



## Efecto del lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico (LTA) sobre la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en células pulpares humanas

Ana Guadalupe Ontiveros Granados,\* Gloria Gutiérrez Venegas,\* María del Rosario Lazo García\*

### RESUMEN

Las toxinas bacterianas como el lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico (LTA), están presentes en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente. Éstas originan el proceso inflamatorio pulpar. En este estudio, se investigó el efecto de LTA y LPS sobre la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 en células pulpares humanas. Se partió de la hipótesis de que estas moléculas participan en el proceso inflamatorio pulpar a través de la síntesis de la ciclooxigenasa-2 en células pulpares humanas. Para evaluar esta hipótesis, se estudió el efecto del LPS y el LTA en cultivos primarios de células pulpares humanas. Finalmente, se caracterizaron las vías y moléculas involucradas en la expresión de COX-2. En las células pulpares humanas tratadas con LTA o LPS, se detectó que estas moléculas promueven la expresión de COX-2. Por otro lado se encontró que la expresión de COX-2 se ve bloqueada por tratamientos con SB203580, PD98059 y estaurosporina. Los resultados demostraron que el tratamiento con LTA y LPS promueven la expresión de COX-2 en eventos donde participan las proteínas cinasas p38, ERK y PKC. Los hallazgos son importantes porque COX-2 está involucrada en la síntesis de PGE<sub>2</sub>, involucrada en el establecimiento de procesos inflamatorios crónicos. Finalmente se caracterizó la naturaleza de un mediador implicado en el proceso de una pulpitis.

### ABSTRACT

Bacterial toxins such as lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) can be found in Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. This toxins cause an inflammatory process denominated pulpitis. In the present study, the effect of LTA and LPS on the expression of cyclooxygenase-2 in human dental pulp cells was investigated. For this study a hypothesis was made, that this molecules take part in the dental pulp inflammatory process through the cyclooxygenase-2 synthesis in human pulp cells. To evaluate this hypothesis the effect of LPS and LTA was studied in primary cultures of human pulp cells. Finally, the pathways and molecules involved in COX-2 expression were characterized. In human dental pulp cells treated with LTA or LPS, it was detected that these molecules promote COX-2 expression. On the other hand, it was founded that the expression of COX-2 in human pulp cells was blocked by treatments with SB203580, PD98059, and Estaurosporine. The results of the present study demonstrate that treatments with LTA and LPS promote COX-2 expression in events related with protein kinase p38, ERK and PKC. The findings of this investigation are important because COX-2 is related to the synthesis of PGE<sub>2</sub>, which leads to a chronic inflammatory process. Finally, the nature of a mediator implied in the pulpitis process was characterized.

**Palabras clave:** Ácido lipoteicoico, LTA, lipopolisacárido, LPS, ciclooxigenasa, COX-2, prostaglandina E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, ERK, proteína cinasa regulada extracelularmente, PKC, proteína cinasa C, JKN cinasa aminoterminal reguladora del factor de transcripción C-Jun, milimolar (mM).

**Key words:** LTA, lypoteichoic acid, LPS, lipopolysaccharide, COX-2, cyclooxygenase-2, PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, ERK, extracellular signal-regulated protein kinases, PKC, protein kinases C, JNK, C-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase.

### INTRODUCCIÓN

La pulpa es un tejido conectivo laxo de origen mesenquimatoso que presenta células especializadas formadoras de dentina: odontoblastos.<sup>1,2</sup> Como cualquier tejido conectivo la pulpa dental tiene la capacidad de establecer un proceso inflamatorio ante un estímulo agresor, mediante un gran número de mediadores químicos.<sup>10,11</sup>

La caries dental sigue siendo la principal vía para la entrada de microbios en el conducto radicular. El número de túbulos es variable entre 15,000 en la unión esmalte-dentina hasta 45,000 cerca de la pulpa, su tamaño oscila entre 1 y 4  $\mu$ m, mientras que la mayoría de las bacterias miden menos de 1  $\mu$ m. La exposición de los túbulos dentinarios puede convertirse en la vía para que se produzca la invasión microbiana del espacio pulpar.<sup>3,11,24</sup>

Los estreptococos son de los primeros colonizadores de la cavidad oral, y su capacidad de adhesión a

Abreviaturas usadas:

Ácido lipoteicoico, LTA; lipopolisacárido, LPS; ciclooxigenasa, COX-2; prostaglandina E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>; ERK, proteína cinasa regulada extracelularmente; PKC, proteína cinasa C; JNK cinasa amino terminal reguladora del factor de transcripción C-jun; milimolar (mM).

\* Laboratorio de Bioquímica, DEPel de la FO. UNAM.

la película adquirida es el primer paso en la colonización del diente en la caries dental y la formación de placa dentobacteriana. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos por los cuales las bacterias orales penetran o invaden la dentina causando pulpitis, infección del sistema de conductos radiculares y enfermedades en los tejidos periapicales.<sup>3,25</sup>

La caries dental es una enfermedad de los tejidos duros del diente donde predominan microorganismos Gram positivos, que presentan estructuralmente en su membrana celular la molécula conocida como ácido lipoteicoico (LTA).<sup>12,13</sup> El LTA está anclado por fuerzas hidrofóbicas a la membrana celular, sin embargo cuando la bacteria crece en un pH bajo, una porción significativa de LTA puede salir hacia el espacio extracelular, donde induce la expresión de diversos factores de la inflamación.<sup>3,10</sup> Se sabe que el LTA es un potente inductor de la actividad celular, la síntesis de citocinas y el factor proangiogénico: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),<sup>10,13,17,22,23</sup> que permite la neoformación de vasos que se observa en los sitios de infección, lo que provoca edema, aumento de la presión intrapulpar y dolor; sin embargo no se conoce la expresión de COX-2 por LTA en células pulpares humanas.<sup>10,17,22,23</sup>

Sabemos que las infecciones endodóncicas son polimicrobianas<sup>1-3,11</sup> aunque predominan las bacterias anaerobias estrictas, Gram negativas, las cuales presentan estructuralmente en su pared celular la molécula conocida como lipopolisacárido (LPS), que también se conoce como endotoxina, principal responsable del poder patogénico de estos microorganismos. La respuesta al efecto del LPS ha sido estudiada en macrófagos, monocitos, linfocitos, células plasmáticas, microglia, en fibroblastos gingivales humanos, fibroblastos pulpares humanos y odontoblastos;<sup>4,8,16-18,20,21</sup> donde se ha encontrado que es responsable de la inducción, no sólo de citocinas inflamatorias, sino también de otros factores como el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ).

Se sabe que los metabolitos del ácido araquidónico están involucrados en los procesos inflamatorios pulpares y en el dolor dental.<sup>14,15</sup> Estudios muestran que el tejido pulpar que manifiesta dolor se asocia a la alta concentración de prostaglandinas tipo PGE2 y PGF2 $\alpha$ .<sup>10,14,15</sup> Las prostaglandinas participan en muchos eventos celulares fisiológicos y en el proceso inflamatorio en la destrucción tisular por la activación de TNF $\alpha$  e IL-1.<sup>18</sup>

Las ciclooxigenasas (COX) son las encargadas de la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La enzima COX-1, es una enzima de tipo

constitutivo, COX-2 es una enzima de inducción rápida y transitoria, al igual que COX-3, que se expresa en cerebro y corazón.<sup>28</sup> Estudios previos muestran que COX-2 es inducida por la activación de diferentes rutas de señalización como la de las proteínas MAP cinasas (ERK, p38 y JNK) y PKC.<sup>23</sup>

El objetivo de este estudio es caracterizar la enzima COX-2 en diferentes dosis y a diferentes tiempos, por LPS (lipopolisacárido) y LTA (ácido lipoteicoico) en células pulpares humanas y a través del uso de inhibidores ver las vías de señalización involucradas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Reactivos

Ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguis* (SIGMA); lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (SIGMA), medio de cultivo modificado por Dubelcco (GIBCO BRL), antibiótico-antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomycin, amfotericina B (GIBCO BRL), medio de cultivo de Hanks (GIBCO BRL), colagenasa y peptidasa (Roche), anticuerpos anti-COX-2, anti- $\gamma$ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology), anti-goat (Santa Cruz Biotechnology).

### Cultivo celular

Las células pulpares humanas se obtuvieron a partir de muestras de tejido pulpar de terceros molares de pacientes de entre 18-20 años, clínicamente sanos, sin presencia de caries, ni otras patologías, con ápice abierto; que firmaron un consentimiento informado. Una vez realizada la extracción dental, se colocó el espécimen en medio de cultivo de Hanks. Por medio de limas endodóncicas estériles se obtuvo el tejido pulpar a través del ápice abierto. Se obtuvieron las células del tejido pulpar con colagenasa y peptidasa y tres ciclos de centrifugación. Las células se colocaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco adicionado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibiótico antimicótico. Se colocaron en la incubadora a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37 °C. Se utilizó el cultivo celular entre 3 y 5 pases en este estudio.

### Análisis de Western Blot

Las células pulpares humanas fueron sembradas en cajas de 6 pozos, para realizar experimentos tipos dosis-respuesta y curso-temporal. En los ensayos en los que se utilizó inhibidores, se preincubaron durante 30 minutos y se prosiguió con el estímulo al tiempo

indicado en el pie de la figura, los inhibidores utilizados fueron PD98059 (10  $\mu$ M) inhibe ERK, SB203580 (10  $\mu$ M) inhibe p38, SP600125 (10  $\mu$ M) inhibe JNK y estaurosporina (1  $\mu$ M) inhibe PKC. Después de colocar el LPS y el LTA, se retiró el medio y se dieron dos lavados con buffer de fosfato salino (PBS), adicionado con 1 mM de ortovanadato de sodio, las células se centrifugaron durante 5 min a 3,500 rpm a 4 °C y se resuspendieron en buffer de lisis

(Tris-HCl 20 mM, triton 1%, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, vanadato de sodio 1 mM, glicina 10%, todos de SIGMA). Las muestras fueron sonicadas en frío (1 X 30). Para hacer el análisis por Western Blot, se cuantificó la proteína por método de Bradford y se tomaron 50  $\mu$ g de proteína, que se mezcló con jugo azul (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% de azul bromofenol y 1.5% de Tris-HCl pH 6.8, todos de SIGMA, Chemical. CO.). Los geles en donde se corrió la muestra fueron de poliacrilamida al 10% (SIGMA) a 30 V por 2 horas. Las proteínas se transfirieron en membranas de PVDF (Amersham Biosciences) 15 V, 30 amp durante 30 min. La membrana fue bloqueada con solución de bloqueo (150 mM NaCl, 100 mM de Tris -HCl pH 7.8 (SIGMA) y 5% de suero bovino fetal (INVITROGEN), durante 30 minutos para posteriormente realizarse los lavados para la incubación del primer anticuerpo anti-COX-2, y en el caso de los controles anti- $\gamma$ -tubulina (1:1,000) (Santa Cruz, Biotechnology) la incubación se realizó durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con TBS (150 mM NaCl, 100 mM de Tris -HCl pH 7.8 y Tween 20 0.2%, todos ellos de SIGMA, Chemical. CO.). Se incubó el segundo anticuerpo anti-goat (1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology), durante 2 horas. Para observar las bandas del anticuerpo-proteína, se colocó el reactivo de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology). Los resultados se representaron como la media  $\pm$  error estándar y se interpretaron los resultados mediante la obtención de la t de Student. Los experimentos se realizaron en 3 ocasiones por separado y se presenta uno representativo de cada caso, así como su interpretación gráfica en base a la densidad óptica del por ciento del basal, donde el valor \*p < 0.05 fue estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### 1. Inducción de COX-2 por LTA y LPS en células pulpareas humanas, tratadas a diferentes tiempos.

La inflamación pulpar es el mecanismo de defensa que se desencadena en el tejido pulpar ante un agente agresor. Uno de los principales mediadores químicos que se producen en grandes cantidades

durante la inflamación del tejido pulpar son las prostaglandinas que son producidas por la enzima COX-2. Esta enzima es inducida por citocinas inflamatorias y por moléculas patógenas como el LPS, sin embargo poco se sabe de su inducción por LTA en células pulpareas humanas. Para observar la inducción de la enzima COX-2 por el LTA y LPS en células pulpareas humanas realizamos experimentos tipo curso temporal (0.5-6 h), la inducción se detectó desde los 30 minutos de tratamiento y la máxima inducción se mostró a las 6 horas para el LTA (*Figura 1A*) así mismo para el LPS (*Figura 1B*). Se corroboró la cantidad de proteína desnudando la membrana para incubar  $\gamma$ -tubulina como control.

### 2. El LPS y LTA inducen la expresión de COX-2 a diferentes dosis en células pulpareas humanas.

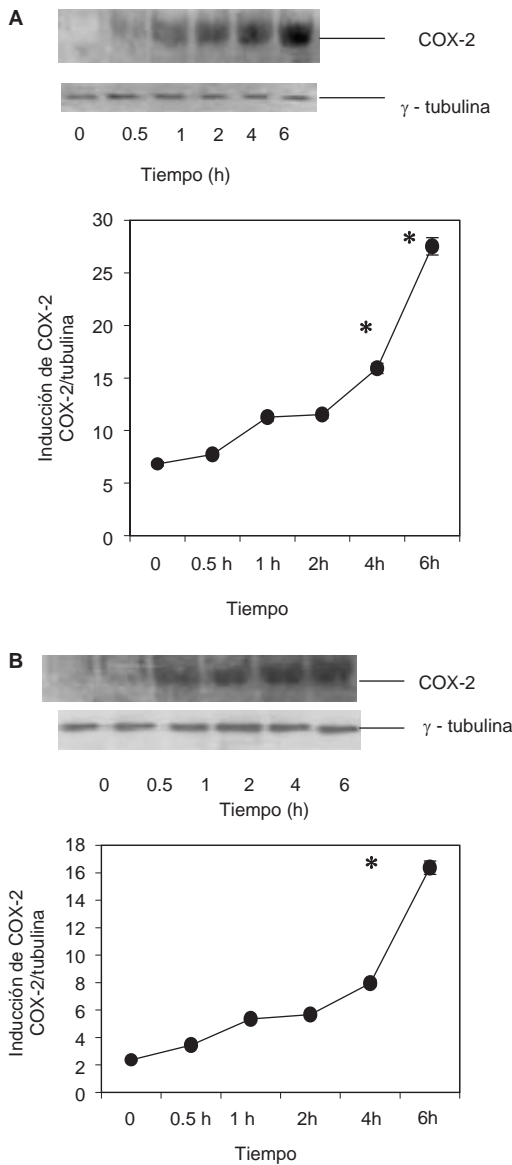
Para conocer las dosis máximas de inducción de COX-2 en células pulpareas humanas por LPS y LTA se realizaron experimentos tipo dosis-respuesta a un tiempo de 3 horas, encontramos una inducción de COX-2 por LPS desde 0.001  $\mu$ g/mL y la máxima inducción con 1  $\mu$ g/mL (*Figura 2A*). En el caso del LTA se utilizaron dosis desde 0.1  $\mu$ g/mL hasta 15  $\mu$ g/mL, encontramos la inducción desde 0.1  $\mu$ g/mL y la máxima inducción a 10  $\mu$ g/mL, para comenzar a declinar con 15  $\mu$ g/mL (*Figura 2B*).

### 3. Los inhibidores específicos de las MAPK (ERK, p38 y JNK) así como de PKC inhiben COX-2 en células pulpareas humanas tratadas con LTA.

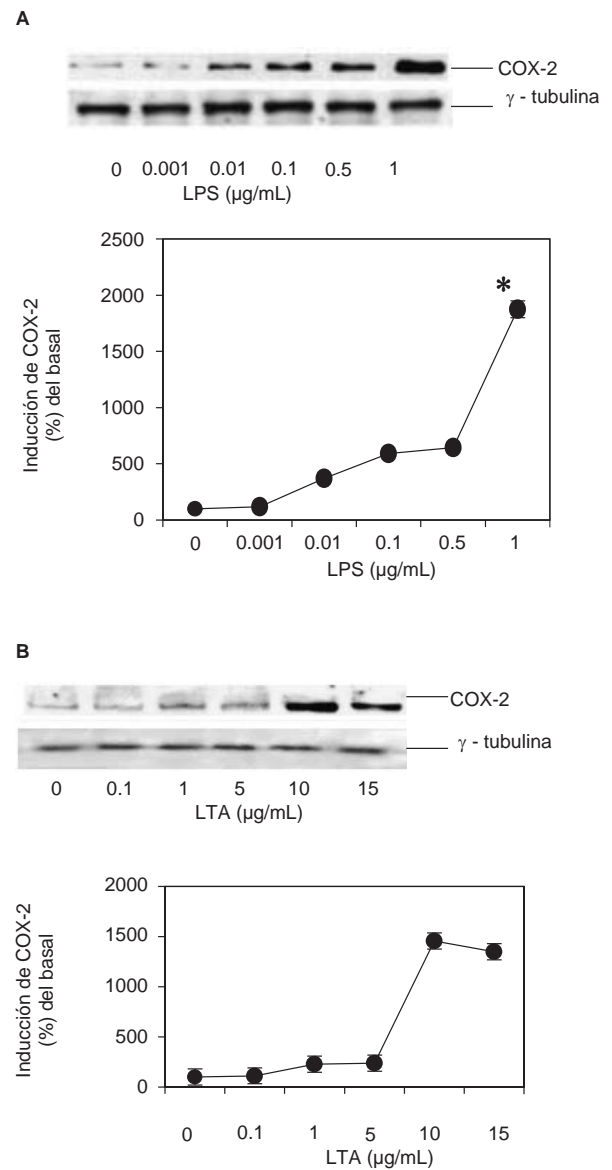
Con la finalidad de conocer si la inducción de COX-2 por LTA en células pulpareas humanas, está asociada a las vías de señalización donde están involucradas las proteínas MAPK (ERK, JNK y p38) y PKC, principales rutas activadas en la respuesta inflamatoria en macrófagos; utilizamos inhibidores específicos para cada una de ellas: SP600125 inhibidor de JNK, SB203580 inhibidor de p38, PD98059 inhibidor de ERK, estaurosporina inhibidor de PKC. Encontramos la inhibición de COX-2 principalmente asociada con ERK, p38 y PKC según se muestra en las *figuras 3A y B*. El control 0 se tomó como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software de Labworks.

### 4. Efecto de los inhibidores de MAPK y PKC en células pulpareas humanas tratadas con LPS.

Estudios previos han demostrado en macrófagos que la inducción de COX-2 por LPS es a través de las vías de señalización de las proteínas MAPK y PKC. Nosotros quisimos observar si ocurría lo mismo en células pulpareas humanas tratadas con LPS. Encontramos que la inhibición de COX-2 se presenta principalmente al inhibir a p38, ERK, y PKC (*Figuras 4A y B*).



**Figuras 1 A y B.** Efecto del LTA (A) y el LPS (B) sobre la inducción de COX-2 en células pulpares humanas y su análisis gráfico. Las células pulpares humanas fueron sembradas en cajas de 6 pozos con DMEM adicionado con 10% de SBF hasta alcanzar la semiconfluencia. Se ayunaron durante 24 h con DMEM adicionado con 2% de SBF para después ser tratadas con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LTA (A) y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS (B) a diferentes tiempos desde 30 minutos hasta 6 horas según se indica en el pie de cada figura. Para detectar la expresión de COX-2 se tomaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína y se realizó el ensayo de Western Blot con los anticuerpos específicos anti-COX-2 y anti- $\gamma$ -tubulina para el control, como segundo anticuerpo se utilizó anti-goat todos a una concentración 1:1000. El análisis gráfico fue en base a su densidad óptica obtenida con el software de Labwork y se obtuvo dividiendo COX-2 entre el control  $\gamma$ -tubulina. Los experimentos se realizaron por 3 ocasiones por separado, se analizó la media  $\pm$  E.S \* $p < 0.05$ .

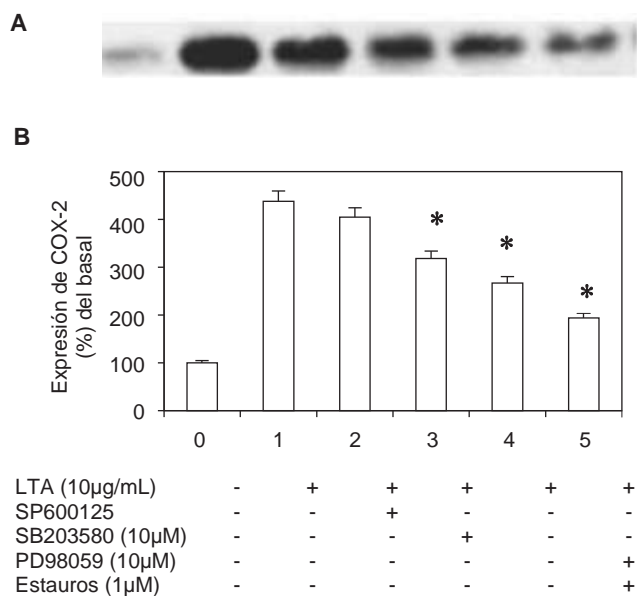


**Figura 2.** El LPS (A) y LTA (B) inducen la expresión de COX-2 a diferentes dosis en células pulpares humanas. Para conocer las dosis máximas de inducción de COX-2 en células pulpares humanas por LPS (A) y LTA (B) se realizaron experimentos tipo dosis-respuesta con las células pulpares humanas en cajas de 6 pozos previo ayuno de 24 horas con DMEM adicionado con 2% de SBF, las distintas dosis se muestran en cada pie. La incubación se realizó por 3 horas, al término de la incubación se tomaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína cuantificada por el método de Bradford; y se realizaron ensayos de Western Blot usando anticuerpos específicos anti-COX-2 y anti- $\gamma$ -tubulina como control, a una concentración 1:1,000. El análisis gráfico se obtuvo por medio del software Labwork en base a la densidad óptica teniendo como basal el control  $\gamma$ -tubulina. Los experimentos se realizaron por 3 ocasiones por separado, se analizó la media  $\pm$  E.S \* $p < 0.05$ .

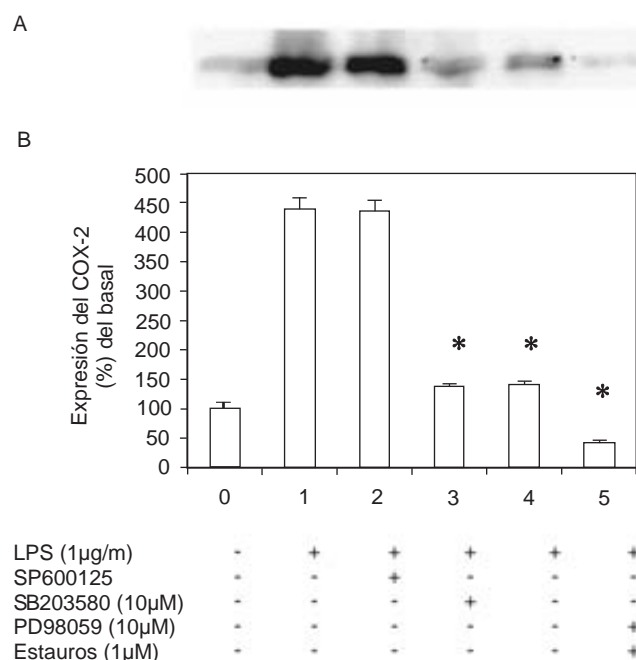
**DISCUSIÓN**

La caries dental es la principal vía de entrada de microorganismos a los conductos radiculares y está principalmente asociada a microorganismos Gram positivos que poseen el ácido lipoteicoico como principal agente patogénico.<sup>1,2,11</sup> Una vez que los microorganismos cariogénicos desmineralizan el esmalte o el cemento invaden los túbulos dentinarios, son reconocidos por las primeras células reconocedoras de antígenos: las células dendríticas, que se encuentran asociadas a la capa odontoblástica y se desencadena una respuesta inflamatoria en los tejidos pulpaes; que de no eliminarse el agente causal, evoluciona hasta llegar a la necrosis del tejido pulpar e iniciar las patologías periapicales.<sup>1,10,11,24</sup> Estudios previos han demostrado que el LTA al igual que el LPS son potentes inductores de ci-

tocinas inflamatorias y otros factores involucrados en la respuesta inflamatoria y en la destrucción tisular,<sup>5,10,16</sup> de hecho el LPS es reconocido como uno de los estímulos más potentes para inducir la formación de citocinas, mediadores químicos de la inflamación y metaloproteinasas en macrófagos, monocitos, células del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales humanos.<sup>5,16,17,21,27</sup> Sin embargo, en cuanto al LTA hay poca información, siendo el LTA el equivalente del LPS en bacterias Gram positivas y siendo éstas las primeras en colonizar la cavidad oral y establecerse en la placa dentobacteriana.<sup>17</sup> De este modo se le ha dado mayor énfasis al LPS, en el caso de las células pulpaes y odontoblastos. Estudios previos han demostrado la inducción de VEGF por LPS<sup>5,16</sup> a través de los receptores TLR4 y CD14. Sin embargo, Telles (2003) encontró



**Figura 3.** Efecto del LTA y los inhibidores específicos de las MAPK (ERK, p38 y JNK) y PKC sobre COX-2 en células pulpaes humanas tratadas con LTA (A). Análisis gráfico (B). Las células una vez dejadas en ayuno por 24 h con DMEM adicionado con 2% de SBF en cajas de 6 pozos, se preincubaron los diferentes inhibidores durante 30 minutos, SP600125 (10 µM), SB203580 (10 µM), PD98059 (10 µM), estaurosporina (1 µM); al término de la incubación se incubó el LTA de *S. sanguis* (5 µg/mL) durante 3 horas, los resultados se obtuvieron mediante el ensayo de Western Blot utilizando 50 µg de proteína. Los anticuerpos utilizados fueron anti-COX-2 y anti-goat (1:1,000). Los experimentos se realizaron por 3 ocasiones por separado, se analizó la media ± E.S \*p < 0.05.



**Figura 4.** Para observar el efecto de los inhibidores de las MAPK y PKC sobre las células pulpaes humanas tratadas con LPS, se preincubaron las células pulpaes humanas con los diferentes inhibidores para las MAPK y PKC, durante 30 minutos. SP600125, SB203580, PD98059, y estaurosporina; al término de la incubación se incubó el LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL) durante 3 horas, los resultados se obtuvieron mediante el ensayo de Western Blot (A) usando 50 µg de proteína previamente cuantificada por el método de Bradford, para el análisis gráfico (B) se tomó el control 0 como el 100% del basal en base a la densidad óptica de la banda obtenida por el software de Labworks. Los experimentos se realizaron por 3 ocasiones por separado, se analizó la media ± E.S \*p < 0.05.

que el LTA también es capaz de inducir VEGF en células pulpares de ratón,<sup>7</sup> a través de su receptor TLR2. Durand (2006) muestra la expresión de quimiocinas funcionales y reducción de la formación de dentina en odontoblastos humanos *in Vitro*.<sup>22</sup>

Sabemos que la inflamación de la pulpa dental es similar a la de otros tejidos conectivos, mediada por factores celulares y moleculares.<sup>1,10,11</sup> Una de las principales moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria son las prostaglandinas, como PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ,<sup>10,11,14,15,18</sup> asociadas ampliamente al dolor pulpar, y a la destrucción tisular por regulación de citocinas y enzimas como las metaloproteinasas.<sup>18</sup> Las enzimas encargadas de la biosíntesis de las prostaglandinas son COX, se han identificado tres isoformas: COX-1, COX-2 y COX-3. COX-1 que es de tipo constitutivo, expresada por varios tejidos, COX-2 y COX-3 son de tipo inducible y especialmente por citocinas inflamatorias IL-1, TNF- $\alpha$ , LPS, óxido nítrico.<sup>14,15,19</sup> Recientemente Wu (2006) encontró su inducción por LTA en células neuronales en ratas;<sup>23</sup> sin embargo aún no se ha observado su efecto por LTA en células pulpares humanas. Nosotros en este estudio quisimos caracterizar la enzima COX-2 en células pulpares humanas tratadas con LTA y LPS, para esto obtuvimos un cultivo celular con células pulpares humanas en donde realizamos experimentos de tipo curso-temporal y dosis-respuesta para caracterizar la inducción de COX-2 a través de ensayos de Western Blot con anticuerpos específicos anti-COX-2 y anti- $\gamma$ -tubulina como control. Nuestros resultados mostraron que COX-2 se induce desde los 30 minutos de tratamiento con LTA y LPS, y alcanza su máxima inducción a las 6 horas; sin embargo encontramos una inducción más intensa con LPS, esto es similar a lo encontrado en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS.<sup>27</sup> En cuanto al LTA encontramos que en células pulpares humanas a las 6 horas de tratamiento no hay una saturación de la enzima, como la encontrada en células neuronales de rata.<sup>23</sup> En el caso de los experimentos realizados a diferentes dosis encontramos una inducción con LTA desde 0.1  $\mu$ g/mL similar a la encontrada en células neuronales de rata, alcanzando su dosis máxima con 10  $\mu$ g/mL y comienza a declinar con 15  $\mu$ g/mL probablemente debido a muerte celular por toxicidad. Estudios anteriores muestran la participación de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) en la señalización de citocinas inflamatorias en células pulpares humanas, fibroblastos gingivales humanos, en células neuronales y en macrófagos.<sup>6,9,17,23,27</sup> Nosotros quisimos ver si las MAPK (ERK, p38 y JNK) así como PKC participaban en la vía de señalización de COX-2 en células pul-

pares humanas, nuestros resultados mostraron que Erk, p38 y PKC están involucradas ya que los inhibidores específicos para éstas mostraron la inhibición de COX-2 en las células al ser tratadas con LTA y LPS, resultados similares se encontraron en células neuronales de ratón. Esto nos permitirá continuar los estudios para encontrar fármacos inhibidores que bloqueen estas rutas y disminuyan la enzima COX-2 y otros eventos inflamatorios.<sup>24,26</sup> Por otro lado los últimos estudios sobre los efectos de ambas moléculas sobre las vías de señalización muestran una regulación de LPS sobre el LTA y viceversa por saturación de receptores en especial de IRAK (receptor asociado a IL-1),<sup>13,20</sup> esto aún no se ha estudiado en células pulpares humanas, por lo cual aún hay muchas preguntas sin respuesta en el proceso inflamatorio a nivel molecular en las células pulpares humanas.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos evidenciamos la participación de COX-2 en el proceso inflamatorio pulpar desencadenado por LPS y por LTA. Por otro lado al encontrar la participación de ERK, p38 y PKC entre las vías de señalización de COX-2 en células pulpares humanas tratadas con LPS y LTA, consideramos interesante establecer a futuro el factor de transcripción involucrado.

## REFERENCIAS

1. Cohen S, Burns R. *Vías de la pulpa*. Editorial Elsevier Science. Octava edición. Madrid España. 2002: 405-595.
2. Weine F. *Tratamiento endodóntico*. Quinta edición. Madrid España. Editorial Harcourt. 2000: 79-134.
3. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(2): 171-183.
4. Gutiérrez G, Kawasaki P. *Los lipopolisacáridos: Estructura, receptores y transducción de señales*. Symposium de Transducción de Señales. Universidad Nacional Autónoma de México. Julio 2002: 31-38.
5. Yang L, Tsai C. Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with black-pigmented *Bacteroides*. *Int Endod Journal* 2004; 37: 588-592.
6. Gruber R, Kandler B. Dental pulp fibroblasts contain target cells for lysophosphatidic acid. *J Dent Res* 2004; 83: 491-495.
7. Telles P, Hanks C. Lipoteichoic acid Up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res* 2003; 82: 466-470.
8. Tokuda M, Nagaoka S. Substance P enhances expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory factors in dental pulp cells. *J Endod* 2004; 30(11): 770-774.
9. Gruber R, Jindra C. Proliferation of dental pulp fibroblasts in response to thrombin involves mitogen-activated protein kinase signalling. *Int Endod Journal* 2004; 37: 145-150.
10. Inoki R, Kudo T, Olgart L. Dynamic aspects of dental pulp. *Molecular biology, pharmacology and pathophysiology*. Champma and Hall. 1<sup>st</sup> edition. 1990: 51-69, 385-403.

11. Hargreaves KM, Goodis HE. Seltzer and Bender's Dental Pulp. *Quintessence Books*. 2002: 227-281.
12. Slots J, Taubman M. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Mosby Year Book. 1992: 3-24, 533-560.
13. Sugawara S, Arakaki R et al. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and monocytes in a CD14-Dependent Manner. *Infection and Immunity* 1999: 1623-1632.
14. Lin S, Yeng-Ping-Kuo M et al. Differential regulation of interleukin-6 and inducible cyclooxygenase gene expression by cytokines through prostaglandin-dependent and independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 2002; 28(3): 197-201.
15. Chao Y, Shun-Fa Y et al. Proinflammatory cytokines induce cyclooxygenase 2 mRNA and protein expression in human pulp cell cultures. *J Endod* 2003; 29(3): 201-204.
16. Botero T, Shelburne Ch et al. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *J Endod* 2006; 32(10): 951-955.
17. Su S, Hua K et al. LTA and LPS mediated activation of protein kinases in the regulation of inflammatory cytokines expression in macrophages. *Clinica Chimica Acta* 2006; 374: 106-115.
18. Lin S, Wang Ch. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1 $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod* 2001; 27(3): 185-189.
19. Kawashima N, Kawanishi H. Effect of NOS inhibitor on cytokine and COX-2 expression in rat pulpitis. *J Dent Res* 2005; 84(89): 762-767.
20. Jacinto R, Hartung T. Lipopolysaccharide-and Lipoteichoic Acid-induced tolerance and Cross-tolerance: Distinct alterations in IL-1 Receptor-associated kinase. *J Immunol* 2002; 168: 6136-6141.
21. Chang Y, Lai Ch et al. Stimulation of matrix metalloproteinases by Black-pigmented *Bacteroides* in human pulp and periodontal ligament cell cultures. *J Endod* 2002; 28(2): 90-93.
22. Durand S, Flacher V et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in *in vitro* differentiated human odontoblasts. *J Immunol* 2006; 176: 2880-2887.
23. Wu H, Hsieh W et al. Lipoteichoic acid induces prostaglandin E<sub>2</sub> release and cyclooxygenase-2 synthesis in rat cortical neuronal cells: Involvement of PKC $\epsilon$  and ERK activation. *Life Sciences* 2006; 79: 272-280.
24. Murray P, Smyth T et al. Analysis of pulpar reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Bio Med* 2002; 13(6): 509-520.
25. Chávez PL, Svensater G et al. Streptococci from root canal in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 232-241.
26. Mitsiadis T. Molecular aspects of tooth pathogenesis and repair *in vivo* and *in vitro* models. *Adv Dent Res* 2001; 15: 59-62.
27. Gutierrez G, Maldonado S. Role of p38 in nitric oxide and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE<sub>2</sub> synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sciences* 2005; 77: 60-73.
28. Willoughby D, Moore A. COX-1, COX-2 and COX3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet* 2000; 335: 646-648.

Dirección para correspondencia:  
**Ana Guadalupe Ontiveros Granados**  
3ª Cerrada de Portoalegre Núm. 24  
Col. El Retoño  
Deleg. Iztapalapa 09440  
México, D.F.  
anislu@yahoo.com.mx  
0445541777174