

Efecto del lipopolisacárido bacteriano en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos

Effect of bacterial lipopolysaccharide in primary cultures of human gingival fibroblasts

Maria C. VERUTTI¹, Octavio A. GONZÁLEZ², John M. GONZÁLEZ³, Gloria C. MORENO⁴

1. Estudiante Facultad de Odontología de la Universidad Antonio Nariño, Popayán. 2. Odontóloga M.Sc. Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 3. Médico Ph.D. Grupo de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes, Bogotá D.C. 4. Odontóloga M.Sc. Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C

RESUMEN

Introducción: diferentes factores intervienen en la patogénesis de las enfermedades periodontales. Uno de ellos es la interacción entre los fibroblastos gingivales y los productos derivados de los microorganismos que se pueden encontrar en el ambiente periodontal, interacción que genera una participación activa de los fibroblastos en eventos inflamatorios y remodelación tisular, que conllevan, finalmente, a la reparación o la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes.

Objetivo: en este trabajo se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos para caracterizar la respuesta in vitro frente al lipopolisacárido bacteriano.

Metodología: Se evaluó la viabilidad celular y la respuesta de proliferación por medio de conteo celular, además la expresión de CD14 mediante citometría de flujo.

Resultados: A las 24 horas de iniciado el cultivo se encontró un aumento en el número de células cultivadas en presencia del lipopolisacárido 1.0 µg/mL, sin embargo, las diferencias no presentaron valores estadísticamente significativos. Los fibroblastos gingivales humanos mostraron una disminución en la expresión de CD14 en células cultivadas de forma reciente,

sin embargo, a las 24 horas de cultivo en presencia de LPS, se restauró esta expresión de CD14.

Conclusiones: estos resultados sugieren que la expresión de CD14 en fibroblastos gingivales humanos podría ser autorregulada por la presencia del LPS bacteriano. El cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos permite establecer un modelo in vitro para evaluar diferentes procesos en el desarrollo de las enfermedades periodontales.

Palabras claves: fibroblastos gingivales, lipopolisacárido, enfermedad periodontal

SUMMARY

Introduction: different factors participate in the pathogenesis of periodontal diseases. One factor is the interaction between the fibroblasts and derived products from the microorganisms found in the periodontal environment.

Objective: In this work, cultures of human gingival fibroblasts from a healthy donor were used to characterize the in vitro responses to bacterial lipopolysaccharide. Methods: the proliferative response was evaluated using cell count and expression of CD14 was assessed by flow cytometry.

Results: after 24 hours of culture an increase in the cell number was detected in cultures treated with 1.0 µg/mL LPS, but these differences were not statistically significant. Human gingival fibroblasts express CD14, but its expression decreases in cells cultivated after a short period

of time. Nevertheless, lipopolysaccharide helps to recover the expression of CD14 in fibroblast after 24 hours of culture.

Conclusion: preliminary result suggests that expression of CD14 on gingival fibroblasts could be modulated by this bacterial derived toxin. The primary culture of human gingival fibroblasts allows the establishment of an in vitro model to evaluate different processes in development of the periodontal diseases.

Key words: gingival fibroblasts, lipopolysaccharide, periodontal disease

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales, dentro de las cuales se encuentran la periodontitis y la gingivitis, se consideran como la segunda causa de consulta odontológica después de la caries dental. Dentro de los diferentes factores, entre otros, que predisponen o afectan el curso de las enfermedades periodontales se encuentran factores genéticos y ambientales (1). La presencia de bacterias patógenas orales es considerada como un evento clave en el desarrollo de la enfermedad periodontal y dentro de estos patógenos se involucra principalmente *Porphyromona gingivalis* y otras especies bacterianas como: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* y *Treponemas* orales, entre otros (2,3). Estos patógenos orales exhiben diferentes mecanismos de virulencia algunos de ellos asociados con

Recibido para publicación: Septiembre 28 de 2006.
Aceptado para publicación: Noviembre 13 de 2006.
Correspondencia:
J.M. González,
Universidad de los Andes.
Facultad de Salud.
(e-mail: johgonza@uniandes.edu.co)

la colonización de la mucosa oral y otros a evadir o modular la respuesta inmune del hospedero, la cual potencialmente conduce al desarrollo de una respuesta inflamatoria que consecuentemente lleva a la destrucción del tejido (4-8).

La integridad de las membranas mucosas del tejido periodontal es la primera barrera de defensa contra los microorganismos; función en la que también participan la descamación de las células epiteliales, el fluido gingivo-crevicular y la saliva. En estos elementos, no solo se encuentran componentes celulares y humorales del sistema inmune como polimorfonucleares, macrófagos, anticuerpos linfocitos B y T, también, péptidos antimicrobianos y enzimas líticas (5).

La presencia de una alteración de la mucosa gingival permite el contacto de los microorganismos orales con el tejido subepitelial y las células allí localizadas. Este fenómeno descrito conlleva a la participación de nuevos elementos fisiopatológicos no solo la respuesta inmune, también, por parte de los mecanismos de reparación y regeneración tisular. El fibroblasto gingival participa de una forma activa en los eventos antes mencionados secretando proteínas de la matriz extracelular (MEC), enzimas, citocinas e interactuando con el micro-ambiente oral, la MEC y las células inmunes (6-8). No solamente la flora bacteriana oral, también, algunos de los productos de estas bacterias han sido implicados como factores fundamentales en desarrollo y progresión de la enfermedad periodontal (2). El lipopolisacárido (LPS) de la pared de *P. gingivalis* es considerado como uno de los factores de virulencia en el periodonto y es uno de los modelos más usados para los estudios de la biología, la inmunología y aspectos moleculares en cultivos de fibroblastos gingivales humanos y con células que participan en la respuesta inmune oral (6-10). La estimulación de fibroblastos gingivales con LPS bacteriano conlleva en general un aumento de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-18 y TNF- α (6-9) y producción de colagenasas que degradan la

MEC, entre otras enzimas proteolíticas (10,11). Igualmente, el LPS de otras bacterias Gram negativas enteropatógenas, incluyendo *E. coli*, han mostrado efectos muy similares en los modelos *in vitro* (9, 11). El LPS de patógenos de la cavidad oral y de *E. coli* inducen la producción de activadores tisular del plasminógeno, factor proteolítico durante procesos de inflamación (11). Durante la última década, se ha estudiado el receptor del LPS de *P. gingivales* en fibroblastos gingivales humanos. Dos moléculas expresadas en la superficie celular pueden reconocer el LPS: la molécula CD14 (13-15) y el receptor tipo Toll 4 o TLR-4, cuya expresión ha sido detectada en fibroblastos gingivales humanos (16-17). Sin embargo, de forma reciente se ha descrito que el LPS de *P. gingivales* podría estimular los fibroblastos utilizando TLR-2 (12).

En este trabajo se evaluó el efecto del LPS bacteriano derivado de *E. coli* a diferentes concentraciones y diferentes tiempos sobre la proliferación celular y la expresión de CD14 en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos provenientes de un individuo sin enfermedad periodontal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujeto de estudio

Para este estudio se trabajó con tejido proveniente de un solo individuo (hombre de 30 años) para evitar la variabilidad observada con cultivos primarios de diferentes individuos (18) Se seleccionó un individuo adulto no fumador, no consumidor de medicamentos, sin signos clínicos de inflamación (sangrado al sondaje) y sin síntomas de enfermedad oral o sistémica. El donante acudió a la consulta dental de la Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, para cirugía gingival con fines estéticos. El tejido gingival fue utilizado previo firma del consentimiento informado y todos los procedimientos se realizaron bajo las normas éticas para estudios en humanos de la Universidad Javeriana. La descripción de las características del cultivo fue realizada previamente (19).

Obtención de los Fibroblastos gingivales

Para la toma de la biopsia, 24 h antes se le solicitó al individuo realizar enjuagues bucales con 0.2% clorhexidina. Previa anestesia se realizó la biopsia del tejido, el cual fue transportado en medio MEM (Gibco BRL, Grand Island, NYC) con antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 μ g/mL, Sigma, S. Louis, MO). El tejido, procesado en esterilidad, fue cortado en pequeños trozos de 2 a 3 mm los cuales se depositaron en un frasco de cultivo de 25 cc, aproximadamente 6 explantes por frasco. El explante se dejó adherir en seco por 20 minutos y luego se le adicionó medio de cultivo, MEM con 10% suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL), penicilina, estreptomycinina (Sigma) y 0.5% ciprofloxacina (Bayer AG-Alemania), este medio se denominó medio completo. Los frascos de cultivo fueron incubados a 37°C y 5% de CO₂.

Mantenimiento y pase de cultivos celulares

Una vez formada la monocapa de fibroblastos gingivales, estos fueron removidos mediante el uso de 0.25% tripsina y 1 mM de EDTA. A cada frasco se le adicionaron 2 mL de solución y se incubaron 5 minutos a 37°C, una vez las células fueron desprendidas, se le adicionaron 5 mL de medio MEM con 1% de SFB (medio de lavado). Las células fueron lavadas y posteriormente centrifugadas a 2000 rpm por 5 min a 4°C. El botón celular fue resuspendido en medio completo y las células fueron utilizadas para un nuevo pase del cultivo. Para la detección de marcadores por citometría las células fueron removidas utilizando EDTA 25 mM.

Ensayo de cultivo celular con lipopolisacárido bacteriano

Los fibroblastos gingivales humanos obtenidos después del 4° pase fueron cultivados en placas de 24 pozos a una densidad de 1x10⁵ células/pozo en 2 mL de medio de cultivo completo. Las células fueron mantenidas en incubadora a 37°C y 5% de CO₂ y cultivadas por 24 o 48 h. Las pruebas fueron

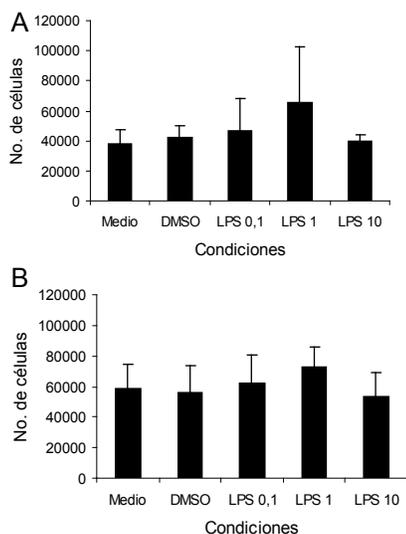


Figura 1. Proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos expuestos al lipopolisacárido. Las barras indican el promedio de cuatro conteos (2 experimentos) con sus respectivas desviaciones estándar a las 24 horas A) y 48 horas B), posterior al cultivo en las diferentes condiciones.

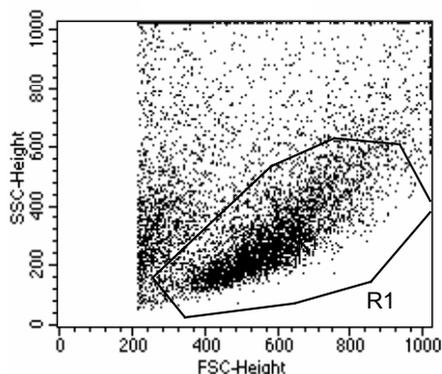


Figura 2. Análisis de tamaño y complejidad interna en fibroblastos gingivales humanos. Grafica de puntos por citometría de flujo donde se observa la ubicación de las células en el eje de las Y la complejidad interna (SSC) y en el eje de las X el tamaño (FSC). La región 1 (R1) fue seleccionada para posteriores análisis de la expresión de CD14.

realizadas en duplicados con las siguientes condiciones: células con medio completo, células en medio completo mas diluyente (ver adelante), y células cultivadas con medio completo y LPS (Sigma) 0.1, 1.0 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El LPS proveniente de *Escherichia coli* (Sigma) fue diluido en DMSO (Sigma) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Las concentraciones finales de DMSO en las diferentes condiciones fueron 1%, 0.1% y 0.01%. Se utilizó como control del diluyente en el cultivo celular MEM completo y 1% DMSO.

El conteo celular se realizó en cámara de Neubauer mezclando 1:1 las células con el colorante vital. La lectura fue realizada por dos evaluadores de forma ciega e independiente previamente calibrados (coeficiente de correlación kappa = 1).

Determinación de marcadores por citometría de flujo

Se utilizaron 1×10^5 células para cada marcaje, a cada muestra se le adicionó 3 μL de anticuerpo anti- CD14 marcado con ficoeritrina "PE" (BD, San Jose, CA). Las muestras se dejaron incubar 30 min, en oscuridad a 4 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se lavó con PBS 1x pH 7.2 mas azida de sodio al 0.1% centrifugando a 2000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue descartado y el botón celular fue resuspendido en 300 μL de solución de fijación que contiene PBS 1x pH 7.2 y paraformaldehído al 0.5%. Las células fueron adquiridas en un FACScalibur (BD) utilizando el programa "Cell Quest". Se obtuvieron las graficas de tamaño (FSC) versus complejidad interna (SSC) y se definió la región de estudio (R1) que contiene en su mayoría a las células viables. Posteriormente, se analizó la expresión del marcador CD14 PE en histogramas que muestran la detección de fluorescencia en FL-2H. Se analizaron 10,000 células por experimento. En todos los experimentos se utilizó un anticuerpo control (control de isotipo marcado con PE) para evaluar la unión no específica del anticuerpo.

Análisis de los datos

Para el conteo celular se utilizaron medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar). Para determinar la distribución normal de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y se aplicó estadística no paramétrica. Para comparar las diferentes condiciones dentro de un grupo de datos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y para comparar por parejas se aplicó la prueba de Wilcoxon. Se consideró una

$P < 0.05$ como el valor con significancia estadística.

RESULTADOS

Efecto del LPS en la proliferación de fibroblastos gingivales humanos

Las células fueron cultivadas en presencia de medio completo, medio con DMSO y medio más LPS durante 24 y 48 horas. En ambos tiempo evaluados se observa que las células en medio con DMSO presentan un conteo similar al medio solo, lo cual significa que el diluyente del LPS no afecta las condiciones de cultivo. (Figura 1)

A las 24 horas de cultivo con la concentración intermedia de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se observa un aumento en la media del conteo de las células (Figura 1A). Cuando se realiza el análisis estadístico de los datos a las 24 horas mediante la prueba de Shapiro-Wilk, se observa que los datos no presentan distribución normal por lo que se aplica estadística no paramétrica. Al comparar las diferentes condiciones del cultivo la prueba de Kruskal-Wallis mostró que no existe ninguna diferencia estadística significativa con una $P = 0.8957$.

Comparado con las 24 horas se observa un aumento de células a las 48 horas del cultivo lo que descarta que alguna de las condiciones este inhibiendo la proliferación celular (Figura 1B). Al comparar con las diferentes concentraciones de LPS en cultivo no se observan mayores diferencias, aunque se observa igualmente a las 48 horas un mayor número de células con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La evaluación estadística por no muestra diferencias significativas $P = 0.3319$ por Kruskal- Wallis. Ninguna de las comparaciones por pares mostró diferencias significativas ($P > 0.05$). A pesar de no observar diferencias estadísticas significativas, los resultados sugieren un efecto de LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las primeras 24 horas. En general los resultados sugieren igualmente que el LPS no induce muerte celular en los cultivos de fibroblastos gingivales humanos en un periodo de 48 horas.

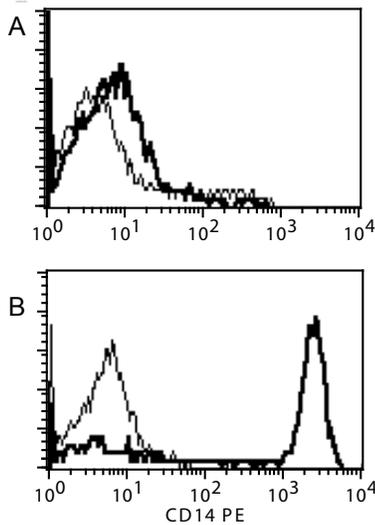


Figura 3. Expresión constitutiva del receptor CD14. Histogramas obtenidos por análisis de citometría de flujo mostrando la expresión de CD14 en fibroblastos gingivales humanos A) y monocitos humanos de sangre periférica B), ambas poblaciones sin ningún tipo de estímulo. La línea delgada muestra el control de isotipo PE y la línea gruesa la coloración con el anticuerpo anti-CD14 PE.

Determinación de la expresión de CD14 por citometría de flujo

Los fibroblastos gingivales humanos presentan un tamaño y complejidad intermedia, determinado por la medición del la dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC) mediante citometría de flujo, respectivamente. Esta población en la región 1 (R1) que representa la población de células viables fue utilizada para posteriores análisis (Figura 2).

En la figura 3, se compara la expresión de la molécula CD14 en monocitos humanos de sangre periférica con fibroblastos utilizando el mismo anticuerpo anti-CD14PE.

El procedimiento fue realizado en paralelo con ambos tipos de células. Los fibroblastos gingivales presentan una expresión baja pero positiva de CD14 al compararse con el control de isotipo (Figura 3A). Los monocitos humanos muestran una alta expresión del marcador como se nota por el desplazamiento de la línea correspondiente a la tinción con CD14 comparada con el

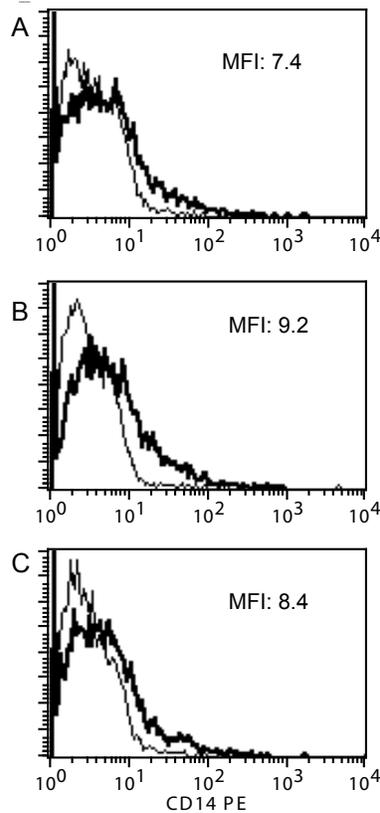


Figura 4. Expresión de CD14 en fibroblastos gingivales humanos expuestos al lipopolisacárido. Se muestran los histogramas obtenidos por citometría de flujo correspondientes a: células con el diluyente DMSO A), y células incubadas a concentraciones de LPS de: 1 µg/mL B) y 10 µg/ml durante 24 horas C). La línea delgada muestra el control de isotipo PE y la línea gruesa la coloración con el anticuerpo anti-CD14 PE. Los valores de la media de intensidad de la fluorescencia (MFI) para CD14 son mostrados en cada condición.

control de isotipo (Figura 3B). De forma sorprendente a las 24 horas de cultivo se observa una marcada disminución de la expresión de CD14 en fibroblastos gingivales humanos (Figura 4A), comparada con la expresión de la misma molécula mostrada en células control. (Figura 3A)

La diferencia radica en el tipo de cultivo utilizado para realizar la marcación de las células. Mientras que la expresión de CD14 en la figura 3A fue realizada con células cultivadas por 7 días, en la figura

4A las células fueron usadas posterior a 24 horas de cultivo. Lo que indica que los fibroblastos gingivales humanos cultivados de forma reciente regulan negativamente la expresión de este marcador. Sin embargo en presencia de ambas concentraciones de LPS (1 y 10 µg/mL) la expresión de CD14 es restaurada (Figura 4B y 4C). La expresión de CD14, medido por intensidad de fluorescencia, es más alta a la concentración de 1 µg/mL. Este resultado concuerda en parte con el relativo aumento de células en el cultivo a las 24 horas usando la misma concentración de LPS.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el efecto del lipopolisacárido, uno de los principales factores de virulencia de las bacterias Gram negativas, sobre fibroblastos gingivales humanos que se encuentran involucrados en la patogénesis de las enfermedades periodontales (2,3). Los fibroblastos gingivales no solamente participan en la organización y la remodelación del tejido conectivo mediante la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, sino también en la producción de enzimas que degradan la misma (10,11). Este fenómeno es normalmente regulado por algunas citocinas como la IL-1, IL-6 e IL-8 provenientes de otras fuentes celulares o producidas de forma autocrina por los fibroblastos (6-8), lo cual hace de esta población celular un componente asociado al sistema inmune a nivel periodontal. Estas citocinas producidas por los fibroblastos gingivales humanos pueden ser inducidas por productos bacterianos como el LPS de algunos periodontopatógenos, especialmente por la *P. gingivalis* (8,12,15,20).

El LPS bacteriano se encuentra en la pared bacteriana y su composición química varía entre los diferentes patógenos Gram negativos. Sin embargo, esta compleja molécula tiene un núcleo compuesto de polisacáridos y lípido A. El LPS de *P. gingivalis* como otras endotoxinas es capaz de inducir fiebre, estimulación policlonal de linfocitos B, activación de macrófagos y neutrofilos (5, 9, 13). En este estudio se utilizó LPS de *E.*

coli en lugar de LPS derivado de *P. gingivalis* debido a la disponibilidad comercial del primero y que ambos tienen algunas propiedades similares. A pesar de algunas diferencias en su composición química y probablemente en su estructura estas dos moléculas tienen la capacidad de unirse a los receptores CD14 y TLR4 (9,11,16).

La presencia de CD14 en los fibroblastos gingivales humanos ha sido demostrada por medio de técnicas moleculares, inmunohistoquímica y citometría de flujo (14,16,19), siendo la expresión en fibroblastos gingivales humanos más baja que en monocitos humanos. Interesantemente, los fibroblastos gingivales expresan los receptores TLR2 y TLR4 (12,16,17), sugiriendo que el LPS de *P. gingivalis* utiliza esta vía para activar dichas células.

En este trabajo se observó un aumento de la expresión de CD14 en la superficie de los fibroblastos gingivales humanos a las 24 horas, cuando las células fueron incubadas con LPS a concentraciones de 1 y 10 µg/mL, siendo mayor la expresión con la primera concentración. Este resultado es consistente con otros estudios *in vitro*, donde humanos expuestos a LPS por vía aérea, aumentan la expresión de CD14 en la superficie de los monocitos en sangre periférica (21). Este resultado implica que la exposición de fibroblastos gingivales a antígenos bacterianos como el LPS, podría inducir un aumento en el número de los receptores celulares de membrana CD14, lo cual implicaría una mayor predisposición celular a la captación de LPS con la consecuente síntesis de citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-8 y TNF-α, directamente asociadas con la activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs), colagenasas y destrucción tisular (7,8,10,11).

El cultivo de fibroblastos gingivales humanos en presencia de LPS no parece tener un efecto notable en la muerte celular y la proliferación especialmente a las 48 horas. Sin embargo el incremento de células a las 24 horas de cultivo, en presencia de LPS a 1 µg/mL, parece mostrar un efecto

temprano aunque no se evidenciaron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico.

Los resultados de este trabajo, sugieren que el LPS de *E. coli* afecta los fibroblastos gingivales humanos más a nivel de la regulación de la expresión de marcadores de superficie como el CD14 que sobre el número de células *in vitro*. Estudios posteriores con estas células y LPS deben ser realizados utilizando el compuesto purificado de *P. gingivalis* y técnicas que permitan estudiar su actividad en la regulación de la secreción de factores solubles como citocinas y su efecto en el ciclo celular.

REFERENCIAS

1. Oh TJ, Eber R, Wang HL. Periodontal diseases in the child and adolescent. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(5):400-10.
2. Socranksy SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87.
3. Listgarten MA, Slots J, Nowotny AH, Oler J, Rosenberg J, Gregor B, et al. Incidence of periodontitis recurrence in treated patients with and without cultivable *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromonas gingivalis*: a prospective study. *J Periodontol.* 1991;62(6):377-86.
4. Mallison SM 3rd, Smith JP, Schenkein HA, Tew JG. Accumulation of plasma cells in inflamed sites: effects of antigen, nonspecific microbial activators, and chronic inflammation. *Infect Immun.* 1991;59(11):4019-25.
5. Kinane DF, Lappin DF. Immune processes in periodontal disease: a review. *Ann Periodontol.* 2002; 7(1):62-71.
6. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol.* 2003;74(1):103-10.
7. Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, et al. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1β. *J Periodont Res.* 1995; 30(6):382-389

8. Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis* induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15(3):172-80.
9. Roberts FA, Richardson GJ, Michalek SM. Effects of *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides on mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 1997; 65(8): 3248-54
10. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival fluid and immunolocalization in gingival tissue. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(3):224-32
11. Xiao Y, Bunn CL, Bartold PM. Effect of lipopolysaccharide from periodontal pathogens on the production of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 2 by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2001;36(1):25-31.
12. Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, et al. 2007. IL-8 and IDO Expression by Human Gingival Fibroblasts via TLRs. *J Immunol.* 2007, 178:1151-7.
13. Shapira L, Takashiba S, Amar S, Van Dyke TE. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation of human monocytes: dependence on serum and CD14 receptor. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9(2):112-7.
14. Hiraoka T, Izumi Y, Sueda T. Immunochemical detection of CD14 on human gingival fibroblasts *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13 (4): 246-52
15. Watanabe A, Takeshita A, Kitano S, Hanazawa S. CD14-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infect Immun.* 1996; 64(11):4488-94.
16. Tabeta K, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umemoto T, et al. Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts.

- Infect Immun. 2000; 68(6):3731-5.
17. Wang PL, Oido-Mori M, Fujii T, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, et al. Heterogeneous expression of Toll-like receptor 4 and downregulation of Toll-like receptor 4 expression on human gingival fibroblasts by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 288:863-7.
 18. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. J Periodontal Res. 1997 ;32 (1):159-65.
 19. González OA, Pereira R, Osorio G, González JM. Obtención y caracterización de un cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos. Revista de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile; 2002; 20:32-41
 20. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with Bacteroides lipopolysaccharides. Infect Immun. 1991; 59(1):295-301.
 21. Fishwick D, Raza SN, Beckett P, Swan JR, Pickering CA, Fletcher AM, et al . Monocyte CD14 response following endotoxin exposure in cotton spinners and office workers. Am J Ind Med. 2002 42(5):437-42.