

**ANÁLISIS *In Vitro* DE LA VIABILIDAD FIBROBLASTOS GINGIVALES EN  
ASOCIACIÓN CON *Escherichia coli***

**MARIA CLAUDIA CASTRO ZARATE  
Código 186218**

**TESIS DE MAESTRIA EN MICROBIOLOGÍA**

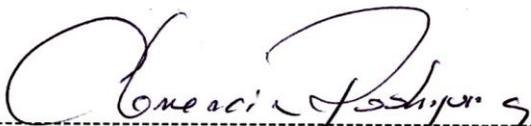
**Director  
JAIRO CERÓN SALAMANCA Q.F. PhD**

**MAESTRIA INTERFACULTADES EN MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
BOGOTÁ  
2009**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el 31 de julio de 2009.

En constancia firman:



J.: MARÍA CLEMENCIA RODRÍGUEZ GACHARNÁ  
C.C. 41511841 B/E



J: JAIME CASTELLANOS  
C.C. 79340133

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y sus directivas por su respaldo durante la realización de la Maestría y por el apoyo financiero para la ejecución de este proyecto.

Al personal del laboratorio de Citogenética del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia por su soporte académico y por permitir la realización de este trabajo en sus instalaciones.

Al laboratorio de Biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por permitir la realización de este trabajo en sus instalaciones.

Al Profesor Jairo Cerón S. por su orientación, confianza y apoyo incondicional  
Al Grupo de Ingeniería de Tejidos por su colaboración en la ejecución del proyecto

Al Posgrado Interfacultades en Microbiología, a su directora Martha Fontanilla con el equipo de profesores por sus enseñanzas y a su asistente Socorro Prieto por su gestión.

Al Departamento de Investigaciones de la Clínica del Niño por haberme facilitado el Citómetro de Flujo.

A mis hijos María Camila, Daniel y Laura, por el tiempo que dejé de compartir con ellos y haber sido mi aliento absoluto.

A mis amigos y colaboradores por su constante e incondicional apoyo.

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	4
TABLA DE FIGURAS .....	6
TABLA DE GRÁFICOS .....	7
LISTADO DE TABLAS .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
1 JUSTIFICACIÓN.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo General.....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
2.2.1 Establecer patrones de crecimiento para poblaciones de fibroblastos gingivales humanos.....	14
2.2.2 Establecer curvas de crecimiento para aislamientos de Escherichia coli a partir de bolsas periodontales de pacientes con periodontitis crónica. 14	14
2.2.3 Determinar los efectos de los aislamientos de Escherichia coli ensayada sobre la viabilidad de fibroblastos humanos gingivales .....	14
3 MARCO TEORICO .....	15
3.1 Tejidos Periodontales.....	15
3.1.1 Epitelio gingival Oral .....	16
3.1.2 Epitelio del Surco Oral .....	16
3.1.3 Epitelio de Unión .....	17
3.1.4 Tejido Conectivo gingival.....	18
3.1.5 Fibroblasto.....	19
3.2 Enfermedad Periodontal .....	25
3.2.1 Microbiología de la Enfermedad Periodontal .....	28
3.2.1.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	30
3.2.1.2 Bacterias Entéricas .....	31
3.3 Cultivos Celulares.....	35
3.4 Viabilidad y muerte celular.....	38
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
4.1 Obtención de los fibroblastos de tejido gingival .....	41
4.2 Cultivo de Fibroblastos Gingivales Humanos .....	41
4.3 Curva de Crecimiento de los Fibroblastos Gingivales Humanos .....	42
4.4 Obtención de la cepa de Escherichia coli asociada a Enfermedad Periodontal.....	44
4.5 Cinética de crecimiento de la cepa ATCC 25922 y aislamiento de Escherichia coli .....	46
4.6 Concentración bactericida de gentamicina para los aislamientos de la cepa ATCC 25922 y el aislamiento de E. coli A8. ....	47
4.7 Ensayo de Infección con aislamiento de Escherichia coli A8 en fibroblastos gingivales humanos (FGH).....	49
4.8 Evaluación de la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos infectados con E. coli A8 por citometría de flujo. ....	51
5 RESULTADOS .....	53
5.1 Cultivo Primario. ....	53
5.2 Curva de crecimiento para los Fibroblastos:.....	54
5.3 Aislamiento de Escherichia coli .....	56
5.4 Cinética de Crecimiento para E.coli .....	58

5.5	Concentración bactericida de gentamicina para la cepa ATCC 25922 y el aislamiento de E. coli A8.....	59
5.6	Aislamientos de Escherichia coli alteran la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos .....	61
6	DISCUSIÓN.....	66
7	CONCLUSIONES .....	71
8	PERSPECTIVAS .....	72
	BIBLIOGRAFÍA .....	73
	ANEXOS .....	80

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Tejidos Peridontales Lindhe, 2000	15
Figura 2. Ubicación Epitelio de unión Glickman, 1998	17
Figura 3. Patogénesis de la Enfermedad Periodontal. Page y Kornman, 1997	26
Figura 4. Lesión Avanzada Page, 1997	27
Figura 5. Complejos Microbianos. Sockransky and Haffajee, (2005) Periodontology 2000.	29
Días de Subcultivo	38
Figura 6. Fases de la curva de crecimiento para cultivos celulares. (Freshney, 2000)	38
Figura 7. Diseño para cinética de crecimiento bacteriano	47
Figura 8. Diseño de ensayo para establecer dosis bactericida de gentamicina sulfato	49
Figura 9. Modelo de placa de 12 pozos con la distribución de los microorganismos para ensayo de infección	51
Figura 10. Imágenes de Microscopio Invertido 10X correspondientes a la migración y proliferación de células epiteliales y Fibroblastos Gingivales Humanos FGH	53
Figura 11. Imágenes de Microscopio Invertido 10X correspondientes a la migración y proliferación de Fibroblastos Gingivales Humanos FGH a partir del explante hasta llegar a confluencia en monocapa	54
Figura 12. Aspecto macroscópico de las colonias de <i>E. coli</i> A-8 en agar MacConkey	57
Figura 13. Pruebas bioquímicas para confirmación aislamiento clínico de <i>E coli</i>	57
Figura 14. Análisis por citometría de flujo. Corresponde a fibroblastos resuspendidos en Buffer sin marcar	62
Figura 15. Análisis por citometría de flujo Control positivo con <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	63
Figura 16. Análisis por citometría de flujo FGH infectados con <i>E. coli</i> ATCC 25992	63
Figura 17. Análisis por citometría de flujo FGH infectados con un aislamiento periodontal de <i>E.coli</i> .	64

## TABLA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Curva de crecimiento de FGH se observa un crecimiento exponencial hasta el día 10	56
Gráfico 2 Curva de Crecimiento de E coli ATCC 25922 y aislamiento de E coli en DIMEM sin agitación, 37° C y sin CO <sub>2</sub>	58
Gráfico 3 Análisis por citometría de flujo Evaluación de apoptosis de FGH al ser infectados por <i>E. coli</i> .	65

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Recuento celular para curva de crecimiento	59
Tabla 2 Pruebas bioquímicas para confirmación de <i>E.coli</i>	61
Tabla 3 UFC/ml de los preinóculos de <i>E. coli</i>	63
Tabla 4 Resultado de ensayo control, sin antibiótico al hacer lecturas de siembra de las bacterias a diferentes tiempos	64
Tabla 5 Evaluación de apoptosis de FGH al ser infectados por <i>E. coli</i>	68

## INTRODUCCIÓN

La cavidad oral sirve como hábitat para una gran variedad de bacterias. Se han cultivado y clasificado taxonómicamente más de 700 especies bacterianas. Sin embargo, más de la mitad de la microbiota oral aun no puede ser cultivada. Una gran cantidad de bacterias puede adherirse a las superficies orales y sobrevivir en el ambiente oral mostrando diferentes grados de predilección de sitio (Asikainen, 2000); específicamente a nivel de la placa subgingival, se estima que están presentes 415 especies (Feng, 2006). Tan sólo unas pocas especies bacterianas presentes en el surco gingival conllevan a la aparición de algunas patologías como la enfermedad periodontal (Haffajee, 1994, 2005).

La enfermedad periodontal es un grupo de infecciones “eco-genéticas” que lleva a la inflamación de la encía y destrucción de los tejidos periodontales. En casos severos está acompañado por la pérdida de hueso alveolar y exfoliación de los dientes o de sus sustitutos como los implantes (Haffajee, 1994; Bartold, 2006). En Colombia, según el III Estudio Nacional de Salud Bucal de 1998 es la segunda enfermedad con mayor prevalencia después de la caries.

Ya han sido plenamente identificadas las bacterias implicadas en su etiología, encontrándose un patrón común en el componente bacteriano de los pacientes con periodontitis. Dentro de ellas, las mas implicadas estan: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Dialister pneumosintes* (Doan, 1999; Socransky, 2005). En los últimos años, se ha resaltado la importancia de la presencia de bacilos entéricos en las muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica, periodontitis refractaria y periimplantitis en un rango del 14% al 57% en diferentes poblaciones del mundo (Ferreira dos Santos, 2002). En Brasil se han encontrado en una frecuencia de 31.2%. (Barbosa, 2001). En las poblaciones asiáticas la prevalencia de las bacterias entéricas se reporta en un rango del 57% (Sedgley, 1997). Los estudios realizados en Colombia han mostrado una frecuencia de aislamiento del 39.2%

(Fayad, 2002) y de 32.5% evidenciándose una prevalencia importante de estos microorganismos en placa subgingival en nuestra población sin estar dilucidado su papel en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Roberts, 2005).

La interacción entre las bacterias y las células eucariotas es compleja; existen procesos activos que nos ayudan a vivir en armonía con las bacterias que viven en nuestro cuerpo (Feng, 2006). Una de las células blanco de las bacterias periodontopatógenas es el fibroblasto, la célula más común del tejido conectivo periodontal. Juega un papel importante en la remodelación de los tejidos periodontales, produciendo proteínas tales como colágeno y elastina, al igual que las glicoproteínas y glicosa-aminoglicanos de la matriz extracelular. El fibroblasto desempeña funciones importantes en la respuesta inmunológica del hospedero en la enfermedad periodontal, produciendo citoquinas, lo que ha permitido establecer un nuevo modelo de sistema de señalización celular para la enfermedad periodontal (Wang, 2002). Se ha demostrado que el fibroblasto puede ser infectado e invadido por bacterias como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mostrando alteraciones tanto morfológicas como en la organización del citoesqueleto. (Dogan, 2000; Gutierrez-Venegas, 2007).

Ante la evidencia experimental que soporta que las células eucariotas al entrar en contacto con patógenos periodontales pueden desencadenar mecanismos de penetración, necrosis y apoptosis celular, es importante hacer estudios de viabilidad celular que permitan evaluar la supervivencia del fibroblasto al ser cultivado con una enterobacteria como *Escherichia coli* teniendo en cuenta los reportes de su aislamiento junto con otras enterobacterias a partir de bolsas periodontales de pacientes con periodontitis crónica (Hakimuddin, 1999; Kato, 2000; Amano, 2003; Andrian 2004, Lafaurie, 2007).

Aun no hay estudios que permitan establecer el posible rol patógeno de las enterobacterias al entrar en contacto con los fibroblastos gingivales humanos FGH. Es así que al evaluar *in vitro* el posible daño de una de las células del tejido periodontal por *Escherichia coli* se podría proveer información crucial

para el entendimiento del papel que pueden jugar las enterobacterias en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal.

# 1 JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periodontal es quizás la enfermedad crónica infecciosa más común en los seres humanos (Lindhe, 2000). En Colombia, junto con la caries todavía representan las dos enfermedades orales con mayor prevalencia y son la causa de pérdida dental o de sus sustitutos (ENSAB III, 1998). Ya han sido plenamente identificadas las bacterias implicadas en su etiología y cómo esto puede ser un factor de riesgo para ocasionar alteraciones sistémicas tales como enfermedad cardiovascular (Pogulske, 1999), bebés pretérmino con bajo peso al nacer (Offenbacher, 1999, 2007) y enfermedad respiratoria (Pesola, 2004). Por otra parte, se ha observado que las bacterias entéricas están presentes en muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica, refractaria y periimplantitis en diferentes poblaciones del mundo (Barbosa, 2001; Botero, 2005; Fayad, 2002; Ferreira dos Santos, 2002, Laufarie, 2007). La alta ocurrencia de estos bacilos entéricos en los pacientes con periodontitis crónica puede ser relevante en el desarrollo y progreso de la enfermedad (Barbosa, 2001; Laufarie, 2007)

No hay reportes de cuantificación de los fenómenos de infección celular de las células eucariotas más frecuentemente implicadas en la enfermedad periodontal al ser infectadas por bacterias entéricas. Existe evidencia experimental que soporta que las células eucariotas al entrar en contacto con patógenos periodontales pueden desencadenar mecanismos de infección e invasión celular (Hakimuddin, 1999; Kato, 2000; Amano, 2003; Andrian 2004). Sin embargo, aun no hay estudios que permitan establecer el posible rol como agente patógeno de las enterobacterias al entrar en contacto con los fibroblastos gingivales humanos (FGH).

Al evaluar *in vitro* la supervivencia del fibroblasto gingival, una de las células más importantes del tejido periodontal frente a la infección con *Escherichia coli* se podrá proveer información para el entendimiento del papel que pueden jugar las enterobacterias en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal.

Por lo tanto se hace necesario realizar estudios de los efectos de las enterobacterias en cavidad oral y así generar conocimiento en el proceso de etiopatogénesis de la enfermedad periodontal, esclareciendo el rol patógeno de las enterobacterias representadas por *Escherichia coli* al infectar los fibroblastos gingivales, los cuales juegan un papel muy importante en la estructura de los tejidos periodontales y en la respuesta del hospedero.

## 2 OBJETIVOS

### **2.1 Objetivo General**

Determinar *in vitro* cambios en la viabilidad de los fibroblastos gingivales, después de su cultivo con un inóculo de una bacteria entérica, *Escherichia coli*

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 2.2.1** Establecer patrones de crecimiento para poblaciones de fibroblastos gingivales humanos
- 2.2.2** Establecer curvas de crecimiento para aislamientos de *Escherichia coli* a partir de bolsas periodontales de pacientes con periodontitis crónica.
- 2.2.3** Determinar los efectos de los aislamientos de *Escherichia coli* ensayada sobre la viabilidad de fibroblastos humanos gingivales

### 3 MARCO TEORICO

#### 3.1 Tejidos Periodontales

El periodonto es definido como aquellos tejidos que revisten y le dan el soporte necesario al diente para mantenerlo en adecuada función. Comprende cuatro tejidos importantes que son la encía, el cemento radicular, el hueso alveolar y el ligamento periodontal. Ver figura 1

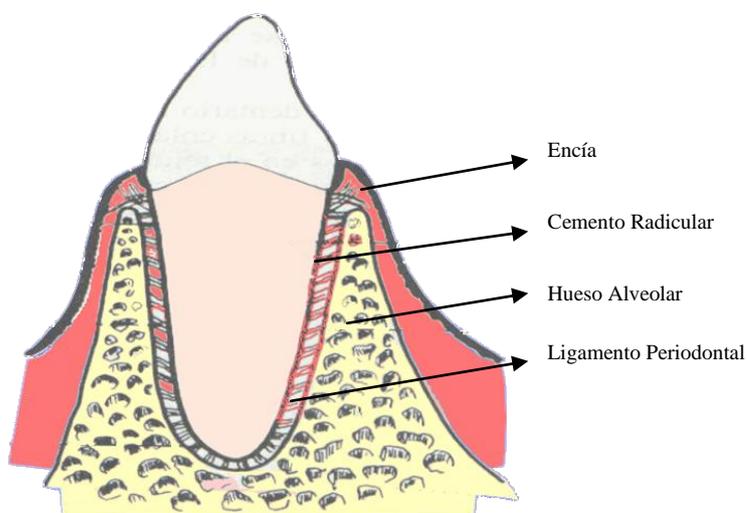


Figura 1. Tejidos Periodontales Lindhe, 2000

Cada uno de estos componentes periodontales es distinto en su localización, arquitectura tisular, composición bioquímica y celular, pero funcionan juntos como una unidad. Cada uno de los componentes periodontales tiene una estructura muy especializada y las características estructurales definen directamente la función. Los componentes de la matriz extracelular de alguno de los tejidos periodontales pueden influenciar las actividades de las estructuras adyacentes y así los cambios patológicos que sucedan en cualquiera de estos tejidos, pueden afectar los procesos de reparación o regeneración de los otros tejidos periodontales (Bartold, 2000).

De los cuatro componentes del tejido periodontal, en este documento tan solo se describirá la estructura de la encía y su tejido conectivo. La encía es parte de la mucosa masticatoria y anatómicamente se divide en áreas marginal, insertada e interdental. La parte de la encía que mira hacia el diente es conocida como la unión dentogingival, es una adaptación de la mucosa oral

que comprende los componentes del epitelio y del tejido conectivo (Glickman, 2000).

### ***3.1.1 Epitelio gingival Oral***

El epitelio esta dividido en tres componentes funcionales; epitelio gingival, epitelio sulcular y epitelio de unión, mientras que el tejido conectivo se divide en superficial y profundo (Glickman, 1999). El epitelio gingival cumple con importantes funciones protectoras y defensivas. Mientras que el epitelio gingival oral y el epitelio del surco son ampliamente protectoras, el epitelio de unión juega un papel de considerable importancia regulando la salud tisular. (Bartold, 2000).

El epitelio bucal o externo cubre la cresta y la superficie externa del margen gingival y la superficie de la encía insertada. Es un epitelio plano estratificado, queratinizado o paraqueratinizado. Consta de una base de células cúbicas, una capa espinosa de células poligonales, una capa de células con gránulos de queratohialina y una capa superficial que puede estar queratinizada o paraqueratinizada. En salud, la interfase entre el epitelio y el tejido conectivo es demarcado por rete pegs, y cuando se desarrolla la inflamación estos se van prolongado. El epitelio se une al tejido conectivo subyacente por medio de una lámina basal sintetizada por las células epiteliales basales (Lindhe, 2000).

### ***3.1.2 Epitelio del Surco Oral***

El epitelio sulcular es el epitelio que tapiza el surco gingival, el cual en salud corresponde a una pequeña hendidura de aproximadamente 0.5 mm de profundidad rodeando al diente entre la superficie dental y el margen gingival. La base del surco gingival es donde se exfolian las células del epitelio de unión. La estructura celular y composición del epitelio del surco es muy similar al epitelio gingival oral, de varias capas, plano estratificado y con frecuencia no queratinizado sin prolongaciones epiteliales y se extiende desde el límite coronal del epitelio de unión hasta la cresta del margen gingival. El epitelio del surco no esta infiltrado por leucocitos polimorfonucleares y parece menos permeable. (Glickman, 2000).

### 3.1.3 Epitelio de Unión

El epitelio de unión proviene del epitelio reducido del esmalte en la medida que el diente hace erupción hacia la cavidad oral formando un collar alrededor de la porción cervical del diente, siguiendo la unión amelocementaria. La superficie libre de este collar constituye el piso del surco gingival. Ver figura 2.

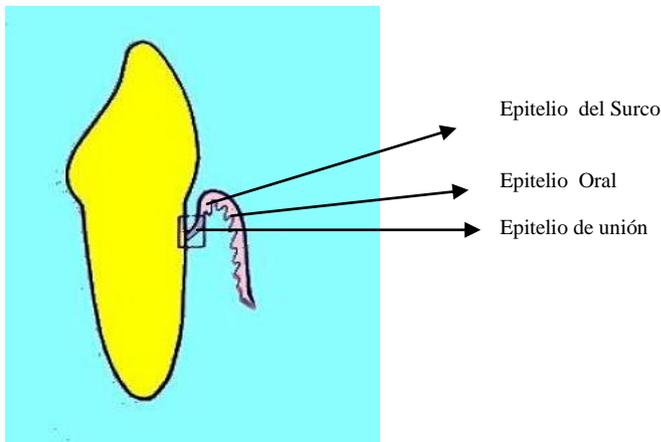


Figura 2. Ubicación Epitelio de unión Glickman, 1998

Básicamente el epitelio de unión es un epitelio escamoso estratificado no diferenciado con un alto recambio celular. La capa de células que miran hacia el diente provee una estructura compleja denominada la inserción epitelial. Este complejo consiste de dos membranas basales, una lámina basal que se adhiere al diente y a la cual se adhiere la capa superficial por medio de hemidesmosomas, involucra el complejo dento epitelial y otra asociada al tejido conectivo subyacente. El epitelio de unión forma la inserción tisular de la encía a las estructuras del diente; es el que sella los tejidos periodontales aislándolos del ambiente oral. Por tanto, su integridad es esencial para mantener la salud periodontal, siendo la primera barrera de defensa (Bartold, 2006 a).

La interfase con el tejido conectivo no se caracteriza por la presencia de rete pegs y tiende a ser recta con leves ondulaciones. A lo largo del epitelio de unión se aprecian migrando numerosos polimorfo nucleares PMN. Estos leucocitos están presentes en salud y aumentan en número con el acumulo de placa bacteriana y se asocian con la inflamación gingival. También se encuentran linfocitos T distribuidos intraepitelialmente. (Bartold, 2000).

La matriz intercelular no solamente juega un papel en la adhesión celular, en la inserción epitelial a la superficie dental y la adhesión a la membrana basal, sino

que también tiene un rol importante en la difusión de agua, nutrientes y materiales tóxicos como antígenos y otros metabolitos de la placa a través del epitelio. Provee el vehículo para el movimiento bidireccional de las sustancias entre el tejido conectivo gingival y la cavidad oral con el egreso de fluido crevicular y el ingreso de partículas extrañas. (Bartold, 2000, Lindhe, 2000).

Esta permeabilidad se considera como uno de los eventos principales asociados en el establecimiento de la enfermedad. La enfermedad periodontal se establece cuando se altera la estructura del epitelio de unión, siendo esto un ejemplo de cómo la estructura determina la función. (Lindhe, 2000). La evidencia reciente indica que la mucosa epitelial, además de su función de barrera protectora y de rápido recambio celular, cumple una función de señalización produciendo citoquinas y expresión de moléculas de adhesión para reclutar neutrófilos y linfocitos específicos que van a controlar la penetración bacteriana, o bien iniciar el desarrollo de la inflamación de los tejidos periodontales (Sugiyama, 2002).

Las células del epitelio de unión difieren considerablemente de las del epitelio gingival. Contienen más organelos citoplasmáticos como retículo endoplasmico y aparato de Golgi; además de poseer espacios intercelulares mas amplios que son llenados con fluido que contiene leucocitos polimorfos nucleares y monocitos que pasan desde el conectivo subepitelal dentro del surco gingival. Estas células mononucleares, junto con las moléculas que secretan y otras derivadas de las células del epitelio de unión, de los fluidos de los tejidos y la sangre representan la primera línea de defensa en el control del ataque microbiano. Dentro de estas moléculas están el alfa y la beta defensinas, catelicidina LL37, Interleuquina (IL)8, IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral alfa (TN $\alpha$ ), molécula de adhesión intercelular 1 y antígeno de función linfocítico -3. (Kornman, 1997)

### ***3.1.4 Tejido Conectivo gingival***

El tejido conectivo gingival normal consiste de fibras colágenas altamente organizadas, proteoglicanos ricos en leucina y componentes derivados del plasma tales como fibronectina, osteonectina, tenascina, albúmina y algunas fibras de elastina (Bartold, 2006, b).

El tipo de colágeno varía según el sitio de localización, origen e inserción. Así el colágeno tipo I y III y XII se localiza inmediatamente por debajo del epitelio gingival y a nivel del ligamento periodontal, mientras que el colágeno tipo VII se localiza a nivel de las fibrillas de anclaje de la membrana basal del epitelio gingival oral. El colágeno tipo III aparece localizado como fibras finas organizadas en un patrón reticular cerca de la membrana basal del epitelio de unión. El colágeno tipo IV es el mayor componente a nivel de lámina densa de la membrana basal que une el tejido conectivo con el epitelio y cemento, en los rete pegs y alrededor de los vasos y nervios. También se ha reportado colágeno tipo VI cerca de la membrana basal. Los estudios con inmunotinciones han revelado que el colágeno tipo V tiene un patrón de filamentos paralelos que cubre a las fibras tipo I y III. (Bartold, 2000, 2006, b).

El colágeno tipo I es el más importante en todas las capas del tejido conectivo gingival. Las fibras de colágeno están orientadas en dos patrones de organización, uno consiste en bandas largas y densas de fibras gruesas, y el otro tiene un patrón corto de fibras delgadas mezcladas con finas fibras reticulares; esta organizado en fibrillas densas a nivel de la lámina propia, no está restringido a alguna región en particular. Tiene un patrón más difuso a nivel de la lámina propia. (Bartold, 2000 y 2006; Acosta, 2006).

La célula que predomina es el fibroblasto y se encuentra uniformemente distribuido, también hay algunos macrófagos y uno que otro leucocito sin embargo, no se observan células inflamatorias. La población de los fibroblastos no es homogénea, existe variación en cuanto a su forma, proliferación, expresión de marcadores de membrana y función. Los fibroblastos son los responsables de la producción y mantenimiento de los componentes de la matriz extracelular, incluyendo la reparación (Wang, 2002).

### ***3.1.5 Fibroblasto***

El fibroblasto es la célula más común y predominante de los tejidos conectivos del ser humano. Es de origen mesenquimal e históricamente se le consideró de naturaleza uniforme y de contribuir pasivamente a los tejidos respondiendo solamente cuando fuera requerido y se creía que eran de limitada variabilidad debido a su estado diferenciado. Sin embargo, recientemente se ha

demostrado que tiene muchos comportamientos debido a su fenotipo, respuesta a las citoquinas y factores de crecimiento y a su papel en los tejidos (Wang, 2002).

Bajo el microscopio de luz, los fibroblastos son normalmente reconocidos en asociación con agrupaciones de fibras colágenas. En reposo, en cortes coloreados con hematoxilina y eosina estos se presentan como células achatadas o ahusadas, con finas prolongaciones, núcleo oval cerrado, algo achatado y escaso citoplasma, el cual es eosinofilo. Contiene de uno a dos nucléolos y escasa cromatina finamente granulada. En actividad, como es el caso del fibroblasto del ligamento periodontal, presenta un núcleo abierto con una coloración más pálida y mucho más contenido citoplasmático (Bartold, 2000).

La morfología y ultraestructura del fibroblasto ha sido bien estudiado *in vivo* demostrando que tiene una típica forma de estrella alargada con prominentes organelos citoplasmáticos verificado por estudios bajo el microscopio electrónico, donde los fibroblastos activos cuentan con una cantidad de organelos complementarios dentro de los cuales se observan numerosos complejos de Golgi y perfiles de retículo endoplasmico rugoso, mitocondrias y vesículas secretoras, todos indicativos de la actividad sintética y secretora manifiesta por este tipo de células. Así mismo es posible apreciar la presencia de un citoesqueleto complejo, constituido por un sistema de microtubulos y microfilamentos, no móviles, pero se aumentan y se vuelven prominentes cuando se requiere actividad de migración, estos completan el patrón de complejidad estructural de esta célula multifuncional. Rara vez se ven en contacto uno con otro; ellos tienden a existir de forma aislada adheridos a la matriz circundante de colágeno y otras glicoproteínas (Acosta, 2006).

*In vitro*, estas células pueden variar en su apariencia, lo cual incluye mayor expresión de microfilamentos intracelulares y de fibras; además, se encuentran en contacto directo unas con otras a través de uniones tipo gap.

Una vez diferenciados, los fibroblastos poseen la capacidad de replicarse mediante divisiones mitóticas que varían en número dependiendo si los fibroblastos provienen de tejido embrionario o adulto antes que adquieran una condición de senescencia y mueran. (Acosta, 2006)

Posee funciones muy particulares como son la formación de fibras colágenas (95% de colágeno tipo I) y de elastina. Sin embargo cumple otras funciones igualmente importantes como son la producción y mantenimiento de la sustancia fundamental; son los responsables primarios de la síntesis de la matriz extracelular, capacidad de sintetizar y fagocitar el colágeno y los componentes de la matriz extracelular en el proceso de remodelación del tejido conectivo; organización estructural del tejido conectivo y regulador del espacio del ligamento periodontal. (Bartold, 2000)

Actualmente está establecida la heterogeneidad de los fibroblastos que residen en el periodonto. Las diferencias van desde la morfología, ultra estructura, proliferación, síntesis de la matriz y capacidad de respuesta sin estar dilucidadas las implicaciones biológicas y clínicas de estas variaciones a nivel de las diferentes poblaciones. Estas funciones son necesarias para el normal funcionamiento de los tejidos en salud, enfermedad y reparación. Por ejemplo, las poblaciones heterogéneas pueden representar subgrupos de células responsables de una alta variedad de actividades que incluyen la fibrogénesis, formación de los tejidos conectivos o comunicación intercelular. Los fibroblastos están involucrados en una cantidad de procesos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos por la vía de la fagocitosis y la secreción de colagenasas. Uno de los principales mecanismos mediante el cual sucede la remodelación de los tejidos es a través de la fagocitosis del colágeno por parte de los fibroblastos durante el proceso de recambio tisular (Bartold, 2006, b).

Los fibroblastos (incluyendo los fibroblastos gingivales) sintetizan un alto rango de metalaproteinasas capaces de degradar el colágeno, los proteoglicanos y otros componentes de la matriz. Estas enzimas junto con las inhibidoras ayudan a una degradación controlada de la matriz para lograr una remodelación adecuada. (Bartold, 2000).

Por lo anteriormente descrito, queda claro que los fibroblastos son muy sensibles a los cambios en el medio que los rodea, como son los cambios a nivel de la matriz circundante. Estas células no solo tienen la habilidad para responder de acuerdo a los mensajes recibidos, a las señales paracrinas, sino también pueden secretar un número de factores de crecimiento, citoquinas y

productos metabólicos que van a direccionar la actividad celular de una manera autocrina. (Wang, 2002)

Además de regular la síntesis de la matriz y su remodelación, los fibroblastos poseen dos propiedades críticas para su funcionamiento. Estas son la habilidad para indicar el sitio de migración (quimiotaxis) y la capacidad de adherirse a varios sustratos. Después de producirse una herida en los tejidos, la cicatrización requiere del reclutamiento de células con capacidad de regeneración. La habilidad de los fibroblastos para migrar, hace que se alargue y emita unas pequeñas extensiones llamadas lamelopodios que se adhieren al sustrato. Después de la interacción entre las integrinas, que son moléculas receptoras de la superficie celular y la matriz, suceden cambios a nivel del citoplasma del fibroblasto como son el re arreglo de los túbulos de miosina y los filamentos de actina, y así la célula es capaz de empujarse en dirección a la posición del lamelopodio y migrar. Se han descrito más de diez quimioatrayentes para los fibroblastos, muchos de los cuales están presentes en abundancia a nivel de los tejidos inflamatorios (Arce, 2007).

Una vez se reclutan los fibroblastos en el sitio del trauma, los fibroblastos son capaces de inmovilizarse por sí solos e iniciar la síntesis de la matriz. La capacidad de adherirse a varios sustratos ha sido un tema de interés ya que sus ramificaciones no solamente sirven para regeneración y reparación sino también para transformaciones malignas. De hecho la adherencia de estas células a la matriz extracelular es crítica para mantener la adecuada forma celular, función e integridad celular. Los mecanismos involucrados en la adhesión célula-matriz requieren del reclutamiento de receptores de adhesión y el consecuente ordenamiento de las proteínas cito esqueléticas que incluyen procesos intra y extracelulares. Esta interacción entre las moléculas de adhesión y sus receptores conlleva a la activación de varias vías de señalización importantes en el control de eventos diversos como pueden ser la adhesión celular, migración, apoptosis y regulación génica. (Wang, 2002)

Los fibroblastos actúan como células centinelas en el sistema inmune mediante la producción de citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-8 quimioquinas y sus receptores (Ishikawa, 1997).

En el periodonto los patógenos bacterianos interactúan constantemente con las células epiteliales de la encía, los fibroblastos y células inflamatorias. Los

patógenos bacterianos son reconocidos por los receptores tipo Toll que son proteínas evolutivas conservadas que reconocen patrones moleculares microbianos; estos han sido descritos también para los fibroblastos, a los cuales se les une el lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* y después activan un sistema de segundos mensajeros (Wang, 2002).

Se ha demostrado la producción de otras sustancias que potencializan su actividad funcional y además actúan como marcadores de identificación. Dentro de estas sustancias se encuentran: a) fosfatasa alcalina, un marcador de diferenciación temprana para células formadoras de tejido mineralizado, se presenta en altas concentraciones en tejido óseo en crecimiento y posee gran afinidad por el hialuronato; b) Factor inhibidor de reabsorción ósea, inhibe la reabsorción mediada por la hormona paratiroidea. c) Proteína no colágena de 15KD rica en ácido aspártico, glutámico, glicina, alanina, leucina y lisina. d) Proteína ósea gla, marcador específico de célula osteoblástica, es una proteína de unión al calcio. e) Nódulos mineralizados de una forma inmadura de hidroxapatita, f) osteonectina, g) Bialucan, un proteoglicano óseo pequeño, h) Prostaglandina E<sub>2</sub> y Tenascina, una glicoproteína antagonista a la fibronectina (Acosta, 2006).

Los fibroblastos gingivales (FG) y los fibroblastos del ligamento periodontal (FLP), son las dos poblaciones celulares que residen dentro del periodonto. Los FLP tienen la responsabilidad de producir, mantener y remodelar el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Una población que tiene un papel importante en la respuesta inmune periodontal son los fibroblastos gingivales humanos (FGH). Como ya se explicó están comprometidos en el funcionamiento normal y anormal de los tejidos periodontales, en su desarrollo, mantenimiento, reparación y defensa. Los FG poseen una tarea igualmente importante, como es la producción y el mantenimiento de la lámina propia del tejido gingival blando. Estos fibroblastos producen y mantienen los componentes extracelulares que proveen la integridad del tejido gingival. (Arce, 2007)

Al observar bajo el microscopio invertido de luz, ambos tipos celulares revelan forma estrellada y alargada. Sin embargo, hay reportes que los FLP poseen lagunas de glicógeno dentro de su citoplasma, las cuales alojan numerosas

bandas de microfilamentos contráctiles, que no se han observado en los fibroblastos gingivales (Arce, 2007; Acosta 2006).

Los fibroblastos alteran sus funciones normales en respuesta a citoquinas proinflamatorias. En la lesión gingival inicial, una de las características más importantes es la reducción del número de fibroblastos por campo. Se ha sugerido que los fibroblastos gingivales FGH interactúan con los productos bacterianos y podrían inducir apoptosis en respuesta a la activación de la vía extrínseca y así pueden disminuir su número y/ o pueden eliminarse por medio de la apoptosis (Arce, 2007).

La adherencia e infección de las bacterias orales a los fibroblastos ha sido previamente descrita. Ha sido demostrada alteración en el citoesqueleto de los fibroblastos gingivales después de haber sido tratados con el LPS de *Aggregatibacter actinomycetenum* (Gutiérrez-Venegas, 2007; Hellen, 1999). Se estableció con *Porphyromonas gingivalis* modelos in vitro de penetración y destrucción de células del tejido conectivo gingival como células epiteliales y fibroblastos (Andrian, 2004; Chen, 2001). Con estudio de microscopia electrónica se mostró que los FGH pueden ser penetrados por *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* (Dogan, 2000). *Porphyromonas gingivalis* puede tener efecto citotóxico sobre los fibroblastos (Johansson, 1996). No hay reportes que evalúen los aislamientos clínicos de enterobacterias como *Escherichia coli* infectando e induciendo alteraciones en la viabilidad de los fibroblastos gingivales.

También se ha visto que los fibroblastos aislados de tejidos enfermos producen colagenasas, mediadores inflamatorios y citoquinas como la interleuquina 6 (IL-6) y además pueden sobrevivir al efecto de algunas toxinas como la citoletal de distensión CDT producida por *Aggregatibacter actinomycetenum* (Duncan, 2004; Kato, 2000). Bajo condiciones inflamatorias, el fibroblasto contribuye a la inactivación del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) escondiendo a su receptor (Wang, 2002). Recientemente se ha reportado que el receptor CD14 se puede expresar tanto en la membrana del fibroblasto (M – CD14) como en forma soluble (sCD14) (Kato, 2000).

### ***3.2 Enfermedad Periodontal***

La enfermedad periodontal representa un grupo de varias enfermedades inflamatorias de la encía y de los tejidos de soporte del periodonto con diferentes presentaciones clínicas y mecanismos de patogenicidad. (Bartold, 2006, a), siendo el biofilm dental la etiología principal, cuyos productos celulares y metabólicos van a proveer antígenos bacterianos que pueden tener un efecto directo o indirecto sobre la respuesta innata del hospedero. Esta respuesta incluye infiltración linfocítica y la subsecuente secreción de citoquinas, las cuales conllevan a la destrucción de los tejidos periodontales duros y blandos (Darveau, 1997 ).

Como síntomas principales de la periodontitis se han descrito: la inflamación con presencia de bolsas verdaderas y pérdida ósea (pérdida de inserción) las cuales se presentan con diversas variaciones y grados de severidad conllevando a la pérdida dental o de sus sustitutos como los implantes. Pueden estar complicadas por otras alteraciones patológicas adicionales (Lindhe, 2000).

Esta patología ha sido clasificada en: gingivitis, periodontitis, enfermedades necrosantes y de afectación sistémica, siendo la gingivitis una inflamación de la encía que no altera las estructuras de soporte y es de carácter reversible. Sin tratamiento es posible que permanezca estacionaria durante años con oscilaciones de pequeña intensidad o puede evolucionar a periodontitis (Armittage, 1999).

La enfermedad periodontal es un complejo multifactorial que involucra múltiples especies bacterianas, e interacciones celulares del hospedero. Todo esto condicionado por factores de riesgo tanto innatos como adquiridos. (Ver Figura 3). Ha sido implicada en patologías sistémicas de tipo inflamatorio como la aterosclerosis; además se le considera como factor de riesgo para ocasionar alteraciones sistémicas tales como enfermedad cardiovascular e infartos (Pogulske, 1999; Cohen, 1998), bebés pretérmino y bajo peso al nacer (Offenbacher, 1999) y enfermedad respiratoria (Pesola, 2004).

Las especies bacterianas que se han identificado como periodontopatógenas, producen y liberan una serie de moléculas biológicas que actúan en los tejidos del hospedero destruyendo su integridad. Estos factores de virulencia van a

causar que el hospedero responda de tal manera que ocasione su propia destrucción (Pogulske,1999) desencadenando una respuesta inmune que protege a la bacteria de las defensas del hospedero (Holt, 2000). Ver Figura 3. La interacción entre un patógeno y el hospedero durante la enfermedad es una acción dinámica en la cual la estrategia ingeniosa de las bacterias para sobrevivir y multiplicarse es confrontar las defensas formidables del hospedero (Lindhe, 2000). La respuesta inmune que se desencadena por acción del ataque microbiano en la enfermedad periodontal es un arma de doble filo: por una parte, los microorganismos atacando, y por la otra el huésped tratando de defenderse. El mantener un equilibrio entre estas dos propiedades en conflicto y preservar la salud, se asegura por inmunoregulación. La enfermedad periodontal es un ejemplo donde la respuesta del huésped es incapaz de eliminar a las bacterias causantes de la patología (Kinane, 2005). Ver figura 3.

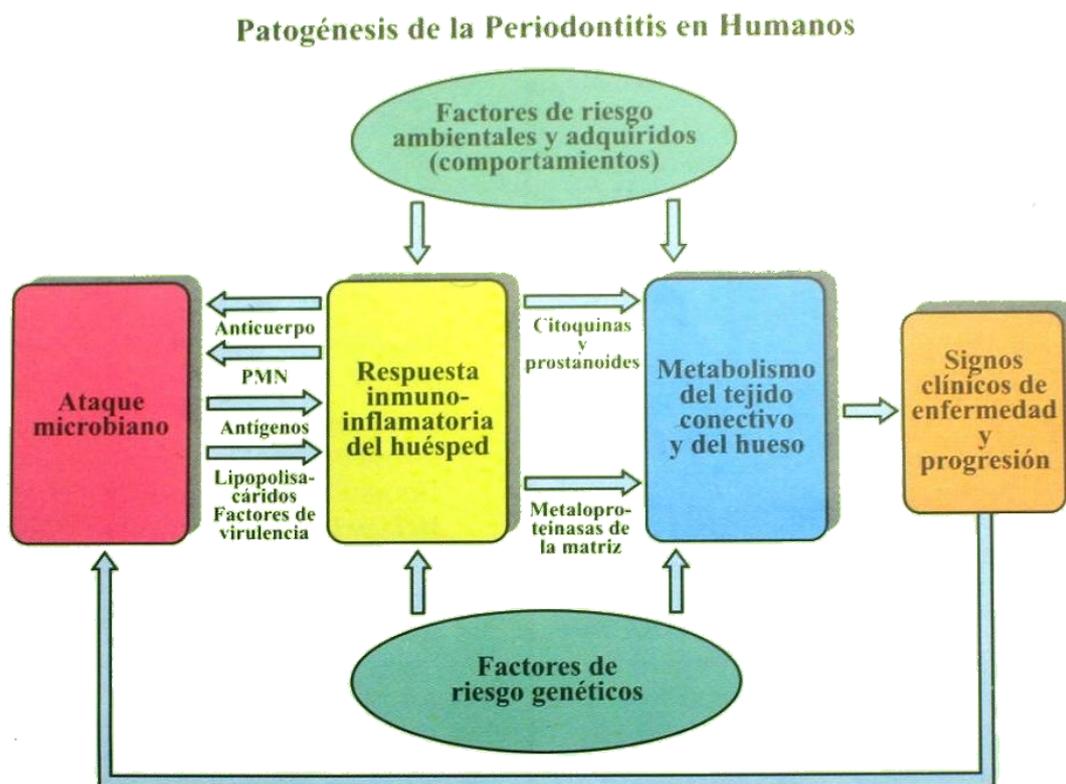


Figura 3. Patogénesis de la Enfermedad Periodontal. Page y Kornman, 1997

El proceso de patogénesis de la enfermedad se explica de la siguiente manera: las bacterias del biofilm y sus productos interactúan con el epitelio de unión y penetran dentro del tejido conectivo subyacente. El pequeño plexo de vasos

sanguíneos que rodea al epitelio de unión se inflama y los leucocitos salen de las vénulas post-capilares, incrementándose el número de neutrófilos que migran a través del epitelio de unión hasta el surco gingival. El colágeno peri vascular se destruye al igual que otros componentes de la matriz extracelular. En la medida en que el biofilm se va extendiendo hacia apical dentro del surco gingival, proliferan las células coronales del epitelio de unión formándose la bolsa periodontal. Posteriormente, las células apicales del epitelio de unión proliferan y migran hacia apical a lo largo de la superficie radicular convirtiéndose en un epitelio ulcerado. En una fase temprana, hay un predominio de infiltrado leucocitario, al igual que linfocitos B y T con características tanto de células T-helper Th1 y Th2. Subsecuentemente, la lesión es dominada por las células B, que se van a diferenciar en plasmocitos. En esta etapa de la lesión, también persisten los linfocitos T que son activados antigénica o mitogénicamente para replicarse. En la medida que la enfermedad empeora, la bolsa se profundiza y los componentes de la matriz extracelular de la encía y del ligamento periodontal se destruyen y el hueso alveolar es reabsorbido (Kornman, 1997; Page, 1997). Ver figura 4

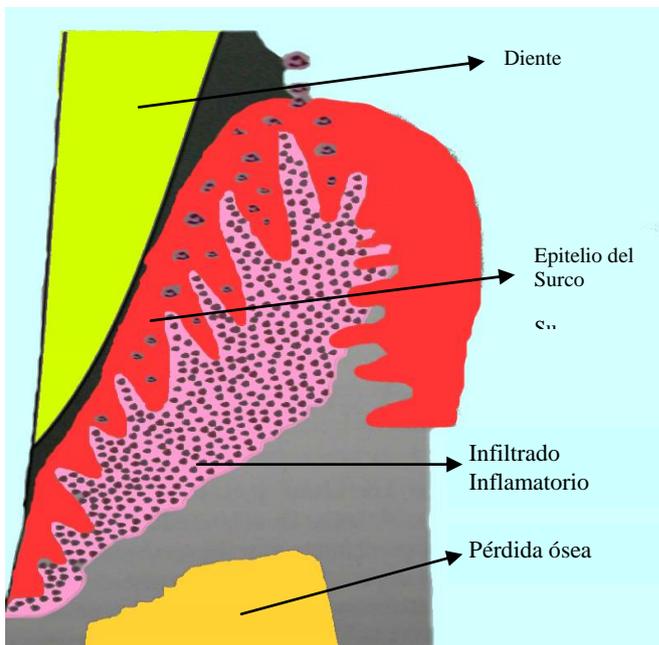


Figura 4. Lesión Avanzada Page, 1997

Los estudios histomorfométricos de los tejidos gingivales sanos y enfermos demuestran que a medida que la inflamación se desarrolla, disminuye el volumen de los tejidos ocupados por los fibroblastos, alterándose el

metabolismo del tejido conectivo; es decir, que se degradan los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina además de la alteración de la síntesis y el balance del colágeno. Se activan las metaloproteinasas (colagenasas, gelatinasas, estromalisinas y metaloproteinasas) de matriz producidas por los macrófagos y fibroblastos del hospedero (Andrian, 2004; Ishikawa, 1997). Ver ilustraciones 3 y 4.

### ***3.2.1 Microbiología de la Enfermedad Periodontal***

La etiología microbiana de la periodontitis ha sido estudiada extensivamente. Es claro que un consorcio de bacterias participan en la iniciación y progreso de la enfermedad junto con los factores determinados por el hospedero modificados por los aspectos ambientales y genéticos (Page,1997; Kinane, 2005; Feng, 2006).

La transición de salud a enfermedad en los tejidos periodontales está acompañada de cambios en la microflora predominantemente de cocos aerobios gram-positivos a bacilos anaerobios gram-negativos , estableciéndose dos tipos de sucesión microbiológica: la autogénica donde la secuencia de especies se da porque la población residente altera el medio de tal manera que son reemplazadas por otras especies que se adaptan mejor al habitat modificado. Y la sucesión alogénica , donde un tipo de comunidad es reemplazado por otra porque su habitat es alterado por factores no microbianos, como cambios en las propiedades químicas o físicas, o por cambios en el hospedero (Socransky, 2005).

En la mayoría de los estudios de microbiología periodontal realizados en diferentes poblaciones se ha encontrado un patrón común en el componente bacteriano de los pacientes con periodontitis, estableciéndose un perfil microbiológico de acuerdo al área geográfica, aspectos raciales, hábitos, condiciones de vida etc. (Sedgley, 1997; Barbosa, 2001; Botero, 2005). Del total de bacterias clasificadas en la microbiota oral específicamente a nivel de la placa subgingival, se estima que están presentes 415 especies (Feng, 2006). Pero no son todos estos microorganismos los responsables de la progresión biológica de una encía sana a la destrucción de los tejidos periodontales de soporte. Tan sólo unas pocas especies bacterianas presentes en el surco

gingival tienen carácter periodontopatogénico (Haffajee, 1994). Los parámetros clínicos de la periodontitis tales como el sangrado al sondaje y la profundidad de la bolsa han sido relacionados con la microbiota subgingival específica (Socransky, 2004). Dentro de ellas, las más implicadas son: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Dialister pneumosintes*. Además de bacterias periodontopáticas presentes dentro del biofilm dental, se ha aislado microflora no usual de muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica y de lesiones de mucosa peri-implantar, sin estar dilucidado su papel en la patogénesis de la enfermedad periodontal. (Sedgley, 1997; Doan, 1999; Barbosa, 2001; Botero, 2005; Laufarie, 2007; Fayad, 2002, 2007).

Los complejos microbianos han sido asociados según la secuencia de colonización en la superficie dental y según la severidad de la enfermedad. Es así que el denominado “complejo rojo” aparece en la fase tardía del desarrollo del biofilm dental y corresponde a los sitios que expresan periodontitis activa. Este complejo comprende los patógenos periodontales *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*. (Edwards, 2005; Socransky, 2005). Ver Figura 5

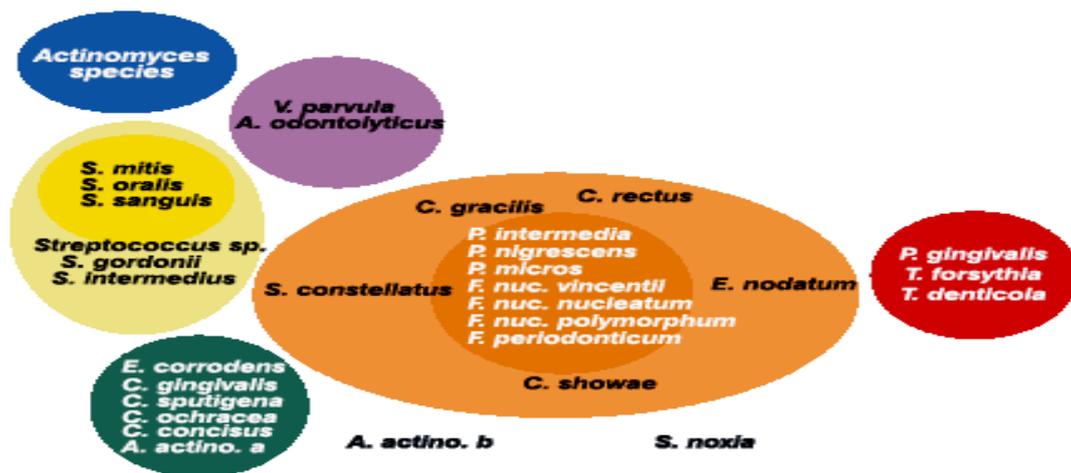


Figura 5. Complejos Microbianos. Socransky and Haffajee, (2005) Periodontology 2000.

En condiciones de salud gingival, el epitelio está expuesto a varios productos de las bacterias y para que las bacterias periodontopáticas causen la enfermedad periodontal, es esencial que sean capaces de adherirse, colonizar

la bolsa periodontal y producir factores de virulencia que afecten directamente los tejidos del hospedero o que en conjunto liberen grandes cantidades de metabolitos como ácidos grasos, ácido butírico o propiónico y péptidos del tipo *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina que pueden ser tóxicos o actuar como quimo-atrayentes ( Takii, 2005; Kornman, 1997; Holt, 2000).

Los factores de virulencia son las moléculas producidas por unos microorganismos capaces de cumplir varias funciones: habilidad para inducir las interacciones hospedero-bacteria (adherencia); habilidad para invadir al hospedero; habilidad para crecer en los confines de la célula hospedera y habilidad para evadir las defensas del hospedero. Dentro de estos factores de virulencia se encuentran los componentes de la pared bacteriana, las cápsulas, los pilis y varias enzimas tipo proteasas (Holt, 2000).

De los moduladores bacterianos que intervienen en la respuesta inmunoinflamatoria mas estudiados ha sido el lipopolisacárido (LPS). El lipopolisacárido es un componente clave de la pared de las bacterias gram-negativas y está compuesto de azúcares, fosfatos y ácidos grasos que producen el lípido A. El lípido A producido por el lipopolisacárido de las bacterias orales tiene la misma estructura que el de las enterobacterias, su estructura completa ha sido estudiada para pocas especies, y es bien conocida para *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* siendo similar su estructura al lípido A de *Escherichia coli* (Dixon, 2004; Duncan 2004; Martin, 2001).

### **3.2.1.1 *Porphyromonas gingivalis***

Es un bacilo corto pleomórfico, gram negativo, anaerobio no fermentativo frecuentemente aislado de muestras de biofilm subgingival. De manera rutinaria se le reporta como una de las bacterias patogénicas más importantes asociada a varias enfermedades periodontales caracterizadas por pérdida ósea alveolar. Existen al menos tres serogrupos antigénicamente diferentes, A, B y C que producen factores asociados con virulencia. Específicamente, estas especies muestran capacidad de adherirse a una variedad de tejidos y células del hospedero, demostrando facilidad para invadir y multiplicarse. Dentro de estos factores de virulencia se incluyen moléculas y estructuras que son esenciales para interactuar con el hospedero. Se han estudiado a sus factores de

colonización como la cápsula y pilis, enzimas como colagenasas tipo I y IV, gingipainas, proteasas, hemaglutininas y lipopolisacáridos entre otros (Guilarte, 2005; Holt, 2000; Takii; 2005; Slots, 2000).

La viabilidad de algunas bacterias periodontopatógenas como *P. gingivalis* y su habilidad para replicarse dentro de las células del hospedero han sido estudiadas por microscopía confocal (Houalet, 2001), por medio de la expresión de los productos de sus genes (Yoonsuk, 2004), y por modelos in vitro que demuestran su capacidad de penetración y de destrucción (Rudney, 2001, 2005 y Andrian, 2004). También se ha evaluado su efecto en la viabilidad a nivel de células endoteliales demostrando que la bacteria puede modular la respuesta de las citoquinas de estas células conllevando a su muerte (Baba, 2002; Sheets, 2005). Ha sido demostrado que la proteasa de *Porphyromonas gingivalis* puede causar muerte en los fibroblastos gingivales humanos, indicando que la misma enzima puede contribuir a la iniciación de la infección y al desarrollo de la enfermedad periodontal in vivo (Wang, 1999; Amano, 2003; Chen, 2001).

La inducción de apoptosis de los fibroblastos gingivales humanos por *Porphyromonas gingivalis* y sus proteasas ha sido estudiada (Wang, 1999, Urnowey; Marriott, 2005; 2006, Arce, 2007 y Stathopoulou en 2009). *P. gingivalis* induce poca apoptosis en FGH a tiempos tempranos, pero es significativa a las 24 horas de cultivo (Urnowey, 2006). Los resultados de estos estudios sugieren heterogeneidad en la habilidad de las diferentes cepas de *P. gingivalis* para adherirse a los fibroblastos gingivales como la cepa ATCC 33277 que es altamente adherente pero no invasiva (Pathirana, 2007).

### **3.2.1.2 Bacterias Entéricas**

Ya se ha observado que las bacterias entéricas están presentes en muestras de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica y periimplantitis en un rango del 14% al 57% en diferentes poblaciones del mundo (Barbosa, 2001; Botero, 2005; Fayad, 2002, Laufarie, 2007). En Brasil, se han encontrado en una frecuencia de 31.2%. En las poblaciones asiáticas la prevalencia de las bacterias entéricas se reporta en un rango del 57% (Sedgley, 1997). Los estudios realizados en Colombia han mostrado una frecuencia de aislamiento del 39.2% (Fayad, 2002, 2007) y de 32.5% (Laufarie, 2007) evidenciándose

una prevalencia importante de estos microorganismos en placa subgingival en nuestra población. Las diferencias entre regiones fue mas alta en la región central y más baja en Bogotá (Laufarie, 2007). La especie *Enterobacter cloacae* ha sido la más prevalente, seguidas de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*. *Escherichia coli* ha mostrado una prevalencia del 7%. La alta ocurrencia de estos bacilos entéricos en los pacientes con periodontitis crónica puede ser importante en la patogénesis de la enfermedad (Barbosa, 2001; Guilarte, 2005).

Las enterobacterias se encuentran en el origen de gran número de infecciones oportunistas y juntas con las *Pseudomonas*, constituyen un porcentaje elevado de las infecciones hospitalarias. Son muy ubicuas, difunden en el medio ambiente y son capaces de sobrevivir en medios mínimos y capaces de colonizar las mucosas incluida la oral (Nanninga 1198). Ciertas especies de bacterias pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* son patógenos oportunistas en humanos y los estudios epidemiológicos de varias partes del mundo reportan diferente prevalencia de estas bacterias a nivel de la cavidad oral en poblaciones sanas (Barbosa, 2001). Estos microorganismos también han sido aislados de la cavidad oral de pacientes que usan prótesis removable, atribuyéndoles ser la causa del mal olor (Golberg, 1997).

Los bacilos coliformes, comprenden un grupo de bacterias pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, que forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal en humanos y animales y que son usados como indicadores de condiciones sanitarias. La vía exógena más importante para el ingreso de estos microorganismos al organismo humano es la cavidad oral. En varios estudios se ha observado un aumento significativo de coliformes a nivel oral y en fuentes exógenas de contaminación como cepillos dentales, expuestos en ambientes como el de los baños. La presencia de coliformes en cavidad oral se ha asociado a hábitos de mala higiene oral, ingesta de agua y comida contaminada por inadecuada manipulación, contaminación oro fecal, uso indiscriminado de antibióticos y auto inoculación con instrumentos de higiene oral como los cepillos dentales y también han sido asocia asociados a situaciones de inmunosupresión (Golberg, 1997). Aunque no se ha estimado el impacto de la cavidad oral como reservorio de estos microorganismos

oportunistas que afectan la salud sistémica, estas especies han sido asociados a un desequilibrio de la flora oral relacionada con la periodontitis, favoreciendo la progresión de la enfermedad y afectando la respuesta al tratamiento. Su presencia en cavidad oral ha sido asociada con xerostomía, hospitalizaciones y terapias antibióticas crónicas. Diversos autores señalan que las bacterias presentes en la saliva, pueden ser consideradas bacterias planctónicas, sin embargo, estas pueden llegar a adherirse sobre superficies duras (diente, reconstrucciones, prótesis e implantes) formando biopelícula dental y favoreciendo la transición hacia patologías orales como es la enfermedad periodontal (Scolozzi, 2005).

Estos microorganismos por lo general, son de fácil cultivo y poco exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales ya que tienen la capacidad de sobrevivir en medios relativamente simples. Las enterobacterias pueden presentar factores de virulencia capaces de agravar el cuadro periodontal ya que han sido implicadas en casos de periodontitis refractaria y se ha demostrado su capacidad de adherencia a *Candida albicans* (Biasoli, 2003). Además de dificultar los tratamientos convencionales, el reservorio de estos microorganismos puede comprometer la vida de pacientes debilitados sistémicamente; cumplen un papel importante en el desarrollo de infecciones oportunistas como septicemia, neumonía, meningitis e infecciones del tracto urinario. Los géneros más relacionados con estas patologías son los miembros de esta familia, *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, *Escherichia* spp y *Klebsiella* spp, considerados indicadores de contaminación fecal (Ferreira dos Santos, 2002). Están ligadas con el pobre control de la contaminación cruzada (mano-a-boca) y en general, con el desconocimiento de las medidas de higiene adecuadas (correcto lavado de manos y alimentos), siendo estos factores de riesgo importantes dentro del manejo simultáneo de la enfermedad (Golberg, 1997).

El género *Escherichia*, y su principal especie, ***Escherichia coli*** están constituidos por enterobacterias móviles que fermentan la lactosa y la glucosa, con producción de gas y ácidos, fermentación ácido-mixta (Koneman, 1987). Es un bacilo gram negativo poco exigente en su necesidad nutritiva y relativamente resistente a los agentes externos y a un gran número de antibióticos. Forman la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia

facultativa del tubo digestivo. Es frecuente que se encuentre en el medio ambiente donde es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos.

*Escherichia coli* tiene una estructura antigénica específica con antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y en las fimbrias (F). Se conocen alrededor de 167 antígenos somáticos, 103 capsulares, 75 antígenos H y alrededor de 12 antígenos F que ha permitido establecer una clasificación de *Escherichia coli* en grupos O y serotipos, algunos de los cuales están relacionados con cuadros patológicos (Nanninga, 1998). Las fimbrias actúan por su capacidad de adherencia. Las fimbrias tipo 1 o manosa sensible (MS) son muy ubicuas y se encuentran en la mayoría de *Escherichia coli* aisladas. Se considera que facilitan la adherencia al intestino y a la mucosa urinaria. Las fimbrias manosa resistentes (MR) denominadas también factores de colonización, facilitan la fijación en receptores específicos de las células de las mucosas. Por otra parte, los antígenos O y K presentan propiedades antifagocitarias e inhibitoras de las sustancias bactericidas del suero y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas, cuyas síntesis está codificada por plásmidos de elevado peso molecular (Nanninga, 1998).

Al igual que todas las enterobacterias, presentan una endotoxina ligada al lipopolisacárido, en especial al lípido A. Pero además, algunas cepas pueden producir exotoxinas cuya síntesis están codificadas por la presencia de plásmidos, que a su vez pueden tener genes asociados con la capacidad de adherencia y otras propiedades, como la producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antibióticos. Existen cepas de *Escherichia coli* caracterizadas por su capacidad de penetrar e invadir las células del epitelio intestinal y se considera que la capacidad de penetración es debida a la presencia de antígenos superficiales, en especial de proteínas de la membrana externa. Algunas cepas son hemolíticas y se han descrito dos hemolisinas, una asociada al soma bacteriano y otra difusible, cuya importancia como determinantes de la patogenicidad no está clara. Como patógeno primario, *Escherichia coli* puede intervenir en procesos patológicos verdaderos como son las infecciones intestinales con diarrea y, como oportunista puede ocasionar cuadros extraintestinales diversos, como es el reporte de osteomielitis mandibular (Barbosa, 2001; Hajishengallis, 2005; Scolozzi, 2005).

### **3.3 Cultivos Celulares**

La técnica de explante para cultivos primarios fue originalmente descrita por Harrison en 1907 y por Carrel en 1912 quien introdujo el método aséptico. Los cultivos primarios son obtenidos del aislamiento de células provenientes de un tejido, incluyen el crecimiento celular inicial hasta antes de su subcultivo. En el cultivo y crecimiento de fibroblastos gingivales humanos se puede emplear el método de cultivo estacionario o en monocapa cuya característica es la afinidad de las células por un soporte. En este tipo de cultivo se debe cambiar el medio y en segundo lugar se requiere de repicaje o pasaje, que consiste en transferir la población celular de una placa de cultivo donde toda la superficie esta cubierta a otra u otras placas nuevas (Freshney, 2000; González y Pereira, 2002).

Los cultivos primarios conservan las propiedades de las células iniciales en los primeros dos o tres pasajes pero el crecimiento celular disminuye con el aumento del número de los mismos y/o cuando las células pierden alguna de sus propiedades biológicas. El crecimiento de las células en un cultivo celular primario depende de la supervivencia de estas a las diferentes técnicas de disgregación y a la capacidad de adherirse al sustrato y sobrevivir en suspensión. La proliferación depende de la presencia de estas células competentes no diferenciadas capaces de proliferar en condiciones de cultivo especiales y su crecimiento esta sujeto al espacio disponible hasta que se desencadene el fenómeno de inhibición por contacto (Freshney, 2000; Grady, 1960).

En la técnica de cultivo por explantes, las biopsias son fragmentadas y se adhieren al frasco de cultivo. Los fragmentos se mantienen en condiciones óptimas que permiten que el fibroblasto migre a partir del fragmento de la biopsia e inicie su crecimiento por divisiones sucesivas hasta cubrir con una monocapa la totalidad del frasco de cultivo. Se asume que las células mas fuertes son las que migran fuera de la pieza del tejido (Arévalo, 2004).

La regulación del fenotipo en las células cultivadas está influenciada por un gran número de factores como las interacciones célula a célula y la presencia

de factores de crecimiento que afectan la fisiología celular (Felton, 1997). Entre estos factores se consideran:

**Adhesión celular:** Los fibroblastos requieren de un sustrato para fijación y propagación. Estas células son capaces de adherirse a cualquier superficie que demuestre carga negativa, propiedad que es aprovechada al utilizar como soporte frascos de poliestireno. Se sabe que la adhesión esta mediada por receptores específicos de superficie y por moléculas en la matriz extracelular. Este proceso es facilitado por proteínas mediadoras de la adhesión como las Cadherinas y las CAMs (cell to cell adhesión molecules); en las interacciones célula-sustrato participan las integrinas, fibronectina, entactina, laminina y colágeno. Otros mediadores de la adhesión son los proteoglicanos, colágeno y otros receptores de baja afinidad (Gillies, 1986).

**Proliferación celular:** Durante la fase  $G_1$  del ciclo celular las células son particularmente susceptibles al control de la progresión del ciclo celular. Los puntos de control durante S y  $G_2$  determinan la integridad del ADN y establecen la ruta de reparación previa a la mitosis o la entrada a la apoptosis. El inicio de la división esta regulada por señales del medio ambiente; una baja densidad celular permite la entrada al ciclo en presencia de factores de crecimiento adecuados interactuando con receptores de membrana; densidades altas inhiben la proliferación lo que ocasiona cambios en la forma de las células con la subsiguiente reducción de la tasa de proliferación. Este fenómeno se conoce como inhibición por contacto (Belibasakis, 2004; Grady 1960).

**Metabolismo Energético:** La tasa de crecimiento está fuertemente afectada por factores ambientales como la disponibilidad de oxígeno, sin embargo hay factores más importantes como la alimentación y suministro energético. En estados de hiperoxia se han detectado efectos citotóxicos que afectan la supervivencia y la vida media, específicamente en las líneas celulares ya establecidas (Dierick, 2002; Piche, 1989).

Las células explantadas de organismos pluricelulares que son mantenidas *in vitro* no poseen las características propias de los organismos unicelulares. Las células puestas en cultivo se van a nutrir a partir del medio de cultivo. Pero los nutrientes que hay en el medio se van a ir agotando a medida que transcurre el tiempo, a la vez que en él se van a ir acumulando desechos celulares. Por lo

tanto estas células necesitan un sistema de nutrición y de retirada de residuos, que realice el papel que desarrolla *in vivo* el sistema circulatorio, porque con el agotamiento de los nutrientes y el aumento de detritus en el medio de cultivo se produce la muerte celular. Por tanto, el medio de cultivo va a tener que ser renovado (Gil-Loizaga, 2006).

Hay cuatro factores que indican la necesidad del reemplazar el medio de cultivo, que son: la caída del pH, concentración celular, tipo celular y volumen celular, profundidad y área de la superficie de cultivo. Los reemplazos del medio de cultivo deben realizarse con una frecuencia determinada que coincida con la duplicación de la población celular (Gil-Loizaga, 2006).

La medición de las tasas de proliferación celular se emplea para determinar la respuesta de las células ante un estímulo específico. También es importante la cuantificación del crecimiento del cultivo en el mantenimiento de rutina, ya que es un elemento crucial para monitorear la consistencia del cultivo y así saber el mejor tiempo para hacer los subcultivos, para conocer las diluciones óptimas y estimar la eficiencia a diferentes densidades celulares (Freshney, 2000).

En los cultivos celulares se reconocen tres fases. La fase I de adaptación o fase Lag, la fase II proliferativa y la fase III de Plateau que corresponde a un periodo de aparente disminución en la tasa de proliferación celular acompañada de cambios morfológicos (Freshney, 2000). Figura 6

El conocimiento del estado de crecimiento de un cultivo, y sus parámetros de cinética, son críticos para el diseño de experimentos con cultivo de células. Los cultivos varían significativamente en algunas de sus propiedades entre la fase lag, el periodo de crecimiento exponencial (fase log) y la fase estacionaria (Plateau). Por eso es importante tener en cuenta el estado de crecimiento de los cultivos tanto al inicio del experimento como en el momento de tomar la muestra con el fin de poder determinar si las células están o no proliferando, y si es así, determinar el tiempo que dura la duplicación celular (PDT), y el tiempo del ciclo celular. Las células que han entrado a la fase de plateau tienen reducción de la fase de crecimiento, una morfología diferente, pueden estar más diferenciadas y pueden volverse polarizadas. Generalmente tienden a secretar mayor cantidad de matriz extracelular, y además son más difíciles de disgregar. Los cultivos celulares generalmente son más consistentes y uniformes en la fase log y tomar muestras hacia el final de la fase log brinda

mayor campo de acción y mayor reproducibilidad. El PDT derivado de la curva de crecimiento no debe ser confundido con el ciclo celular o el tiempo de generación. Es una figura promedio que se aplica a toda la población y describe el resultado neto de amplias tasas de división, incluyendo la división cero. El PDT es influenciado por las células que crecen y por las que se mueren, a diferencia del ciclo celular que es medido desde un punto en el ciclo hasta que vuelve a alcanzarse el mismo punto y se refiere solamente a las células que se dividen en la población. Hay que tener en cuenta que un nuevo ciclo de crecimiento empieza cada vez que se realizan subcultivos. (Freshney, 2000)

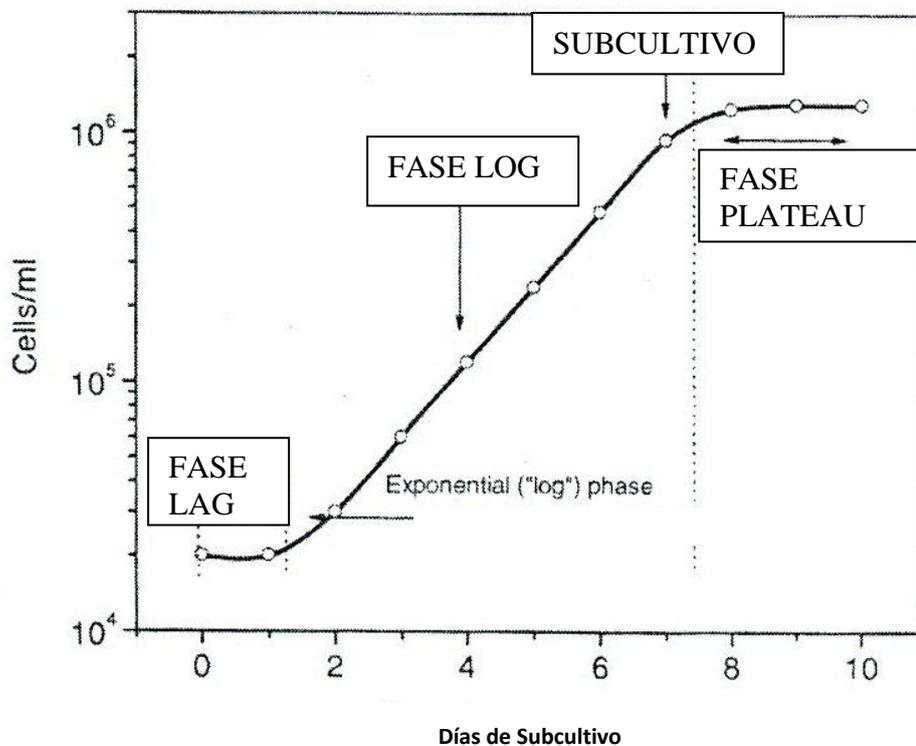


Figura 6. Fases de la curva de crecimiento para cultivos celulares. (Freshney, 2000)

### 3.4 Viabilidad y muerte celular

En la lesión inicial gingival, una de las características más importantes es la reducción en el número de fibroblastos por campo (Page, 1997). En teoría se desconoce la explicación de este fenómeno. Una hipótesis sugiere que los fibroblastos se pueden disminuir y/o eliminar por medio de la apoptosis (Arce, 2007). La apoptosis es un fenómeno que forma parte del desarrollo embriológico y del ciclo celular de los organismos multicelulares, y su expresión

se controla fisiológicamente o se puede activar en respuesta a un estímulo patológico. Las células pueden morir ante una amplia variedad de estímulos, pero en la apoptosis esta muerte ocurre de una manera regulada e individual, proceso que se diferencia notoriamente de la necrosis, donde se genera lisis celular, respuestas inflamatorias inespecíficas y degeneración tisular irreversible. Cuando una célula recibe una señal específica para iniciar el proceso de apoptosis se inicia una serie de cambios bioquímicos y morfológicos celulares. Específicamente, un grupo de proteínas conocidas como las caspasas se activan en los estadios tempranos de la apoptosis. Estas proteínas se encargan de realizar un clivaje o corte específico de los sustratos celulares comprometidos en la función celular normal como a nivel de algunas proteínas estructurales del citoesqueleto, la Cromatina, o ciertas proteínas nucleares, enzimas reparativas del ADN. Luego la célula empieza a reducir su tamaño normal y se empaqueta para formar los cuerpos apoptóticos, de tal manera que se facilite su depuración o eliminación a cargo de los macrófagos tisulares. (Arce, 2007).

El programa apoptótico se caracteriza por ciertos aspectos morfológicos que incluyen la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, condensación del citosplasma y del núcleo y clivaje del ADN. La pérdida de la membrana plasmática es uno de los primeros fenómenos en ocurrir. En la apoptosis el fosfolípido de membrana fosfatidil serina (PS) es translocado de la capa interna a la externa de la membrana, por consiguiente exponiendo el PS al ambiente celular (Urnowey, 2006).

Los estímulos pro-apoptóticos pueden ser de tipo intrínseco, regulados por la mitocondria, o extrínseco, donde moléculas antagonistas actúan como ligandos de los receptores de la muerte. La vía extrínseca cobra importancia en los procesos inflamatorios debido a que la apoptosis se puede activar cuando la célula no está preparada para hacerlo. Los receptores de la muerte, una vez urgidos por ligandos agonistas específicos, transmiten una cascada de señales bioquímicas que agilizan la vía de las caspasas en cuestión de segundos. Algunos receptores de muerte pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral TNF-R1 activados por ligandos TRAIL (TNF- related apoptosis inducing ligando o ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF).

Uno de los mecanismos para detectar la apoptosis de las células es el empleo de Anexina V, una proteína de 35 a 36 KD que tiene afinidad por la fosfatidil serina (PS) y conjugándose con fluorocromos, se puede identificar la apoptosis en sus estadios iniciales, antes que la célula pierda su membrana, evento que sucede durante, la fase tardía de la muerte celular, bien sea por necrosis o por apoptosis. Por consiguiente, la tinción con Anexina V se usa conjugada con la 7 amino acitomicina D (7AAD), que ayuda a excluir las células no viables durante los ensayos en citometría de flujo. Es así que las células que son viables, son Anexina y 7 ADD negativo; las células en apoptosis temprana se identifican como Anexina positivo y 7AAD negativo; las células muertas o en apoptosis tardía van a identificarse como Anexina y 7ADD positivo (Stathopoulou, 2009)

Las pruebas de viabilidad celular permiten evaluar la supervivencia celular en el momento del ensayo, ya que ofrecen información instantánea mediante métodos colorimétricos o conteo de radioactividad. Son particularmente útiles para valorar el efecto del material ensayado sobre la integridad de la membrana celular. El más común es el método de tinción con Azul Tripan, que permite el recuento de las células no teñidas vivas, frente al total (Margarit, 2005). El Azul Tripan es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables. Normalmente una alícuota de 100µl de suspensión celular se mezcla con igual volumen de solución de Azul Tripano al 0.4%. Así se determina el porcentaje de células viables haciendo el recuento de células por campo no teñidas vivas, frente al total (Margarit, 2005) usando un hemocitómetro o Cámara de Neubauer (Margarit, 2005).

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### ***4.1 Obtención de los fibroblastos de tejido gingival***

Los fibroblastos gingivales obtenidos de cultivos primarios de encía: FGH (Fibroblastos gingivales humanos) fueron obtenidos a partir de biopsias gingivales de tejidos clínicamente no inflamados de pacientes adultos jóvenes que asistieron a la clínica de cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia para ser sometidos a distintos procedimientos quirúrgicos dentro de su plan de tratamiento periodontal, previo consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad. Estos pacientes cumplieron con ciertos criterios de inclusión: como ausencia de inflamación clínicamente detectable, sin antecedentes de uso de cigarrillo, no fumadores y sin signos o síntomas de enfermedad sistémica grave, lo que se corroboró por la historia clínica. Se solicitó a los individuos hacer enjuagues con clorhexidina al 0.2 % cada 12 horas, iniciando 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. Antes de la obtención de la biopsia, se realizó un pulido coronal con cepillo para profilaxis de los dientes involucrados y se realizaron irrigaciones con la misma solución en el surco gingival del área donante. El tejido gingival retirado se aprovechó como muestra biológica. Inmediatamente después de la remoción, las muestras se recogieron en 5 ml de Medio Dulbecco Modificado de Eagle (DMEM) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina y 2.5 µg/ml de anfotericina B y fueron transportados al laboratorio de Citogenética del Instituto de Genética de la Universidad Nacional.

### ***4.2 Cultivo de Fibroblastos Gingivales Humanos***

El cultivo y crecimiento de fibroblastos se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por Freshney (2000) y González y Pereira, (2002). Se empleó el método de cultivo estacionario o en monocapa.

El tejido de las biopsias se manejó en cabina de flujo laminar. Las muestras de tejido se lavaron varias veces con solución buffer fosfatada PBS, pH 7.2

suplementada con antibiótico en una concentración de 200 U/ml de penicilina, 200µg/ml de estreptomicina y 2.5 µg/ml de anfotericina B. En cajas de petri se cortó el material obtenido en pequeños fragmentos aproximadamente de 2 x 2 mm. Se descartó el medio y los fragmentos se sembraron uno a uno en frascos de cultivo de 50 cm<sup>3</sup>. Se esperaron 1.5 horas hasta que los explantes se fijaran a la superficie de la caja de cultivo para adicionar 5 ml. de medio DMEM alto en glucosa, piruvato, sin bicarbonato y suplementado con vitaminas y aminoácidos al 1%, antibióticos al 2% y suero fetal bovino (FBS, Gibco) al 20%; a este medio con todos los suplementos se le denominó medio completo. Los cultivos fueron mantenidos a 37<sup>o</sup> C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub>. Todo esto con el fin que las células migren a partir de los explantes y se dividan. Se realizó seguimiento a los cultivos por microscopio invertido, que aprovecha la mayor distancia existente entre el condensador y la platina para situar la placa de cultivo. Se realizó cambio de medio cada cuarto día.

Después de cuatro semanas, cuando la monocapa tenía el 100% de confluencia se retiró el medio, se agregó PBS 2,5 ml en cada caja, se descartó y se disgregaron con tripsina al 0.25% y EDTA 0.2% (tripsina versene) durante 3 minutos a 37<sup>o</sup> C, se centrifugaron por 10 minutos a 1800 RPM, se sacó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 2 ml de medio completo con suero fetal bovino al 20 % y las células se transfirieron a dos frascos nuevos de 50ml (T25), adicionando 1 ml de la suspensión en cada frasco T 25 y completando con medio fresco suplementado. A este medio se le bajó la concentración de antibiótico a 100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 2.5 µg/ml de anfotericina B y SFB al 10 %. Este procedimiento se repitió hasta el pasaje número cuatro, antes que alcanzaran la confluencia completa, momento en el que se disponía de la cantidad de células suficientes para realizar los ensayos de infección.

### ***4.3 Curva de Crecimiento de los Fibroblastos Gingivales Humanos***

Fibroblastos gingivales en pase 1 y pase 2 fueron disgregados hasta obtener una suspensión celular suficiente para sembrar cajas de 24 pozos con 50.000 células por pozo durante 22 días seguidos realizando por triplicado el ensayo,

contando las células a intervalos diarios hasta que alcanzaron la fase de plateau.

A partir de las cajas en monocapa, se realizó el protocolo para tripsinizar y se diluyó la suspensión celular en  $1 \times 10^4$  células /ml. Asegurándose que las células estuvieran bien disgregadas. Se sembró 1 ml de la suspensión en medio completo a la concentración apropiada en cada pozo en tres placas de 24 pozos cada una. Cada caja se etiquetó y se enumeraron los pozos, dejando uno como control. La suspensión se sembró lentamente desde el centro del pozo para evitar que se esparciera alrededor del mismo, también se evitaron los movimientos circulares para mezclar las células. Las cajas se llevaron a incubar a una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5 % y 37° C de temperatura.

La primera lectura se realizó a las 7 horas con el objeto de establecer la cantidad real de células con las cuales se inicia la evaluación y después se realizaron lecturas cada 24 horas. Se retiraron las cajas de la incubadora y se realizó el conteo después de tripsinizar las células del pozo seleccionado según el tiempo evaluado hasta llegar al día 22.

Para realizar el conteo, previamente se removió el medio del pozo que contenía las células que iban a ser contadas; se lavó con PBS y se le adicionó 0.5 ml de tripsina-versene incubando por 5 minutos. Una vez estaban disgregadas las células, se agregó 0.5 ml de medio completo para inhibir el efecto de la tripsina por intermedio del SFB y se tomaron 20µl de la suspensión y se adicionó 20 µl de azul tripan al 0.4% para hacer el recuento celular en cámara de Neubauer de la siguiente manera: En la cuadrícula se visualizaron los 25 cuadros de los cuales se contaron las células presentes en 4 campos, se tuvieron en cuenta los cuadros de las esquinas para garantizar un conteo aleatorio. Las células se contaron cuadro por cuadro excluyendo las células que tocaran la línea externa y después se hizo un total. Después de haberlas contado se procedió a calcular el número total de células por unidad de volumen teniendo en cuenta las medidas de cada cuadro, el espacio ocupado por el medio en el que están las células que es el mismo espacio que había entre la cuadrícula de la cámara y la laminilla de cuarzo. Por último se promedió el número de células en la cámara y se multiplicó por el factor de dilución y por un factor F igual a  $10^4$

correspondiendo a los 4 extremos que se contaron. Este valor se multiplicó por la cantidad de mililitros en el cual crecieron los fibroblastos. Para cada pozo se hizo el conteo en los cuatro cuadrantes de la Cámara de Neubauer, se tuvo como factor, multiplicar por 20 mil. Todo el ensayo se realizó por triplicado. Se colectaron los datos para su posterior análisis.

#### ***4.4 Obtención de la cepa de Escherichia coli asociada a Enfermedad Periodontal***

Se incluyeron 10 pacientes adultos con Periodontitis crónica moderada ó severa que asistieron a la consulta externa en las clínicas odontológicas de la facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia.

Se tomaron en cuenta los criterios definidos por el Workshop de la AAP (American Society of Periodontics) para los diferentes diagnósticos periodontales, los cuales se calibraron con la investigadora clínica participante. (Armittage, 1999).

Para tomar la muestra se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: pacientes mayores de edad; pacientes con enfermedad periodontal crónica moderada ó severa.

Los criterios de exclusión: haber recibido tratamiento antibiótico por cualquier causa en los tres meses previos. Paciente con cáncer; paciente con VIH-SIDA; pacientes que estuvieran recibiendo terapias que alteren su inmunidad (inmunosupresores, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia).

Una vez aprobados los criterios de inclusión y exclusión y haber firmado el consentimiento informado previamente avalado por el Comité de Ética en Investigación para cada paciente se tomaron 6 muestras de placa subgingival de los sitios afectados con bolsas mayor o igual a 5 mm de profundidad. Para cada paciente se eliminó la placa supragingival con una cureta estéril y se aisló el sitio de la muestra con rollos de algodón y aire; se insertaron en la bolsa dos puntas de papel absorbente número 30 New Stetic durante 20 segundos. Las puntas se recortaron con una tijera estéril antes de ser retiradas. La muestra se transportó en un medio de transporte VMGAI (Moller 1964), facilitado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, se rotularon y junto con el anexo de laboratorio se

enviaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina en un tiempo inferior a 3 horas (Doan, 1999).

Como medio de aislamiento primario se empleó agar MacConkey que es un medio diferencial para la selección y recuperación de enterobacterias y bacilos gram negativos entéricos. Contiene además de peptona, polipeptona, lactosa, cloruro de sodio, sales biliares las cuales junto con el cristal violeta inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas. Una vez fueron sembradas las muestras en agar MacConkey se incubaron en atmosfera de aerobiosis durante 24 a 48 horas a una temperatura de 37 grados centígrados. Se tomó una colonia a la cual se le realizó tinción de gram Para la identificación de género y especie se realizaron pruebas bioquímicas de:

**TSI:** Este medio diferencial permite determinar la capacidad del microorganismo para degradar los carbohidratos, con formación de ácido sulfhídrico o producción de gas. Se realizó la inoculación del medio con asa recta, con una punción hasta el fondo del tubo haciendo estrías en la superficie. La lectura se realizó después de 24 horas de incubación a 37°C.

**SIM:** Este medio de cultivo semisólido determina la capacidad del microorganismo de moverse (microorganismos con flagelos), producir indol y H<sub>2</sub>S. El indol es un producto de degradación de los aminoácidos triptófano; las bacterias que poseen triptofanasa, son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco.

**Urea:** Se sembró con asa recta, únicamente en la superficie del medio de cultivo. Este agar determina la capacidad de un microorganismo de producir ureasa y desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoniaco.

**Citrato:** Con este agar se determina la capacidad del microorganismo de utilizar el citrato de sodio como recurso único como fuente de carbono para su desarrollo y crecimiento.

También se realizaron las pruebas bioquímicas de Lisina decarboxilasa Rojo de Metilo, OF y Voges Proskauer.

Los resultados de las reacciones de las pruebas bioquímicas fueron registrados y comparados con una matriz en casillero preestablecida para la identificación de todas las enterobacterias (Koneman, 1987).

El crecimiento y demás ensayos bacterianos con *Escherichia coli* se realizaron en el laboratorio de Biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

#### **4.5 Cinética de crecimiento de la cepa ATCC 25922 y aislamiento de *Escherichia coli***

Los estudios de crecimiento de población bacteriana requieren de la inoculación de las células viables en un medio de caldo estéril y su incubación bajo óptimas temperaturas, pH y condiciones gaseosas. Bajo estas condiciones, las células se reproducirán rápidamente y la dinámica de crecimiento se registra en una curva de acuerdo al aumento del número de células versus el tiempo de incubación (Koneman, 1987). Con la curva de crecimiento de la bacteria se establece el tiempo y duración de la fase log, momento durante el cual se debe realizar la infección a las células.

Como control negativo se trabajó con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 que se encuentra en el cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, la cual es una cepa que proviene de aislamiento clínico y tiene un nivel 1 de bioseguridad.

El aislamiento de *Escherichia coli* (denominada A8) obtenido en agar MacConkey y la cepa *E. coli* ATCC 25922 fueron cultivados por agotamiento en agar Luria Berthani (LB) e incubados durante 18-24 horas a 37<sup>0</sup>C. A partir de este último cultivo, se tomó una colonia de cada microorganismo y se cultivó tanto en caldo LB como en medio DMEM suplementado. Posteriormente, estos medios fueron incubadas a 37<sup>0</sup>C por un periodo de 24h, y en cada hora se tomó 1ml de muestra para hacer lecturas de absorbancia a 600 nm en el espectrofotometro tall. El cultivo de unidades formadoras de colonia (UFC), para posterior recuento, se llevó a cabo en agar Plate Count. Se sembró una alícuota de las diluciones 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup>, realizadas en solución salina estéril al 0.9%, de los cultivos en medio DMEM de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24h. Las placas sembradas se incubaron a 37<sup>0</sup>C por 18-24h y los resultados del recuento fueron expresados en UFC/ml.

Se graficaron los datos de absorbancia frente a los tiempos seleccionados, así como también se graficaron los datos de absorbancia frente a las UFC/ml obtenidas para cada bacteria, con el fin de establecer los patrones de crecimiento en cada una de las condiciones ensayadas. El siguiente es un esquema ilustrativo de cómo se realizó el ensayo para cada uno de los microorganismos seleccionados.

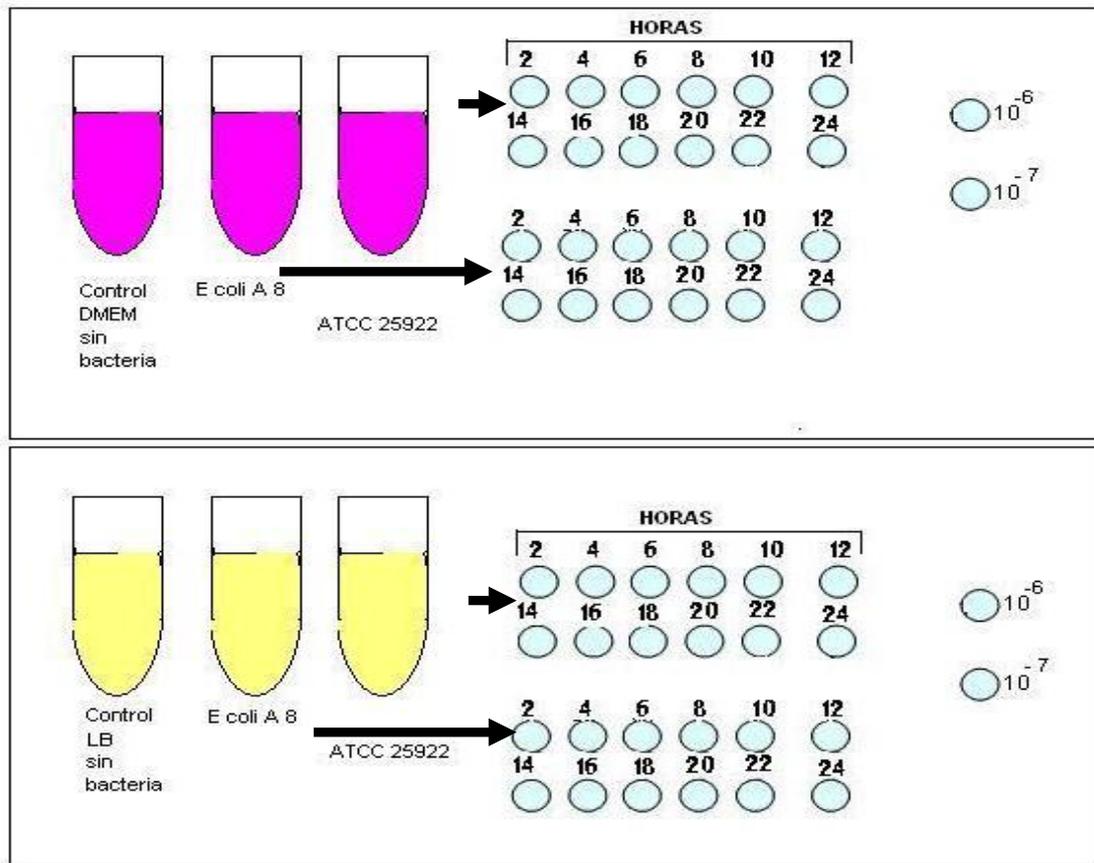


Figura 7. Diseño para cinética de crecimiento bacteriano

#### 4.6 Concentración bactericida de gentamicina para los aislamientos de la cepa ATCC 25922 y el aislamiento de E. coli A8.

Antes de realizar los ensayos de infección fue necesario establecer si las concentraciones de gentamicina sulfato empleadas en otras investigaciones (Gutierrez-Vanegas, 2007) tienen actividad bactericida para los microorganismos en estudio. Las concentraciones de antibiótico se escogieron de acuerdo a los reportes hechos para ensayos de invasión con la cepa *P.*

*gingivalis* 33077, la cual fue empleada en los ensayos de infección como control positivo por su conocida capacidad de infección e invasión a los FGH (Andrian, 2004; Bodet, 2006).

Por lo anterior, se realizó un ensayo con el fin de determinar la concentración de gentamicina sulfato a emplear en los ensayos de invasión con la cepa ATCC 25922 y el aislamiento de *E. coli* A8. Se siguió protocolo empleado por (Gutierrez- Vanegas 2007, 2008). Este ensayo se hizo por duplicado para cada microorganismo.

Teniendo en cuenta que para el ensayo de infección se emplearían cajas de 12 pozos, en las que caben aproximadamente  $10^6$  fibroblastos, se estimó que con el 70% de confluencia se encontrarían aproximadamente 700.000 células (Gil.Loizaga, 2006). Siguiendo el protocolo de infección descrito en la literatura (Andrian, 2004; Bodet, 2005, 2006; Dogan, 2000; Gutiérrez, 2007), donde para infectar una célula se necesitan 50 bacterias, se estableció que se necesitaría una suspensión bacteriana aproximada de  $4 \times 10^7$  bacterias/ml. Acorde a lo anterior, se preparó un inóculo bacteriano de aproximadamente  $4 \times 10^7$  bacterias/ml de cada microorganismo en medio DMEM.

Se escogieron las soluciones de antibiótico con concentraciones de 125, 250, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina sulfato (solución stock: 10000 $\mu\text{g/ml}$ ), las cuales se prepararon mediante diluciones seriadas en medio DMEM. A cada una de las soluciones del antibiótico a evaluar, se le agregó una alícuota del inóculo bacteriano preparado anteriormente. Estas mezclas, se llevaron a incubación a 37<sup>0</sup>C durante 30, 60 y 90 minutos. En cada tiempo, se tomaron muestras de cada una de las concentraciones de antibiótico evaluadas, para cada microorganismo; de las cuales se cultivó una muestra directa y una muestra de la dilución  $10^{-1}$  en cajas de agar plate count, para probar actividad bactericida del antibiótico en los tiempos seleccionados. Las placas de agar fueron incubadas por 18-24h a 37<sup>0</sup>C. Posterior a esta incubación se hizo el conteo de UFC y se expresaron como UFC/ml.

Como controles del ensayo, se emplearon inóculos bacterianos de cada microorganismo, en medio DMEM y sin antibiótico. De estos controles se

realizó un cultivo de la dilución  $10^8$  en agar plate count para cada tiempo, con el fin de observar que no hubiera efecto bactericida provocado por el medio.

El siguiente es un esquema ilustrativo de cómo se realizó el ensayo para cada uno de los tiempos establecidos.

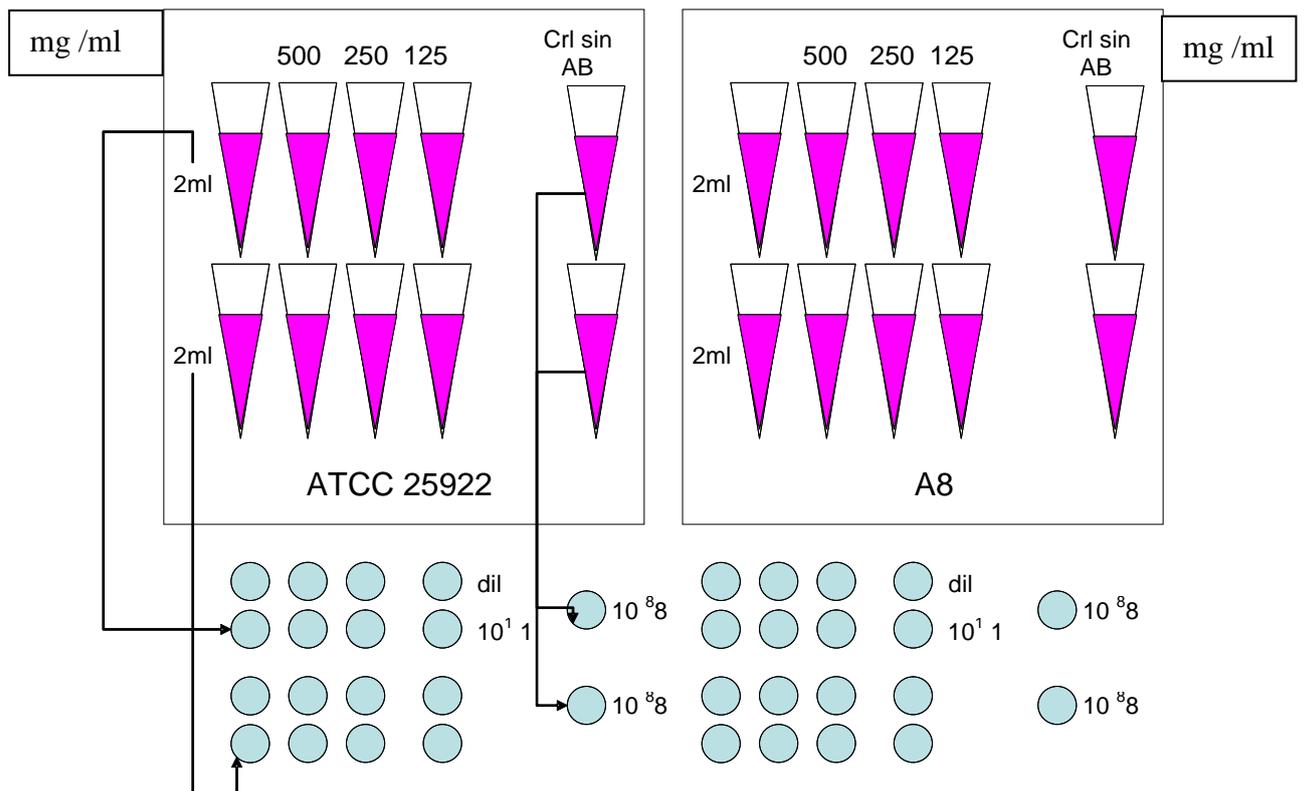


Figura 8. Diseño de ensayo para establecer dosis bactericida de gentamicina sulfato

#### 4.7 Ensayo de Infección con aislamiento de *Escherichia coli* A8 en fibroblastos gingivales humanos (FGH).

Para la infección de los fibroblasts gingivales se siguió el protocolo propuesto por (Bodet,2006; Dogan, 2000). Se empleó como control negativo un pozo sin bacterias y como control positivo un pozo con la cepa ATCC 33277 de *Porphyromonas gingivalis* la cual ha demostrado capacidad de infectar e invadir a los FGH.

El aislamiento clínico de *Escherichia coli* A8 y las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 suspendidas en DMEM sin antibiótico a una concentración final de  $10^7$  bacterias por ml se le agregó a las células a

una multiplicidad de infección (MOI) de 50 bacterias por fibroblasto y se incubaron a 37<sup>0</sup> en 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo de dos horas. Ver figura 9.

Se preparó el inóculo bacteriano de cada microorganismo en estudio, en medio DMEM suplementado, a la concentración de 4 x10<sup>7</sup> bacterias/ml. Para preparar el inóculo de *P. gingivalis* ATCC 33277, se cultivó esta cepa en agar sangre con hemina y menadiona en condiciones de anaerobiosis por 3 días. Posteriormente, se tomó una colonia de dicho cultivo y se resuspendió en DMEM suplementado y luego se ajustó a la concentración de bacterias establecida para el ensayo.

Los fibroblastos sembrados en las placas de 12 pozos y con una confluencia del 70%, se lavaron suavemente 2 veces con buffer fosfatos pH 7.0 (PBS) estéril. Luego se adicionó 1ml del inoculo de bacterias (ajustado a una multiplicidad de infección (MOI) de 50 bacterias/ fibroblasto (50:1) a cada pozo. Las placas de cultivo infectadas se incubaron a 37°C en 5%CO<sub>2</sub> por 30 min, 1 y 2 horas. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavaron los fibroblastos con PBS estéril. Para eliminar las bacterias extracelulares y no adheridas, se adicionó 1ml de DMEM con 125µg/ml de gentamicina sulfato y se incubó a 37°C en 5%CO<sub>2</sub> por 30 minutos.

Después de la incubación con el antibiótico, se extrajo el sobrenadante y se sembraron 100 µl de este en agar Plate Count, con el fin de verificar la actividad bactericida del antibiótico empleado. Posterior a esto se lavaron las células de cada pozo suavemente con PBS con el fin de remover rastros del antibiótico. Luego del lavado, se adicionó a cada pozo 0.25ml de tripsina versene al 0.25% y se incubó a 37°C en 5%CO<sub>2</sub> por 5 min. Las células disgregadas se centrifugaron a 1100 RPM por 10 min e inmediatamente fueron resuspendidas en el buffer de unión del Kit de Anexina V BD Pharmingen.

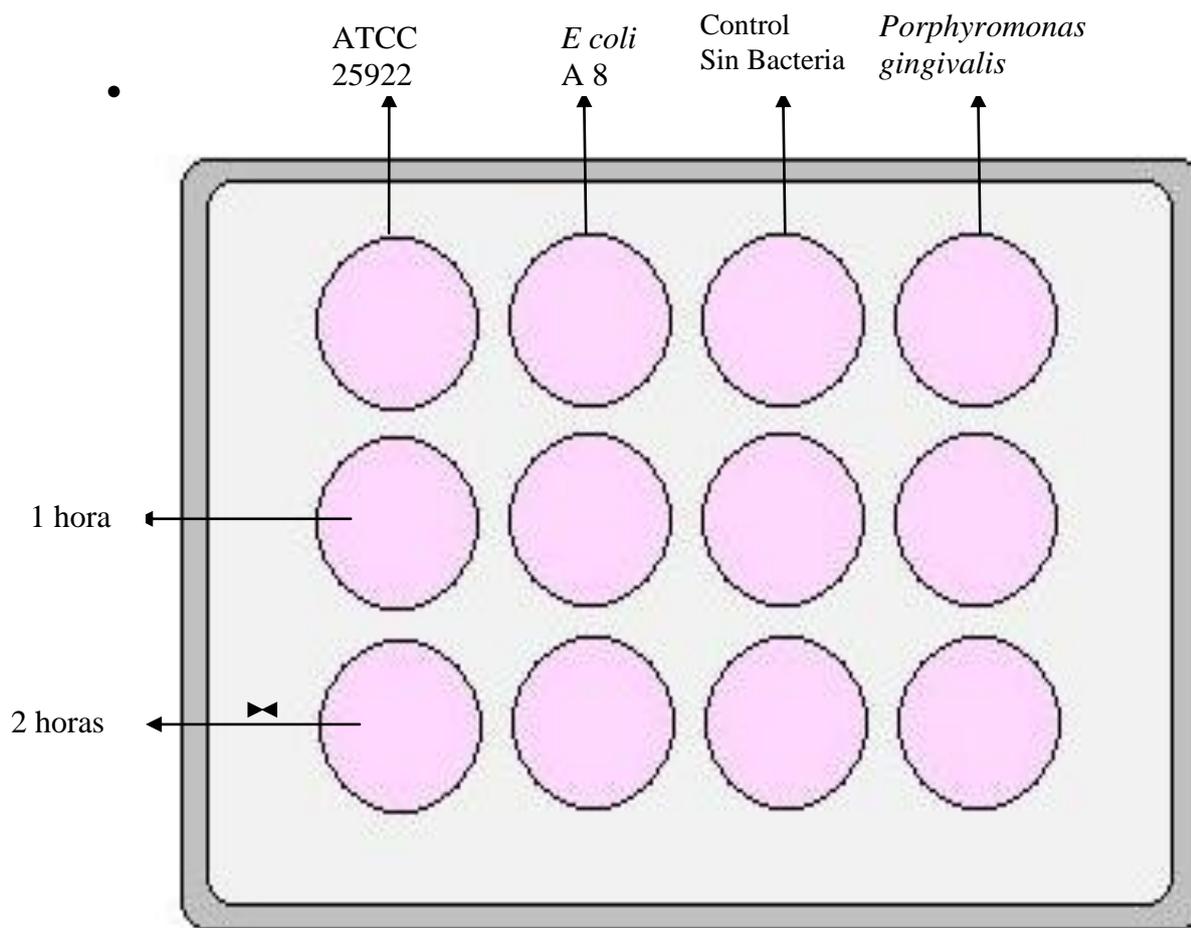


Figura 9. Modelo de placa de 12 pozos con la distribución de los microorganismos para ensayo de infección

#### **4.8 Evaluación de la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos infectados con *E. coli* A8 por citometría de flujo.**

El ensayo para evaluar viabilidad de FGH infectados con *E. coli* se realizó con el Kit de Annexina V-PE (BD Pharmingen) que es una prueba para identificar células apoptóticas la cual se une a superficies de fosfolípidos cargados negativamente, con alta especificidad por la fosfatidil serina PS.

Este ensayo no distingue per se entre las células muertas por necrosis o por apoptosis. Sin embargo, al medir la apoptosis a través del tiempo, y haciendo la tinción con Annexina V-PE en conjunto con 7 amino acitomicina D se pueden evaluar las células viables, células con apoptosis temprana y las células muertas.

Para realizar la tinción se siguió el protocolo sugerido por el fabricante: se resuspendieron en 500ul del buffer de unión 1X a una concentración de  $1 \times 10^6$

células /ml, se adicionaron 5 µl de Annexina V-PE y 5 µl de 7-AAD. Las muestras se mezclaron suavemente y se llevaron a incubación por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II, del laboratorio de Investigaciones de la Clínica del Niño.

Antes de hacer las lecturas en el citómetro las células se hicieron los ajustes para eliminar los detritus, donde se confirmó que lo positivo brilla hacia la derecha. Los negativos se ajustaron con una muestra sin marcar, para lo cual se emplearon los FGH suspendidos en buffer.

Las muestras analizadas fueron las siguientes:

1. FGH sin ningún tratamiento, teñidos con Annexina-V y 7AAD (células blanco).
2. FGH infectadas con *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (control positivo).
3. FGH infectadas con *E. coli* ATCC 25922.
4. FGH infectadas con *Escherichia coli* A8,
5. FGH sin ningún tratamiento, teñidas con Annexina –V.
6. FGH sin ningún tratamiento, teñidas con 7-AAD.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Cultivo Primario.

Los fibroblastos gingivales FGH que crecieron mas fácilmente fueron los obtenidos a partir de biopsias gingivales de tejidos clínicamente no inflamados de pacientes que requirieron cirugía preprotésica. Fueron cultivados en medio DMEM suplementado con antibiótico.

El análisis de los cultivos por microscopio invertido mostró a partir del sexto día una proliferación de células alrededor del explante. Estas células de morfología cuboidal correspondieron a las células epiteliales que tienen mayor velocidad de proliferación que los fibroblastos (Figura 10 A). Entre el octavo y el décimo día se empezaron a evidenciar células migrando desde los explantes individuales (Figura 11 A) las cuales tenían una morfología típica de fibroblasto, con formas alargadas en forma de huso, similares a cuerpos neuronales (Figura 10 B). Estas células de aspecto alargado FGH, formaban un límite de proliferación bien claro con respecto a las células epiteliales (Figura 10 B) El primer pase se realizó a las cuatro semanas, donde se hizo evidente un predominio de células en monocapa orientadas a lo largo de líneas paralelas con morfología bien establecida de fibroblastos gingivales.(Figura 11 C)

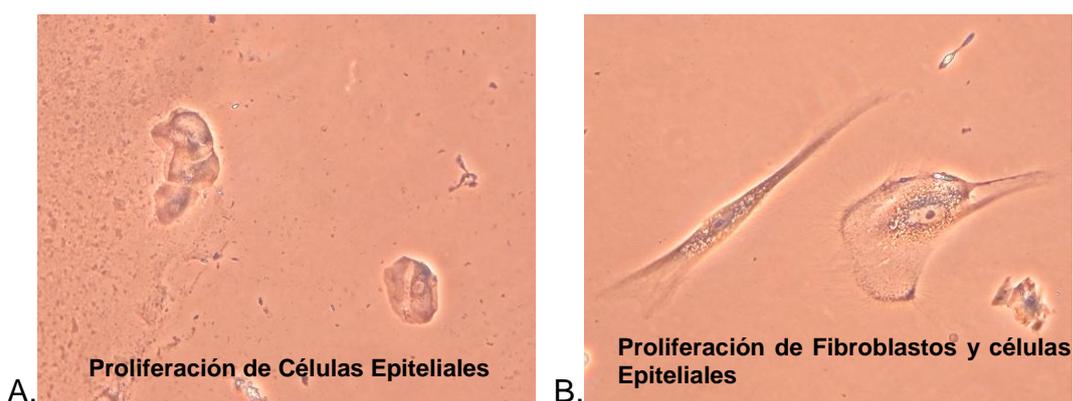


Figura 10. Imágenes de Microscopio Invertido 10X correspondientes a la migración y proliferación de células epiteliales y Fibroblastos Gingivales Humanos FGH

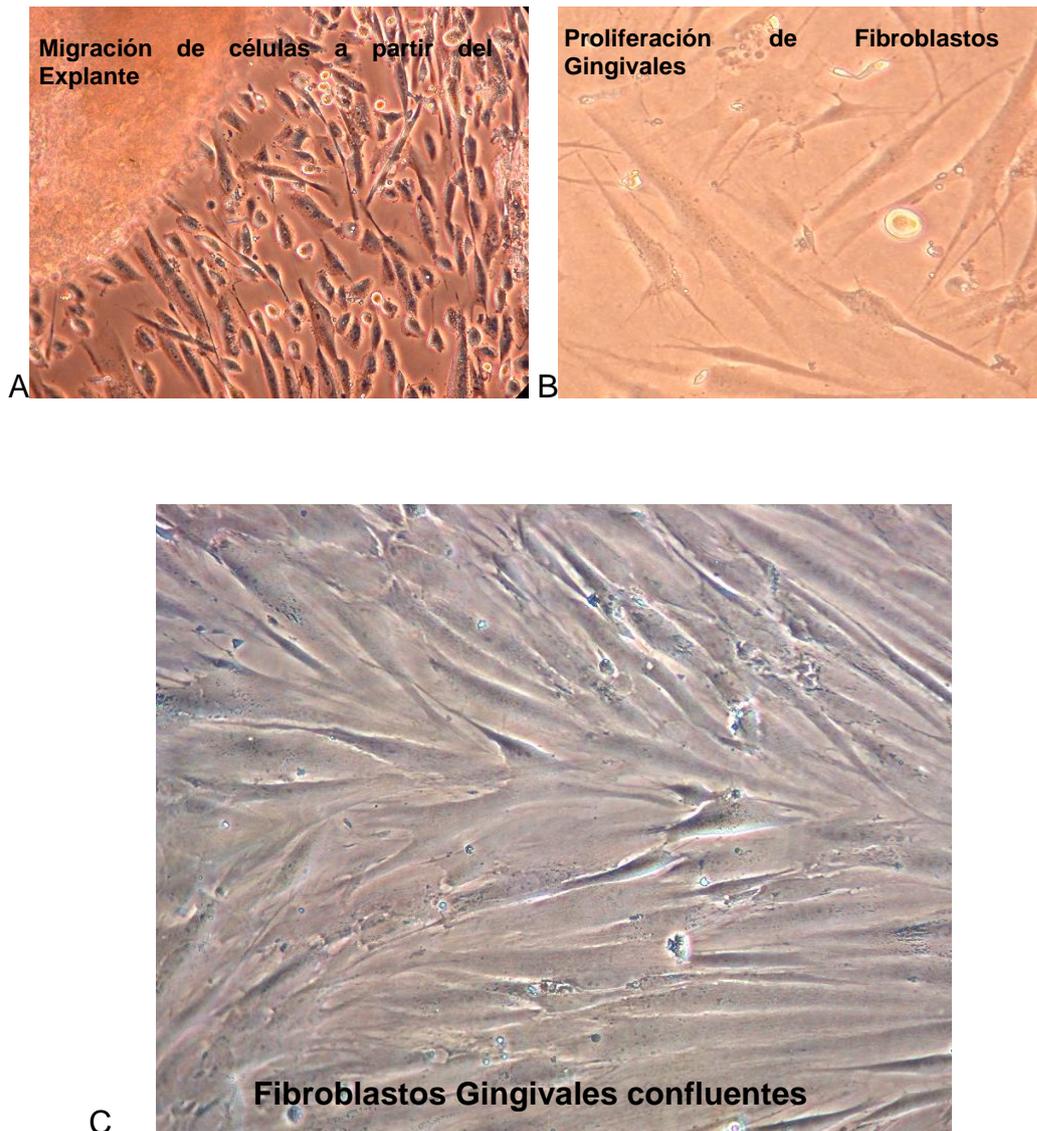


Figura 11. Imágenes de Microscopio Invertido 10X correspondientes a la migración y proliferación de Fibroblastos Gingivales Humanos FGH a partir del explante hasta llegar a confluencia en monocapa

## 5.2 Curva de crecimiento para los Fibroblastos:

La cinética de crecimiento de los FGH permitió establecer las tres fases del ciclo para las células eucariotas: la fase lag donde se inició el ciclo con 12.000 células, y después hubo una disminución en el número de ellas. Correspondió al periodo de adaptación donde la célula reemplaza los elementos perdidos durante la tripsinización y se adhiere al sustrato. La fase log de crecimiento exponencial se registró llegando a su punto máximo durante el día 10 con  $44.166 \times 10^4$  células. Ver tabla 1, Figuras 11 C

							Promedio fibroblastos	
Día de siembra FGH pase 1- 2	Caja 1 Células/ cuadrante	Caja 1 sumatoria	Caja 2 Células/ cuadrante	Caja 2 sumatoria	Caja 3 Células/ cuadrante	Caja 3 sumatoria	Fibroblastos	(10 <sup>4</sup> )
0		160000		120000		80000	120000	12
1	8,5,3,0	80000	1,6,2,5	70000	2,3,5,3	66000	72000	7,2
2	5,6,10,9	150000	1,5,11,2	94000	5,2,3,3	65000	103000	10,3
3	2,10,1,3	80000	8,4,6,6	120000	4,18,16,2	200000	133333,33	13,33
4	8,7,6,8	145000	6,5,4,9	120000	8,7,4,5	120000	128333,33	12,83
5	10,11,11,9	205000	9,4,5,6	120000	8,7,12,10	185000	170000	17
6	10,11,11,9	205000	9,4,5,6	120000	8,7,12,10	185000	170000	17
7	8,7,6,8	145000	6,5,4,9	120000	8,7,4,5	120000	128333,33	12,83
8	9,14,14,18	275000	17,12,14,13	280000	15,5,12,28	300000	285000	28,5
9	16,16,24,18	370000	17,18,15,13	315000	27,29,17,25	490000	391666,67	39,166
10	13,15,18,25	355000	25,29,24,27	525000	26,22,24,17	445000	441666,67	44,1666
11	30,38,20,27	575000	29,22,20,15	430000	9,18,12,15	270000	425000	42,5
12	17,18,19,20	370000	18,10,15,16	295000	14,21,20,18	365000	343333,33	34,333
13	14,22,10,16	310000	9,11,13,15	240000	13,11,7,9	200000	250000	33
14	14,22,10,16	310000	9,11,13,15	240000	13,11,7,9	200000	250000	25
15	8,10,16,11	225000	13,11,9,12	225000	13,7,7,3	150000	200000	20
16	13,10,11,13	235000	11,13,19,11	270000	11,19,19,10	295000	266666,67	26,666
17	7,15,10,12	220000	14,11,20,13	290000	11,12,14,5	210000	240000	24
18	9,4,9,8	150000	7,5,10,7	145000	6,7,6,3	95000	130000	13
19	13,14,8,9	170000	13,9,13,21	280000	9,8,10,6	165000	205000	20,5
20	9,7,11,11	190000	8,7,9,5	145000	6,9,12,4	155000	163333,33	16,333
21	11,7,11,9	190000	7,5,10,7	145000	5,9,7,8	145000	160000	16
22	13,7,7,3	150000	6,5,4,9	120000	8,7,4,5	120000	130000	13

**Tabla 1 Recuento celular para curva de crecimiento**

La tercera fase de plateau se apreció al final de la fase log cuando el cultivo estaba confluyente, el registro demostró la reducción en el crecimiento celular o fase estacionaria a partir del día 13 donde fue evidente la reducción en la proliferación celular. Es aquí donde los fibroblastos se orientaron paralelamente unos con respecto a los otros. (Gráfico 1 y Figura 11C)

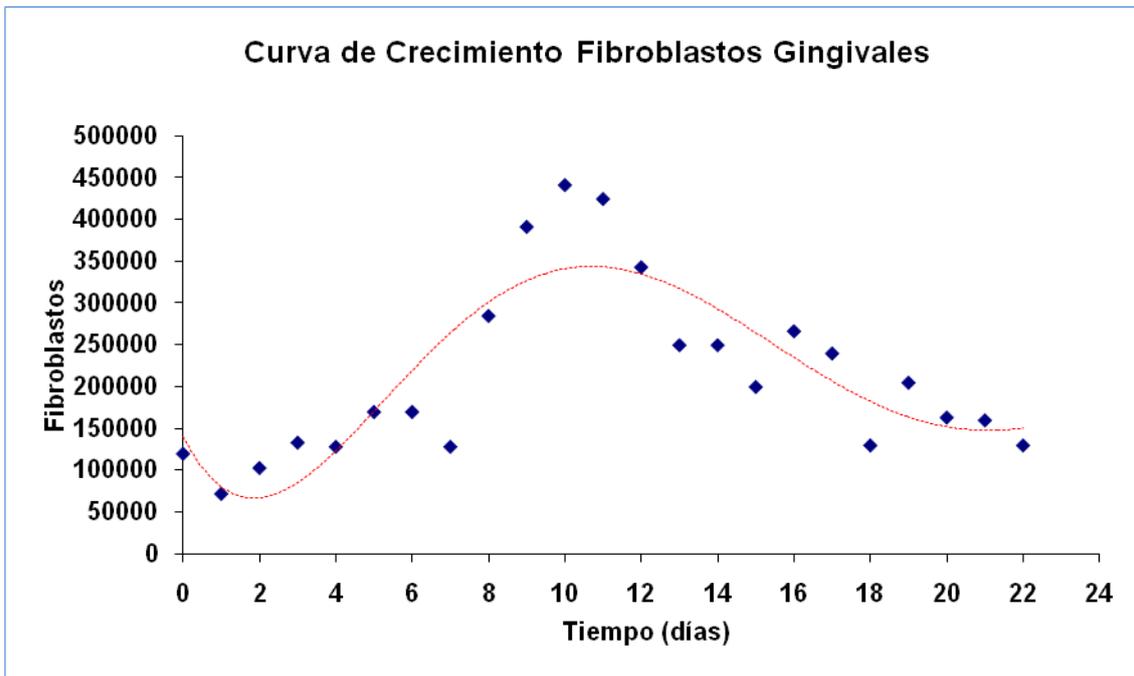


Gráfico 1 Curva de crecimiento de FGH se observa un crecimiento exponencial hasta el día 10

### 5.3 Aislamiento de *Escherichia coli*

Las colonias de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con periodontitis crónica severa, se reconocieron por la formación de colonias rojas rodeadas de una zona de bilis precipitada, por su respuesta a la fermentación de la lactosa, por la coloración de Gram negativa y por sus características morfológicas (Figura 13), verificándose con las pruebas bioquímicas respectivas para identificación de bacilos entéricos (Figura 14 y Tabla 2). Este aislamiento se denominó como *E. coli* A8 y fue empleada para los ensayos correspondientes de viabilidad de los fibroblastos gingivales.



Figura 12. Aspecto macroscópico de las colonias de *E. coli* A-8 en agar MacConkey

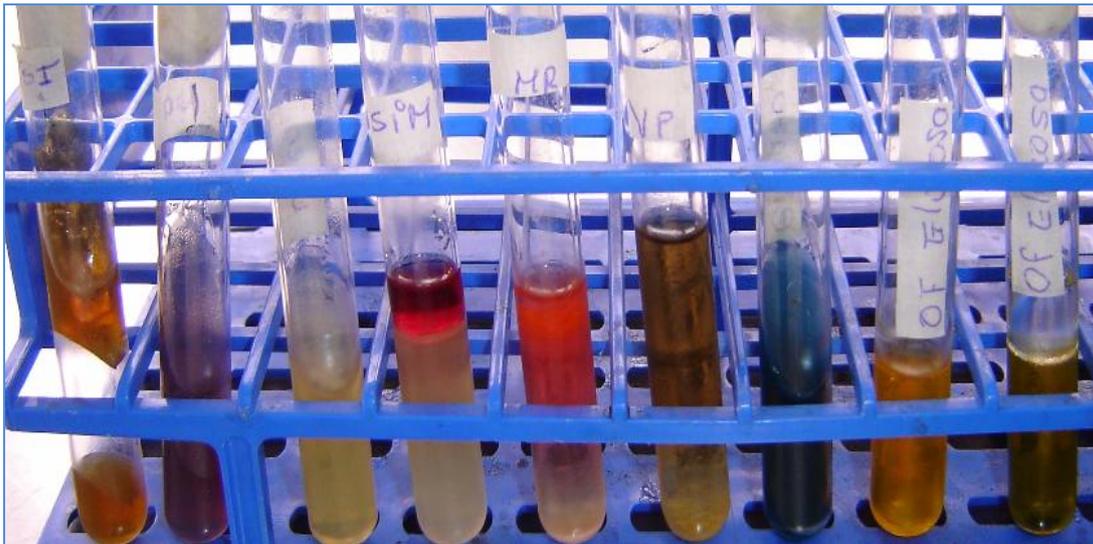


Figura 13. Pruebas bioquímicas para confirmación aislamiento clínico de *E. coli*

Indol	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato	TSI	Ureasa	Movilidad	Lis	Lactosa	Glucosa
×	×	—	—	—	—	×	±	×	×

Tabla 2 Pruebas bioquímicas para confirmación de *E. coli*

## 5.4 Cinética de Crecimiento para *E.coli*

Se determinó la cinética de crecimiento en 24 horas de la cepa ATCC 25922 y el aislamiento *E. coli* A8 en los medios de cultivo Luria Berthani y DMEM suplementado, ya que este es el medio donde crecieron los fibroblastos y se realizaron los ensayos de invasión.

El patrón de comportamiento para los dos microorganismos fue similar, siendo más acelerado para el aislamiento de *E. coli* A8 en el medio DMEM, verificándose un crecimiento claramente exponencial; la determinación de este crecimiento cuantitativo se pudo representar mediante una curva (Gráfico 2).

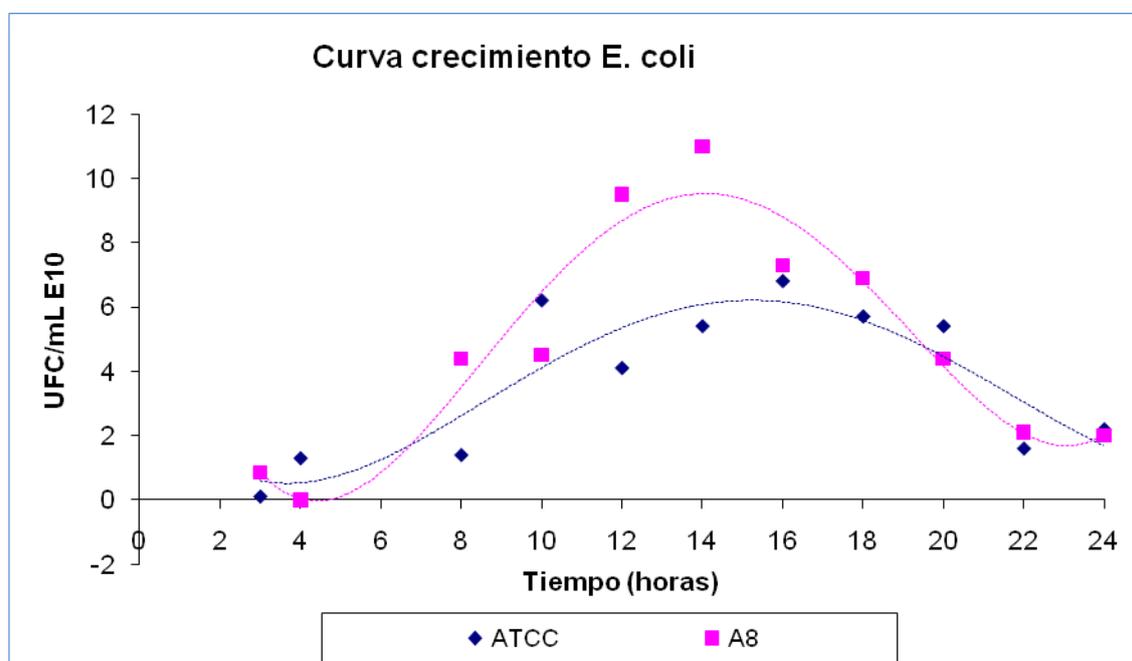


Gráfico 2 Curva de Crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y aislamiento de *E. coli* en DIMEM sin agitación, 37° C y sin CO<sub>2</sub>

Para verificar la cinética de crecimiento de la enterobacteria se realizó el conteo en placa donde se determinaron las UFC/ml con respecto a la información suministrada por los datos de absorbancia a 600nm.

Se distinguieron las cuatro fases de la curva de desarrollo bacteriano como fueron: Fase de latencia. Fue el tiempo necesario para la adaptación de las bacterias al nuevo medio donde se sembraron con el consecuente aumento de

su actividad metabólica. Fase de desarrollo exponencial o logarítmico, manifiesta por la ascendente inflexión en la curva entre las 4 y 10 horas de crecimiento. El recuento de células viables fue prácticamente igual al de células totales, teniendo en cuenta que se trataba de una población joven, donde el número de bacterias muertas era mínimo. La fase estacionaria se apreció por un crecimiento desequilibrado posiblemente porque los componentes bacterianos se estaban sintetizando a tasas diferentes. Por último, al volverse las condiciones del medio adversas, fue evidente la fase de declinación exponencial .

### **5.5 Concentración bactericida de gentamicina para la cepa ATCC 25922 y el aislamiento de *E. coli* A8.**

El objetivo de este ensayo fue determinar la concentración de gentamicina sulfato a emplear en los ensayos de invasión con la cepa ATCC 25922 y el aislamiento de *E. coli*. A los pre-inoculos se les midió la absorbancia a 600 nm y se realizó el recuento en placa de la dilución  $10^7$  con el fin de conocer el la concentración de bacterias en el inoculo a evaluar. Estas placas de agar se incubaron a  $37^0$  C por 18-24 horas. Se obtuvieron los siguientes resultados en UFC. (Tabla 3).

	UFC ATCC	UFC A8
Dilucion $10^7$	30	37
UFC/ml	3,00E+09	3,70E+09

Tabla 3 UFC/ml de los preinóculos de *E. coli*

De las concentraciones escogidas, 125, 250, 500  $\mu$ g/ml de gentamicina sulfato (solución stock: 10000 $\mu$ g/ml) ensayadas a los tres tiempos de 30, 60 y 90 minutos, se evidenció que no hubo crecimiento bacteriano de las cepas de *E. coli* comparado con los controles sin antibiótico. (Tablas 4 ).

Tiempo (min)	control ATCC	control A8		Tiempo (min)	UFC/ml control ATCC	UFC/ml control A8
30	16	20	DILUCION 10 7	30	1,6E+09	2,0E+00
	11	18			1,1E+09	1,80E+00
60	18	110		60	1,8E+09	1,1E+10
	20	96			2,0E+09	9,6E+09
90	311	334		90	3,1E+10	3,3E+10
	336	297			3,4E+10	3,0E+10

**Tabla 4 Resultado de ensayo control, sin antibiótico al hacer lecturas de siembra de las bacterias a diferentes tiempos**

Con los resultados obtenidos se decide emplear la concentración bactericida, 125 µg/ml de gentamicina sulfato coincidiendo por lo reportado en la literatura (Gutierrez-Venegas, 2007).

## **5.6 Aislamientos de *Escherichia coli* alteran la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos**

La determinación de la infección de fibroblastos gingivales humanos por parte de aislamientos de *E. coli* de bolsas periodontales, se llevó a cabo sobre monocapas de fibroblastos con 70% de confluencia de aproximadamente 700.000 células por pozo con una suspensión bacteriana de  $4 \times 10^7$  bacterias/ml. Todos los ensayos se realizaron por duplicado con una MOI de 50 bacterias por célula. La alteración en la viabilidad de los fibroblastos se apreció después de dos horas de interacción de las células con las bacterias, demostrada por la siembra en placa y recuento de células viables. Posterior al co-cultivo de las células con *E.coli* se apreció muerte bacteriana después de la adición del antibiótico y una incubación adicional de 60 minutos.

Para el análisis por citometría de flujo, el citómetro fue ajustado con una muestra sin marcar (fibroblastos resuspendidos en buffer) y se tuvieron como controles tres tubos: uno con células suspendidas en DMEM más  $H_2O_2$  (control positivo), otro con células y Anexina y un tercero con células y 7AAD. Se excluyeron para el análisis detritus, bacterias que no se unieron y restos celulares y se observó que las células no tratadas (células blanco) eran Anexina V-PE y 7AAD negativo, indicando que eran viables y no sufrieron apoptosis. Figura 14

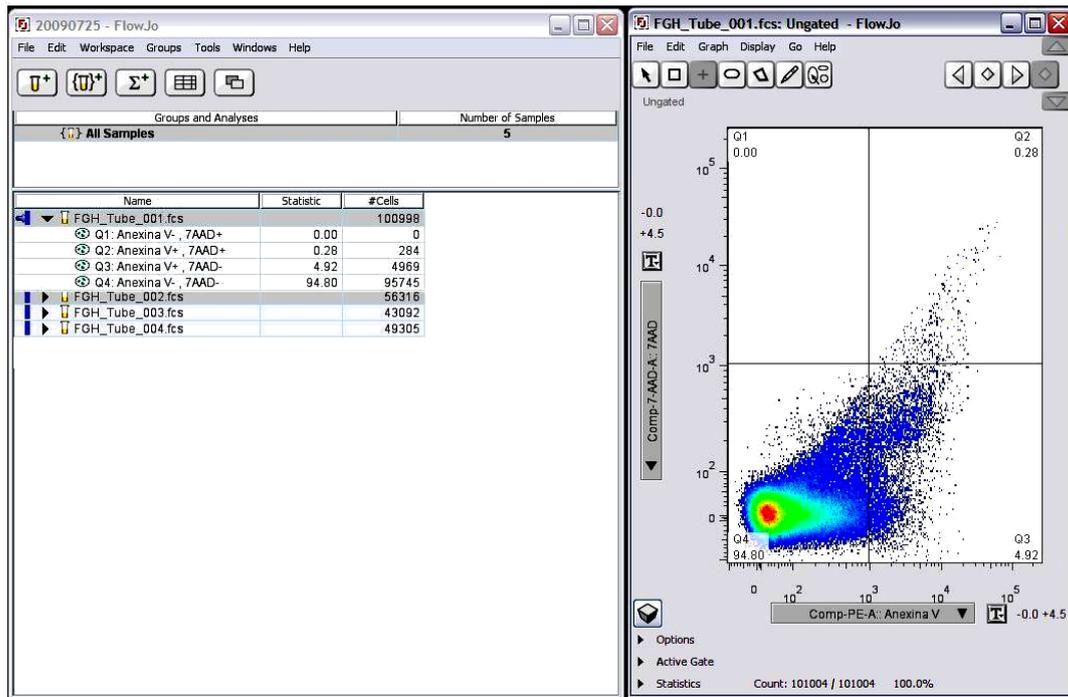


Figura 14. Análisis por citometría de flujo. Corresponde a fibroblastos resuspendidos en Buffer sin marcar

Después de dos horas de co-cultivo con la enterobacteria, se apreciaron dos grupos de poblaciones celulares: fibroblastos que eran viables sin presentar apoptosis y las células con apoptosis temprana (Anexina positiva y 7AAD negativa). Como era de esperarse, con el control positivo, la muerte celular 6.1% y apoptosis temprana, 14.14% inducida por *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 en el tubo 2 fue evidente a pesar del alto porcentaje, 79,18% de células viables. Ver Figura 15.

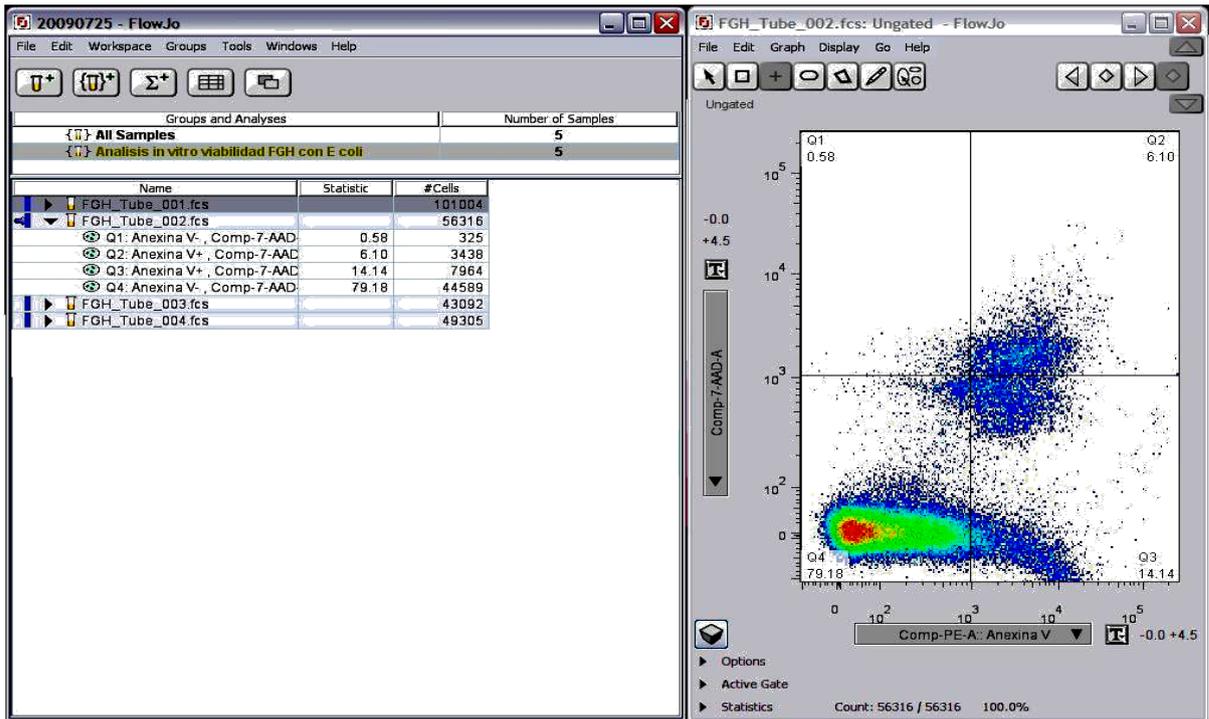


Figura 15. Análisis por citometría de flujo Control positivo con *Porphyromonas gingivalis*.

La respuesta de los fibroblastos al ser infectados por *E.coli* ATCC 25992 es manifiesta por muerte celular en un bajo porcentaje de 2.85% (Anexina V-PE y 7AAD positivo) y apoptosis temprana de 9.8 % Ver resultados Figura 16

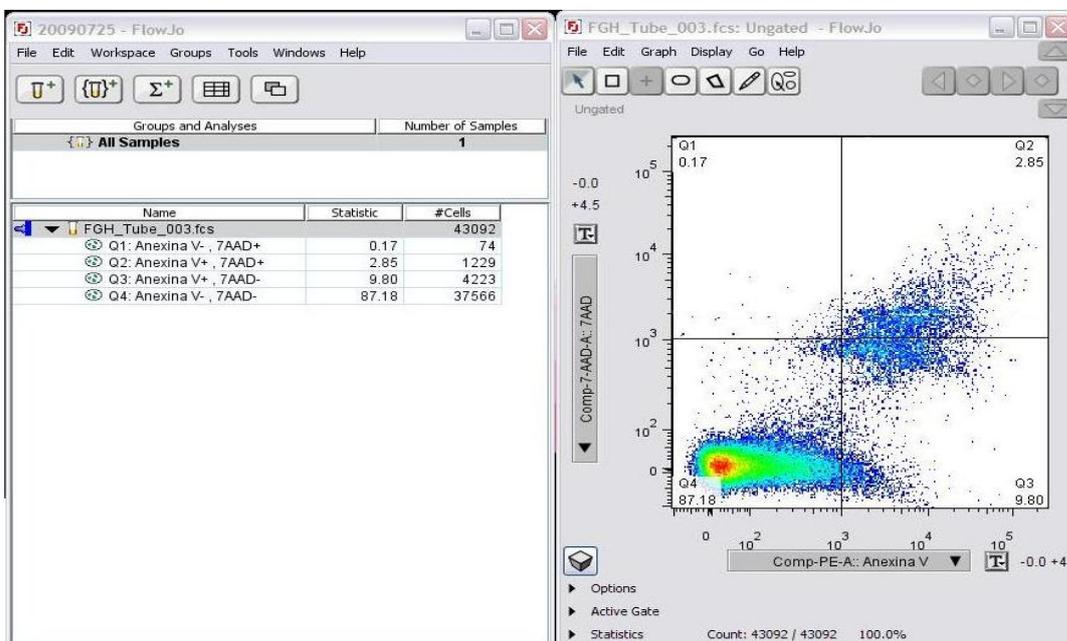


Figura 16. Análisis por citometría de flujo FGH infectados con *E. coli* ATCC 25992

Mientras que los fibroblastos gingivales humanos al ser infectados con el aislamiento de *E. coli* A8, alteran su viabilidad después de dos horas de

contacto e inducen apoptosis temprana en 16.55% y muerte celular en un 3.71%. Ver figura17.

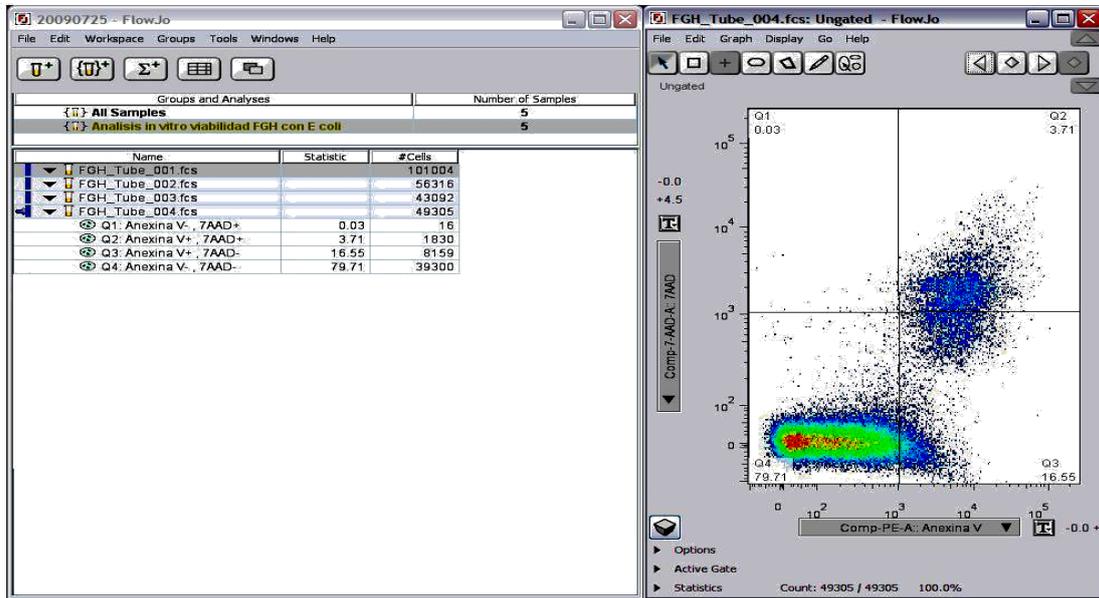


Figura 17. Análisis por citometría de flujo FGH infectados con un aislamiento periodontal de *E.coli*.

En la siguiente tabla se presentan los valores al hacer la evaluación de la apoptosis de FGH al ser infectados por *Escherichia coli* de acuerdo a los resultados expresados en los cuadrantes del citómetro de flujo.

	Control sin Tto	<i>P.gingivalis</i>	<i>E.coli</i> ATCC	Ais. <i>E.coli</i> A-8
Q1	0	0.58	0.17	0.03
Q2	0.28	6.1	2.85	3.71
Q3	4.92	14.14	9.8	16.55
Q4	94.8	79.18	87.18	79.71

Tabla 5 Evaluación de apoptosis de FGH al ser infectados por *E. coli*

**Q 1: 7-AAD negativo**

**Q 2: Anexina –VPE y 7-AAD positivo equivalente a los estados finales de apoptosis y muerte celular**

**Q 3: Anexina –VPE positivo y 7-AAD negativo equivalente a los estados de apoptosis temprana**

**Q 4: Anexina –VPE y 7-AAD negativo equivalente a células viables**

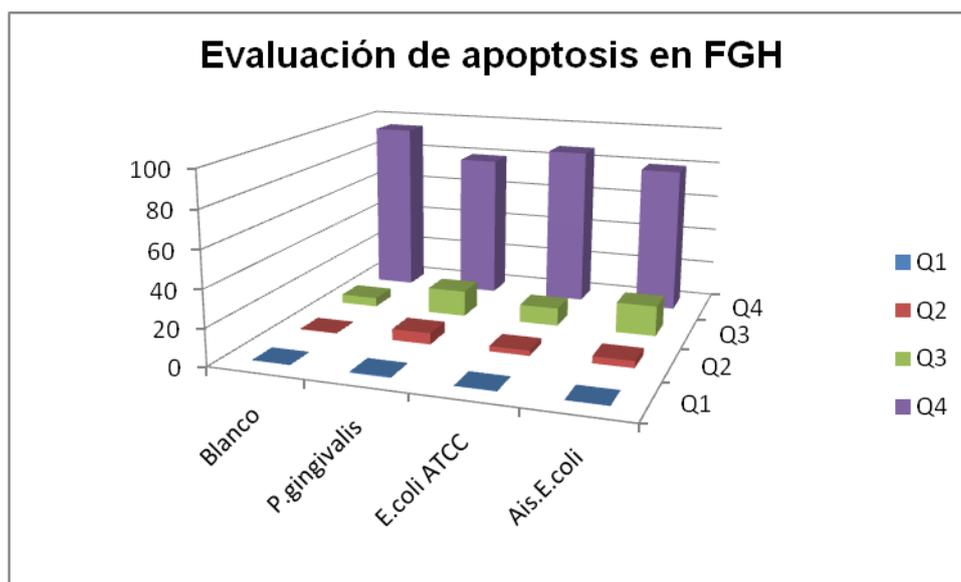


Gráfico 3 Análisis por citometría de flujo Evaluación de apoptosis de FGH al ser infectados por *E. coli*.

Células tratadas con *E.coli* ATCC 25922 permanecieron viables en 87.18% y murieron o sufrieron apoptosis en un 12.82%. Mientras que los FGH al ser infectados con el aislamiento de *E.coli* A8 permanecieron viables en un 79.71%. Las células sin infectar sufrieron apoptosis y muerte en tan solo 5.2% evidente al ser comparadas con los FGH que fueron infectados con bacterias.

Se evidencia que los FGH pueden sufrir apoptosis en un 16.55% comparado con un 14.14% producido por el contacto con *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Ver gráfico 3.

Teniendo el modelo de infección de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, se aprecia que las dos cepas de *Escherichia coli* producen muerte o apoptosis tardía de manera similar después de dos horas de co-cultivo.

## 6 DISCUSIÓN

El trabajar con cultivo celular primario permitió estudiar la participación de los fibroblastos gingivales humanos en modelos de infección de la enfermedad periodontal, perfilando su papel de célula accesoria del sistema inmune en los tejidos de la cavidad oral (Andrian, 2004).

Los cultivos de células primarias siguen siendo un modelo de experimentación muy importante para la ciencia, como alternativa preliminar de la investigación en modelos animales. La odontología, en los últimos años ha querido enfocar sus investigaciones hacia el análisis de eventos celulares y moleculares ocurridos en los tejidos orales, tanto en estados de normalidad como en estados de patología. Para tal fin se vienen desarrollando cultivos primarios de células involucradas en dichos eventos, como un modelo de aporte al conocimiento de enfermedades como la periodontitis (González, 2002).

La adherencia e infección de las bacterias orales a los fibroblastos ha sido previamente descrita (Gutierrez-Venegas 2007; Andrian, 2004; Dogan, 2000). Sin embargo, no había reportes que evaluaran los aislamientos clínicos de enterobacterias de cavidad oral como *Escherichia coli* infectando e induciendo alteraciones en la viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos. El propósito de esta investigación fue el de infectar monocapas de fibroblastos gingivales humanos con aislamientos clínicos de *Escherichia coli* para determinar alteraciones en la viabilidad de estas células. Con este estudio se demostró que el aislamiento de *Escherichia coli* a partir de muestras de placa subgingival de paciente con periodontitis crónica severa puede alterar *in vitro* la viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos induciendo apoptosis temprana después de dos horas de infección.

La inducción de apoptosis de los fibroblastos gingivales humanos por *Porphyromonas gingivalis* y sus proteasas ha sido estudiada (Wang, 1999; Urnowey, 2006; Arce, 2007; Stathopoulou, 2009). Todos los estudios reportados se han realizado bajo diferentes variables como la multiplicidad de

infección MOI que varia desde 50 hasta 200 bacterias por célula, o el tiempo de infección que ha oscilado desde una hora hasta 48 horas de infección. Estos parámetros han sido críticos para determinar si sucede o no apoptosis. *P. gingivalis* induce poca apoptosis en FGH a tiempos tempranos, pero es significativa a las 24 horas de cultivo (Urnowey, 2006). Los resultados de estos estudios sugieren heterogeneidad en la habilidad de las diferentes cepas de *P. gingivalis* para adherirse a los fibroblastos gingivales como la cepa ATCC 33277 que es altamente adherente pero no invasiva (Pathirana, 2007). Con el presente trabajo es la primera vez que se evalúa apoptosis de los fibroblastos gingivales humanos inducida por una enterobacteria aislada de cavidad oral. En este estudio se tuvieron en cuenta las variables con mínimos valores descritos en la literatura para ensayos de infección. Es así que se evaluó un tiempo de dos horas de infección, a una multiplicidad de infección de cincuenta bacterias por célula (MOI 1:50) con el fin de tener una línea base de referencia para estudios posteriores.

La muerte celular por apoptosis es un proceso fisiológico importante que aparece estar programado de manera intrínseca. Sus características son distintivas por los cambios morfológicos en el núcleo y citoplasma, rompimiento de la membrana y el fraccionamiento de la cromatina en sitios específicamente espaciados (Stathopoulou, 2009). Sin embargo, el presente estudio no permitió conocer el mecanismo de apoptosis en fibroblastos gingivales humanos inducido *in vitro* por *Escherichia coli* aislada de cavidad oral porque es un estudio preliminar de la interacción entre estos dos sistemas. Este estudio servirá de base para realizar estudios con miras a determinar si es un mecanismo extrínseco inducido por alguno de sus factores de virulencia como es el ocasionado por las proteasas de *Porphyromonas gingivalis* (Urnowey, 2006).

Para que los microorganismos colonicen el periodonto y alteren su función, deben poseer factores de virulencia capaces de sobrepasar las defensas del hospedero e iniciar un proceso infeccioso. Muchos de estos factores son mecanismos que promueven la colonización y persistencia en la cavidad oral. Se han estudiado varios mediadores como las fimbrias, adhesinas, cápsulas,

lipopolisacáridos (LPS) y vesículas extracelulares que pueden contribuir a la adhesión de bacterias como *Porphyromonas gingivalis* (Dogan, 2000; Holt, 2000). Los resultados obtenidos en esta investigación permiten inferir que la estructura de *Escherichia coli* induce cambios en la viabilidad de los FGH posiblemente por la adhesión de la bacteria a los mismos, ya que muchas de sus cepas tienen capacidad de agregación y emplean diferentes sistemas para este fin. Posee varios factores de virulencia como fimbrias tipo I, II y curli, cuya expresión causa prominente autoagregación de células bacterianas lo que favorecería la formación del biofilm (Sherlock, 2005). Por otra parte, el efecto sobre los fibroblastos gingivales podría ser causado por su lipopolisacárido LPS, por producción de toxinas o por efectos de la agregación de *Escherichia coli*.

Los bacilos entéricos son microorganismos considerados oportunistas en la cavidad oral, asociados al pobre control de la contaminación cruzada y al desconocimiento de las medidas de higiene adecuadas. Teniendo en cuenta que *Escherichia coli* es poco exigente en sus necesidades nutritivas, y que de acuerdo a los resultados de la cinética de crecimiento en este estudio, del aislamiento de *E. coli*, se podría afirmar que su crecimiento fue favorecido por el medio DMEM suplementado con vitaminas, piruvato y suero fetal bovino, acelerando su interacción *in vitro* con los FGH.

Esta comprobado que *E.coli* puede producir infecciones oportunistas fuera del tubo digestivo, cuando se presentan factores predisponentes debido a su habilidad para adquirir, acumular y compartir elementos extracromosómicos, codificando para factores de virulencia o de resistencia a antibióticos (Scolozzi, 2005). Algunos autores han relacionado la exacerbación y falta de respuesta al tratamiento de la enfermedad periodontal con la presencia de flora bacteriana inusual dentro del biofilm subgingival (Ferreira dos Santos, 2002). También se han reportado casos de osteomielitis submandibular ocasionada por *Escherichia coli* (Scolozzi, 2005). Al haberse demostrado en este estudio que la supervivencia de FGH se ve alterada por la infección de *E.coli*, y conociendo su habilidad para adherirse y permanecer en el medio expresando sus factores de virulencia, no se debe subestimar su presencia a este nivel en los pacientes

con enfermedad periodontal, ya que aun no se ha establecido el impacto que puede tener el surco gingival como reservorio de este microorganismo.

En Colombia, en un estudio reciente se encontró 34.5% de bacilos entéricos, de los cuales el 7% correspondía a *E.coli* en la flora subgingival de pacientes con periodontitis en varias regiones del país relacionándolas con bajo nivel de desarrollo de las poblaciones (Laufarie, 2007). A pesar que su presencia en cavidad oral es considerada más un fenómeno epidemiológico que patológico.

Es relevante conocer la estructura de esta enterobacteria y la versatilidad de sus factores de virulencia ya que pueden jugar un papel importante en la adhesión y coagregación durante la formación del biofilm subgingival y por consiguiente en la etiopatogenesis de la enfermedad periodontal.

Este trabajo es el primero en mostrar *in vitro* la capacidad de alteración de la viabilidad de los fibroblastos gingivales al ser infectados con un inóculo de *Escherichia coli* proveniente de una bolsa periodontal. Los resultados de esta investigación sugieren que la presencia de enterobacterias representadas por *Escherichia coli* en pacientes con enfermedad periodontal puede ser un factor que debe ser considerado en la etiopatogenia de la misma.

El análisis por citometría de flujo ha sido empleado por varios autores para establecer la adhesión de diferentes bacterias periodontopatogénicas a las células del tejido conectivo oral (Pathirana, 2007) y para evaluar la inducción de apoptosis de las mismas células (Wang, 1999; Stathopoulou, 2009). En el presente estudio se analizó por citometría de flujo la viabilidad de los fibroblastos gingivales al ser infectados por aislamientos clínicos de *E. coli* empleando un kit de Anexina V.PE BD Pharmigen. Los resultados fueron analizados por el programa flowjo, demostrando que después de dos horas de infección, persiste un mayor porcentaje de células viables, para todos los eventos investigados. Sin embargo, fue notorio la demostración de apoptosis temprana de los FGH inducida por el aislamiento de *Escherichia coli* manifiesta en un 16.55% comparado con 14.14% inducido por *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Se esperaría que a una mayor multiplicidad de infección y en un tiempo mayor de contacto, estos valores aumenten, de la misma manera como ha sido estudiado para otras bacterias orales (Pathirana, 2007).

Los resultados de este estudio permiten establecer la necesidad de realizar otros estudios que permitan evaluar la capacidad de penetración e invasión de *Escherichia coli* en los tejidos periodontales. Por ejemplo, realizar evaluación mediante microscopía electrónica o por medición de la respuesta inmune de las células del tejido periodontal.

## 7 CONCLUSIONES

Se logró establecer un modelo para evaluar *in vitro* la supervivencia de FGH al ser cultivados con *Escherichia coli*.

El patrón de crecimiento para poblaciones de FGH evaluado mediante curva de crecimiento fue normal con respecto a lo referenciado en la literatura.

La curva de crecimiento para el aislamiento clínico de *Escherichia coli* tuvo un comportamiento similar con respecto al control *E. coli* ATCC 25922.

El aislamiento de *E. coli* A8 altera la viabilidad *in Vitro* de FGH, induciendo apoptosis temprana.

Las enterobacterias representadas por *Escherichia coli* alteran la viabilidad *in vitro* de FGH, induciendo apoptosis temprana.

Bacterias como *Escherichia coli* pueden estar relacionadas con periodontitis severa.

Los cultivos de fibroblastos gingivales humanos continúan siendo un apoyo en la investigación básica para el avance en los estudios de la etiopatogenia de la enfermedad periodontal.

## **8 PERSPECTIVAS**

Se espera continuar con el estudio de las bacterias inusuales presentes en la bolsa periodontal y proporcionar evidencia científica con respecto a su papel en la etiología de la periodontitis.

Es de interés conocer aun más al fibroblasto gingival, profundizar en el entendimiento de su papel dentro de la etiopatogénesis de la enfermedad periodontal y su perspectiva terapéutica en el futuro.

Este tipo de estudios resultarían de mayor impacto si se incluyen ensayos con mayores variables como son el número de bacterias infectantes por célula a infectar, varios tiempos de infección, pruebas de inmunohistoquímica y evaluación por microscopía electrónica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A. (2006). El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogenicidad dentro del periodonto. *Univ. Odontológicas* 25(57):26-33
- Armitage, G. (1999). International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*. 4(7): 100-106.
- Amano, A. (2003). Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *Journal Periodontology* 74(1): 90-96
- Andrian, E., Grenier, D. and Rouabhia, M. (2004). In Vitro Models of Tissue Penetration and Destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*. 72 (8): 4689-4698
- Arce, R. Tamayo, O., y Cortes, A. (2007). Apoptosis de fibroblastos gingivales en periodontitis. *Colombia Médica*. 38(3): 197- 209
- Arévalo, F. Pérez, P y Cotte, C. (2004). Obtención de Láminas de Piel Humana mediante Ingeniería de Tejidos. *Acta Científica Venezolana* 55: 74-82
- Asikainen, S and Chen, C (2000). Oral ecology and person to person transmission of *Actinobacillus actinomycetencomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000, 20: 65-81
- Baba, A., Kadowaki, T., Asao, T. and Yamamoto, K. (2002) Roles for Arg- and Lys-gingipains in the disruption of cytokine responses and loss of viability of human endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis* infection. *Biol Chem*, 383 (7-8): 1223-1230.
- Barbosa, FC, Mayer, MP, Saba, E, and Cai, S. (2001) Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*, 16(5): 306-10.
- Bartold, M. (2006, a). Periodontal tissues in health and disease: introduction. *Periodontology* 2000, 40:7-10
- Bartold, M and Narayanan, S. (2006, b) Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues *Periodontology* 2000, 40: 29-49
- Bartold, M. Walsh, and Narayanan, S. (2000). Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology* 2000, 24: 28-55
- Belibasakis, G.N., Mattsson, A., Wang, Y., Chen, C and Johansson, A. (2004). Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal

ligament cells by *Actinobacillus actinomycetencomitans* involvement of the cytolethal distending toxin. APMIS 112: 675-685

Biasoli, M. and Magaro, H. (2003). Efecto in vitro de hidratos de carbono y bacterias entericas en la adherencia de *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micologia.20: 160-163

Bodet,C., Chandad,F and Grenier, D. (2005) Modulation of cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* in a macrophage and epithelial cell co-culture model. Microbes Infect, 7(3): 448-56

Bodet,C., Chandad,F and Grenier, D. (2006) Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. Microbes Infect. 8:27-35

Botero,JE. Gonzalez, AM, Mercado,RA, Olave,G and Contreras,A.(2005) Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. Journal Periodontology, 76(9): 1490

Chen,T., Nakayama,K. Belliveau,L. and Duncan, M. (2001).*Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. Infect.Immun. 69:3048-3056

Chen,T. and Duncan ,M. (2004) Gingipain adhesin domains mediate *Porphyromonas gingivalis* adherence to epithelial cells. Microb Pathog; 36(4): 205-209

Cohen,W. (1998).Periodontal aspects of systemic health. Compendium 19:4-55

Darveau, R.,Tanner, A. and Page, R. (1997) The Microbial challenge in Periodontitis. Periodontology 2000, 14: 12-32

Dierickx, K., Pauwels, M. Van Eldere, J., Cassiman,J., Van Steenberghe,D and Quirynen,M.(2002).Viability of cultured periodontal pocket epithelium cells and *Porphyromonas gingivalis* association. J. Clin Periodontol, 29(11): 987-996.

Doan, N., Contreras, A, Flynn, J. Morrison,J and Slots,J (1999) Proficiencies of Three Anaerobic Culture Systems for Recovering Periodontal Pathogenic Bacteria J. Clin. Microbiol, 37: 171 – 174.

Dixon,D; Bainbridge,B. And Darveau,R. (2004).Modulation of the innate immune response within the periodontum. Periodontolgy 2000, 35: 53-74

Dogan, S., Gunzer, F., Guenay, H., Hillman, G. (2000).Infection of primary human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella Intermedia*. Clinical oral investigation. 4: 35-41

Duncan, L., Yoshioka, M., Chandad, F. and Grenier, D. (2004) Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microbial Pathog*, 36(6): 319-25.

Edwards, A., Jenkinson, H., Woodward, M. and Dymock, D. (2005). Binding properties and adhesion-mediating regions of the major sheath protein of *Treponema denticola* ATCC 35405. *Infection and Immunity*. 73(5): 2891-2898

Ellen, R. (1999). Perturbation and exploitation of host cell cytoskeleton by periodontal pathogens. *Microbes and Infection*. 1: 621-632

Fayad, M., Hurtado, P., Laufarie, G., Galindo, R., Cadena, A. (2002). Detección de *Porphyromonas gingivalis* y bacilos entéricos en pacientes con periodontitis crónica severa en una muestra de población de Bogotá. D. C. *Revista Científica Facultad Odontología Universidad el Bosque*. 8 (1):28-37

Fayad, M., Laufarie, G., Contreras, A., Castillo, D. (2007). Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá: un acercamiento epidemiológico. *Biomédica* 27: 21-33

Felton, D., Lang, B. (1997). Periodontal pathogen-related stimulation indicates unique phenotype of primary cultured human fibroblasts from gingiva and periodontal ligament: implications for oral health disease. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 77(2): 191-196

Feng, Z. and Weinberg, A. (2006). Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology* 2000, 40: 50-76

Ferreira dos Santos, S., Sanches, J., Paiva, C., Cardoso, A. (2002). Prevalencia e sensibilidade in Vitro de enterobacteriaceae e pseudomonas isoladas da cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. *Pos-grad Rev Odontol* 5:74-83

Freshney, 2000. *Culture of animal cells*. Fourth edition; Wiley-Liss publication. 184, 235, 259

Gil-Loizaga (2006). *Cultivo de células y tejidos animales. Manual de conceptos básicos*. Edita: Cátedra de Neurobiología de la Audición. Universidad Complutense de Madrid.

Gillies, R.; Didier, N., Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer culture. *Analytical Biochemistry*. 159: 109-113

Golberg, S., Cardash, H., Browning H III, Salí, H. and Rosemberg, M. (1997). Isolation of Enterobacteriaceae from mouth and potential association with malodour. *Journal Dental Research* 76:1770-1775

Glickman,F; Carranza, F. (1999). Periodontología Clínica. Interamericana McGraw-Hill. Octava Edición.

González, A., Pereira, R., Osorio, G. y González, J. (2002). Obtención y caracterización de un cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos. Revista Facultad de Odontología Universidad de Chile; 20 (2):32-41

Guilarte, C. (2005). Bacterias periodonto patógenas: bacilos anaerobios gram negativos como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal. Acta Odontológica Venezolana. 43: 2

Grady, J., Lummis,W. and Smith, Ch.(1960). Alternate methods for measuring cell growth.Cancer Research. 20:1114-1117

Graves,D., Jiang, Y. and Genco C. (2000). Periodontal Disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health.Current Opinion in Infectious Disease. 13:227-232

Gutierrez-Vanegas, G.,Contreras, L. Roman, P. and Barajas, C. (2008). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide affects human gingival fibroblast cytoskeletal organization. Cell Biology International. 32 (10):1045-1050.

Gutierrez-Vanegas, G.,Kawasaki, P.. Roman, P. and Barajas, C. (2007). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization.Cell Biology International. 31(9):1063-1068

Haffajee A.Socransky (1994). Microbial aetiological agents of destructive periodontal disease. Periodontology 2000, 5: 78-111

Haffajee, A. Socransky (2005).Microbiology of Periodontal diseases: introduction. Periodontology 2000. 38:9-12

Hajishengallis, G., Arce,S.,Gockel, C.M., Conell,T.D. and Rusell,M.W. (2005) Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: application for oral infections.Critical review in oral biology and medicine. Journal Dental Research. 84(12): 1104-1116

Hakimuddin, T., Han,Y., Hamada,N., Sharma,A. and Genco, R.(1999). Role of de amino.terminal region of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in adherence to epithelial cells. Infection and Immunity 67 (11):6173-6176

Holt, S.,Kesavalu, L and Genco, C. (2000). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontology 2000, 20:168-237

Houalet-Jeanne, P. Pellen-Mussi, S. Tricot-Doleux, J. Apiou, and M. Bonnaure-Mallet (2001). Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy. Infection and Immunity, 69(11): 7146-7151,

III Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB III. (1998) Oficina de Epidemiología Ministerio de Salud Bogotá.

Ishikawa, I., Nakashima, K., Koseki, T., Nagasawa, T., Watanabe, H., Arakawa, S., Nitta, H. and Nishijara, T. (1997). Induction of the immune response to periodontal bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000, 14; 79-111

Johansson, A., Bergenholtz, A. and Holman, S. (1996). Strong cytotoxicity to human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. *Journal of Periodontal Research*; 31(7): 477-482

Kato, S., Nakashima, K., Inoue, M., Tomioka, J., Nonaka, K., Nishihara, T. and Kowashi, Y. (2000). Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetencomitans* infection. *Journal of Medical Microbiology*; 49: 739-745

Kinane, D. (2005). Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetencomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *Jornada Académica Internacional, Sociedad Colombiana de Periodoncia Regional Bogotá* Febrero 25

Koneman, E., Allen, S., Dowell, V. and Sommers, H. (1987) Diagnóstico Microbiológico. Editorial Panamericana Capítulos 2 y 10: 152-185, 342-371.

Kornman, K., Page, R., Tonetti, M. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000; 14: 33-53

Laufarie, G. (2007) Demographic and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia. *Journal Periododontology* 78( 4): 629-639

Lindhe, J. (2000) .Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Editorial Panamericana. Capítulos 3 y 4: 102-179

Margarit, H., Belda, J., Casan, P. y Sanchos, J. (2005); Método para amplificar cultivos primarios de células epiteliales bronquiales *Arch Bronconeumol*, 41:524-527.

Marriott, H., Bingle, C., Read, R., Braley, E., Kroemer, G., Dockrell, H. (2005). Dynamic changes in Mcl-1. expression regulate macrophage viability or commitment to apoptosis during bacterial clearance. *J.Clin.Invest.* 115:359-368

Martin, M., Katz, J., Vogel, S. and Michalek, S. (2001). Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *Journal of Immunology* 167: 5278-5285

- Nanninga, N. Morphogenesis of *Escherichia coli*.(1998) Microbiology and molecular biology reviews. 62(1):110-129
- Offenbacher, S. (1999). Periodontitis, a potential risk factor for spontaneous preterm birth. Compendium. 19: 32-39
- Page, R. and Kornman, K.(1997). The pathogenesis of human periodontitis, an introduction. Periodontology 2000, 14:9-11
- Pathirana, R., O'Brien, N., Visvanathan, K., Hamilton, J. and Reynolds. (2007) E. Flow cytometric analysis of Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral epithelial cells. Infection and Immunity, 75 (5): 2484-2492
- Pesola, G. (2004). Are teeth a reservoir for respiratory pathogens? CHEST, 126:1401-1403
- Piche, J.E., Carnes, D.L. and Graves, D.T. (1989). Initial characterization of cell derived from Human Periodontia. Journal of Dental Research. 68;5:761-767
- Pogulske Fox, A; Kosarov, E; y Donn, J W (1999). *Porphyromonas gingivalis* virulence factors and invasion of cells of the cardiovascular system. Journal of Periodontal Research. 34: 393-397
- Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PPE, Williams PH, and Chaple ILC (2005). Stress and the periodontal diseases: growth responses of periodontal bacteria to *Escherichia coli* stress-associated autoinducer and exogenous Fe. Oral Microbiology Immunology 20: 147-153
- Rudney, J., Chen, R., Sedgewick, G. (2001). Intracellular *Actinobacillus actinomycetencomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. Infection and Immunity, 69(4): 2700-2707
- Rudney, J., Chen, R., Sedgewick, G. (2005) *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells." Journal of Dental Research, 84: 59-63
- Sedgley, C.M., Samaranayake, LP, Chan, JC and SH Wei, SH (1997) A 4-year longitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children". Oral Microbiol Immunol, 12(3): 183-188.
- Scolozzi, P. Lombardi, T., Edney, T. and Bertrand, J. (2005). Enteric bacteria in mandibular osteomyelitis. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod. 99:E42-46
- Sheets, S., Potempa, J., Travis, J., Casiano, C. and Fletcher, H. (2005) Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion

molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. *Infection and Immunity*, 73: 1543 - 1552.

Sherlock, O., Munk, R. And Klem, P. (2005). The TibA adhesion/invasion from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and Immunity*. 73;4: 1954-1963

Stathopoulou, P., Galicia, J., Benakanakere, M. Garcia, C., Potempa, J. Kinane, D. (2009). *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiology*, 9:107

Slots, J. Ting, M. (2000). *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *Periodontology* 2000, 20: 82-120

Socransky, S Hafajee, A. (2004). Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetencomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontology* 2000, 25: 341- 358

Sugiyama, A., Uehara, A., Matsushita, K., Nakamura, R., Ogawa, T., Sugawara, S. Takada, H. (2002). Activation of human epithelial cells by cell-surface components of black pigmented bacteria: augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony-stimulation factor and expression of intercellular adhesion molecule 1. *Journal of Medical Microbiology* 51:27-33

Takii, R., Kadowaki, T., Baba, A., Tsukuba, T. and Yamamoto, K. (2005). A functional virulence complex composed of gingipains, adhesions and lipopolysaccharides shows high affinity to host cells and matrix proteins and escapes recognition by host immune system". *Infection and Immunity*; 73 (2):883-893

Urnowey, S., Ansai, T. Bitko, V., Nakayama, K., Takehar, T. and Barik, S. (2006). Temporal activation of anti and pro apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiology*; 6:26

Wang, P. and Ohura, K. (2002). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signalling in gingival fibroblasts CD14 and Toll like receptors. *Crit.Rev. Oral Biol. Med.*; 13(2): 132-142

Yoonsuk, P., Yilmaz, O., Jung, I. and Lamont, R. (2004). Identification of *Porphyromonas gingivalis* genes specifically expressed in human gingival epithelial cells by using differential display reverse transcription-PCR. *Infection and Immunity*. 72(7): 3752-3758

## **ANEXOS**

**ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN- TOMA DE MUESTRA DE SURCO GINGIVAL**

**ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN – TOMA DE MUESTRA DE TEJIDO GINGIVAL**

## ANEXO 1

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN

*Estudio:* “Análisis in Vitro de la viabilidad de fibroblastos gingivales en asociación *Escherichia coli* “

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por: la Dra. MARIA CLAUDIA CASTRO ZARATE, es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: a) Su participación es totalmente voluntaria. b) El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permita clarificar muchos conceptos sobre. LA Enfermedad periodontal c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras. F) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados y por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. g) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. h) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

#### **EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO**

##### **OBJETIVO:**

##### **PROCEDIEMIENTO:**

Usted padece de Periodontitis (enfermedad periodontal crónica avanzada). Esta es causada principalmente por el acumulo de bacterias alrededor del diente y dentro de la encía. Para saber cuáles son algunas de esas bacterias, se le introducirá un cono de papel a nivel del surco gingival (entre la encía y el diente) y esta muestra se transportará en un medio especial para ser estudiado en la presente investigación

##### **RIESGOS E INCOMODIDADES:**

La participación en este estudio representa para usted un mínimo riesgo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento

ANEXO 2

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRA E INCLUSION  
VOLUNTARIA  
EN EL ESTUDIO**

Yo, \_\_\_\_\_ identificado con documento de  
identificación No. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_,  
acepto voluntariamente que se me tome una muestra del surco gingival  
mediante conos de papel, con el fin de realizar un estudio de las bacterias que  
se encuentran en este sitio. Así mismo, declaró que se me ha explicado la  
presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.  
Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Paciente, Acudiente, Representante legal

\_\_\_\_\_

Investigador

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN

*Estudio: Análisis in Vitro de la viabilidad fibroblastos gingivales en asociación con Escherichia coli*

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por: la Dra. Maria Claudia Castro Zárate, es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: a) Su participación es totalmente voluntaria. b) El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permita clarificar muchos conceptos sobre. La enfermedad periodontal\_\_\_\_\_ c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras. F) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados y por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. g) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. h) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

### EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

#### PROCEDIIMIENTO:

Usted necesita que se le retire tejido gingival (encía), con fines estéticos y/o funcionales (embellecimiento y función) o con el fin de poderle tomar una impresión para ser rehabilitado. Para tal fin, se le anestesiara localmente y mediante un proceso quirúrgico se le eliminará el tejido correspondiente. Este material biológico (encía) no será desechado sino que se empleará en un estudio de investigación

#### RIESGOS E INCOMODIDADES:

La participación en este estudio representa para usted un mínimo riesgo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representadas exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRA E INCLUSION  
VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO**

Yo, \_\_\_\_\_ identificado con documento de  
identificación No. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_,  
acepto voluntariamente que se me tome una muestra de mi encía ,. Así mismo,  
declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se  
le dará al material de muestra.

Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Paciente, Acudiente, Representante legal

\_\_\_\_\_

Investigador