.
18. Monick, M. M., A. B. Carter, D. M. Flaherty, M. W. Peterson, G. W. Hunninghake. (2000). Protein kinase C plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J. Immunol.* 165:4632.
19. Stefanova, I., M. L. Corcoran, E. M. Horak, L. M. Horak, J. B. Bolen, and I. D. Horak. (1993). Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56. *J. Biol. Chem.* 268:20725.
20. Kielian, T. L., and F. Blecha. 1995. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide. *Immunopharmacology* 29:187.
21. Herrera-Velit, P., and N. E. Reiner. (1996). Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56 and phosphatidylinositol 3-Kinase in human monocytes. *J. Immunol.* 156:1157.
22. Terrance G. Cooper. The tools of bio-chemistry. Ed. Wiley-Interscience Publication. Primera Edici3n. 1984.

ESTA TESIS NO SALE<sup>39</sup>  
DE LA BIBLIOTECA



- 
23. Harwood AJ. (2001). Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell*. Jun 29;105(7):821-4
24. Claesson-Welsh L(1994). Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* Dec 23;269(51):32023-32026.
25. Pawson T, Saxton TM. (1999) Signaling networks--do all roads lead to the same genes? *Cell*. Jun 11;97(6):675-678. (PDF).
26. Peterson , R.T.,S.L. Schreiber. (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol*. 9:R521.
27. Ding, W.V., R.H.Chen, and F, McCormick.(2000). Differential regulator of GSK-3  $\beta$  by insulin and Wnt signaling. *J. Biol. Chem*.
- 28.Chen,R.H.,W.V.Ding, F. McCormick.(2000) . Wnt signaling to b-catenin involves two interactive components: glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition and activation of protein kinase C. *J.Biol.Chem*. 275: 17894.
- 29.Murray, N.R.,L.A. Davidson, R.S. Chapkin W. Clay Gustafson, D.G. Schattenberg, A.P. Fields. (1999). Overexpression of protein kinase C $\beta$ II Induces colonic hyperproliferation and increased sensivity to colon carcinogenesis. *J. Cell. Biol*. 145:699.
- 30.Seidensticker,M.J.,J Behrens. (2000). Biochemical interactions in the Wnt pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1495:168.



31. Orena, S.J., A.J. Torchia, R.S. Garofalo. (2000). Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol.Chem.* 275:15765
32. Gumbiner, B.M., (1997). Carcinogenesis: a balance between  $\beta$ -catenin and APC. *Curr. Biol.* 7:R443.
33. Kuhl, M., L.C. Sheldahl, M. Park, J. R. Miller, R.T. Moon. (2000). The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway a new vertebrate wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 16:279.
34. Van der Heyden, M.A.; M.B. Rook, M.M. Hermans, G. Rijksen, J. Boonstra, L.H. Defize, O.H. Destree. (1998). Identification of conexin 43 as a functional target for wnt signaling. *J. Cell. Sci.* 111:1741.
35. Crawford, H. C., B.M. Fingelton, L. A. Rudolph-Owen, K. J. Goss, B. Rubinfeld, P. Polakis, L. M. Matrisian. (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of a  $\beta$ -catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18:2833.
36. Rimerman, R. A., A. Gellert-Randelman, J.A. Diehl. (2000). Wnt1 and MEK1 cooperate to promote cyclin D1 accumulation and cellular transformation. *J. Biol. Chem.* 275:14736.
37. Fagotto F., Eek-Hoon J., Zeng L., Kurth T., Joos T., Kaufmann C. and F. Costantini. (1999). Domains of Axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition and intracellular localization. *J. Cell Biol.* 145, 741-756.



DFG  
FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT  
DEUTSCHER WISSENSCHAFTLER



- 
38. Fagotto F., Glück U. and B.M. Gumbiner (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr. Biol.* 8, 181-190.
39. Wiechens, N. and Fagotto F. (2001). CRM1- and Ran-independent nuclear export of beta-catenin. *Curr. Biol.* 11, 18-27.
40. Fagotto F., Guger K. and B.M. Gumbiner. (1997). Induction of the primary dorsalizing center in *Xenopus* by the Wnt/GSK/beta-catenin signaling pathway, but not by Vg1, Activin or Noggin. *Development* 124, 453-460.
41. Bartold, PM, Page, RC. (1987). Isolation and characterization of proteoglycans synthesized by adult human gingival fibroblasts in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.*; 253: 399-412.



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MATERIA DE FISIOLÓGICA Y ANATOMÍA



## 15. ANEXOS:

### Abreviaturas:

LPS - Lipopolisacárido  
Gsk-3 - Glycogen Syntetase kinase 3  
Pdk-1 - Phosphoinositide dependent protein kinase 1  
Pkb - Protein Kinase B  
Akt - Threonine protein kinase  
Pi3-k - Phosphatidyl Inositol 3 posphate  
Wnt - Wingles int  
Pkc - Protein kinase C  
Apc -Adenomatous polyposis coli protein  
Lbp - Lipopolisacharide binding protein  
Tcf - Tumor complement factor  
Lef-1 - Lymphoid enhancer factor 1  
c-myc - Oncogene  
c-jun - Oncogene  
fra-1 - Fos-related antigen 1  
 $\beta$ -catenin - beta catenina  
CD14 - Receptor  
tdl4 - Receptor  
MAP – Mitogen activated protein  
NFkB – Factor de necrosis tumoral beta  
ERKs -extracellularly regulaied protein kinases  
IL-1 – Interleukin 1