



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la
Salud

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica.

T E S I S

Que para optar por el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

SURISADEY ALBARRÁN VERGARA

Tutora: **DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS**
Facultad de Medicina

Proyecto financiado por fondos del Departamento de Microbiología y Parasitología
de la Facultad de Medicina UNAM.
Acuerdo AA9(CO/SA/SO141/12)

México, D. F. octubre 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la M.C. Lilia Robert Guerrero, por su colaboración, esfuerzo y apoyo brindado en el procesamiento de muestras para este proyecto. Por la gran amistad y cariño dedicados.

Al Esp. Arturo Flores Espinosa, Mtro. Carlos Alberto Monteagudo y Esp. Carlos Hernández Hernández por brindarme todas las facilidades y permitirme entrar a las clínicas de periodoncia donde se realizó la toma de muestras, sin su apoyo no hubiera sido posible.

A Beatriz Ruíz García por ser mi amiga y mi compañera de laboratorio, por tus enseñanzas, transmisión de conocimientos y por darme tu apoyo incondicional a lo largo del proyecto, por hacer más ligeros los días difíciles, por tus acertados comentarios e ideas.

A Yamili y José por su ayuda y preocupación, porque sin ustedes seguramente el trabajo hubiera sido pesado y cansado.

A la Dra. Ana María Fernández Presas por darme la oportunidad de trabajar a su lado, transmitirme su entusiasmo y amor por la investigación, su cariño, consejos, sus oraciones y por ser parte de mi formación.

A todos ustedes por estar ahí y apoyarme siempre.

Infinitas Gracias.

RESUMEN.	1
SUMMARY.	2
INTRODUCCIÓN.	3
I. ANTECEDENTES.	5
1. Enfermedad periodontal.	5
1.1. Periodontitis Crónica.	9
2. Ecología bucal.	10
3. Características generales de los protozoos.	11
3.1. <i>Trichomonas tenax</i>.	12
3.1.1. Taxonomía.	13
3.1.2. Ciclo biológico.	13
3.1.3. Antecedentes de <i>Trichomonas tenax</i>.	14
3.1.4. Características generales de <i>Trichomonas tenax</i>.	15
4. Métodos para estudiar la ultraestructura celular.	16
4.1. Microscopía Electrónica.	16
4.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	17
4.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).	17
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.	18
III. OBJETIVO GENERAL.	18
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	18
V. HIPÓTESIS.	19
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.	19

1. Diseño experimental.	19
2. Población de Estudio.	19
3. Criterios de selección.	19
3.1 Criterios de Inclusión.	20
3.2 Criterios de Exclusión.	20
4. Obtención de muestras.	20
4.1 Toma de muestra.	20
4.2 Procesamiento de muestras.	21
5. Cultivo de <i>Trichomonas tenax</i>.	21
6. Microscopía electrónica.	22
VII. RESULTADOS.	23
VIII. DISCUSIÓN.	37
IX. CONCLUSION.	39
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	40
XI. ANEXOS.	47
A. REACTIVOS.	48
B. MEDIOS DE CULTIVO.	50
C. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.	53
D. CURVA DE CRECIMIENTO.	55

RESUMEN.

Antecedentes. La enfermedad periodontal es de etiología multifactorial, en la que participan diferentes especies bacterianas. La mayoría de los estudios de la microflora oral están orientados a la búsqueda de bacterias, sin embargo, existen escasos reportes en la literatura de la posible participación que protozoarios como *Trichomonas tenax* en la fisiopatogenia de la enfermedad. Se ha descrito en el ciclo de vida de *Trichomonas tenax* una forma redondeada que podría ser importante para comprender diferentes mecanismos de transmisión.

Objetivo. Describir la ultraestructura de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica.

Materiales y Métodos. Se tomaron muestras de sujetos sistémicamente sanos, hombres y mujeres en edades comprendidas entre 30 y 70 años de edad con diagnóstico de periodontitis crónica. Las muestras obtenidas se depositaron en solución salina y medio de cultivo.

Resultados. Los resultados obtenidos muestran que *Trichomonas tenax* presenta una fase trofozoito que se caracteriza por presentar una forma ovoide, con una membrana celular festoneada bien conservada, se distinguen cuatro flagelos anteriores libres y un flagelo posterior o recurrente que acompaña a la membrana ondulante. Las observaciones del parásito al microscopio electrónico muestran una forma redondeada, parecida a forma quística sin embargo, esta forma redondeada presenta una membrana celular integra sin pared quística.

Conclusiones. *Trichomonas tenax* presenta en su ciclo de vida únicamente la forma de trofozoito, no se observó al microscopio electrónico una fase quística.

SUMMARY.

Background. The etiology of periodontal disease is multifactorial and they involve, among others, different bacterial species. Most studies of oral microflora aimed to identify bacteria, however, there are only few reports on the possible role of protozoa such as *Trichomonas tenax* in the pathogenesis of the disease. It has been described in *Trichomonas tenax* life cycle the presence of a morphological rounded stage that could be important to understand the different transmission mechanisms.

Objective. To describe *Trichomonas tenax* ultrastructure isolated from chronic periodontitis patients.

Materials and Methods. Samples were obtained from systemically healthy subjects of men and women aged between 30 and 70 years with chronic periodontitis diagnosis. Specimens were placed in culture media and in saline solution.

Results. The results showed that *Trichomonas tenax* has only a trophozoite stage that exhibits an ovoid shape and scalloped well-preserved cell membrane. We could observe four free anterior flagella and a subsequent or recurrent flagellum accompanying the undulating membrane. The electron microscope observations showed rounded cell shape similar to those described for cystic form. However, we could only observe the parasite plasma membrane but not a true cyst wall.

Conclusions: *Trichomonas tenax* exhibits only a trophozoite stage in its life cycle.

INTRODUCCIÓN.

La mayoría de los estudios de la microflora oral se encuentran orientados a la búsqueda de bacterias, sin embargo, existen escasos reportes en la literatura de la posible participación que protozoarios como *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax* podrían tener en el biofilm dental a pesar de la alta incidencia de estos parásitos en pacientes con enfermedad periodontal.

Trichomonas tenax ha recibido diferentes nombres desde que fue descrita por Otto Friedlich Müller en 1773 a partir de muestras obtenidas de cálculo dental y la denominó *Cercaria tenax*.

T. tenax es un protozoario comensal presente en cavidad oral, forma parte del biofilm dental subgingival y es posible aislarla en pacientes con pobre higiene oral y con enfermedad periodontal avanzada. Se ha postulado que la presencia de *T. tenax* en la cavidad oral humana es un importante indicador de una pobre higiene oral, ya que su incidencia es de tres a cuatro veces mayor en pacientes con enfermedad periodontal que en sujetos sanos.

Por otro lado, se ha demostrado que *Trichomonas tenax* presenta actividad proteolítica mediada por endopeptidasas de cisteína que hidrolizan diferentes tipos de moléculas de colágena (tipo I, III, IV y V) presentes en los tejidos periodontales lo que sugiere la participación activa de *Trichomonas tenax* en la progresión de la enfermedad periodontal.

Los estudios epidemiológicos orientados a determinar la frecuencia de *Trichomonas tenax* en cavidad oral son contradictorios, ya que reportan frecuencias muy altas del 90% en pacientes con enfermedad periodontal avanzada; del 43-48%; y del 28, 30 y 35% respectivamente en sujetos con enfermedad periodontal. Por otro lado, se ha reportado la presencia de *T. tenax* en sujetos sanos entre el 11% y 3%.

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

Trichomonas tenax es un protozoario flagelado, tienen forma ovalada o piriforme, mide de 6 a 12 μm por 3.5 a 7 μm ; posee un citoplasma granular, ocasionalmente se observan vacuolas alimenticias y presentan movimiento unidireccional. Se observa un axostilo que recorre el cuerpo para emerger en forma libre en la parte posterior. Presenta cinco flagelos, cuatro anteriores libres y el quinto localizado en el borde de la membrana ondulante, la cual es más corta que la longitud del cuerpo; presenta una costa que se ubica a lado de la membrana ondulante. El complejo cinético se localiza en el extremo anterior del parásito, de donde se originan los flagelos. Posee un núcleo ovoide, vesicular y un citostoma en el lado opuesto de la membrana ondulante, el núcleo se localiza en el extremo anterior y contiene gránulos de cromatina en una zona lateral.

I. ANTECEDENTES.

1. Enfermedad periodontal.

Se considera que la enfermedad periodontal es una de las enfermedades de origen bucal de mayor prevalencia a nivel mundial, y que afecta a un gran porcentaje de la población mexicana. En esta enfermedad se encuentran involucrados factores conductuales, culturales, sistémicos, genéticos y microbianos. Hay evidencia que implica a los microorganismos como los agentes etiológicos primarios de varias formas de la enfermedad periodontal. Se cree que la acumulación de placa bacteriana es un factor esencial para el desarrollo de la periodontitis sin embargo, se requiere de otros factores para el establecimiento de la enfermedad. Existen estudios que demuestran que la remoción de la placa dentobacteriana, mediante un riguroso control de la placa o por agentes antisépticos, previene o revierte la gingivitis clínica en voluntarios humanos^{1,2}.

Dentro de las enfermedades periodontales inducidas por placa dentobacteriana más frecuentes se consideran: gingivitis y periodontitis (Tabla 1)³. El estado de salud implica la ausencia de enfermedad, la gingivitis inducida por placa se considera la inflamación gingival sin pérdida de inserción de la encía (puede ser: leve, moderada o grave), con la progresión de la enfermedad se formarán bolsas periodontales y con ello la periodontitis. La periodontitis implica la pérdida de la inserción de manera que se clasifica como sigue: leve= 1-2mm, moderada=3-4mm y grave= >5mm, está se mide con una sonda periodontal y es la distancia entre la línea amelocementaria y el fondo del surco. También la periodontitis se clasifica según el grado de daño, de manera que se considera localizada si menos del 30% de los dientes han sido afectados y generalizada si va más allá del 30%.

Existe evidencia sólida de la participación de microorganismos como agentes etiológicos primarios responsables de la enfermedad periodontal²⁻⁴.

Tabla 1. Lista parcial de posibles diagnósticos para las enfermedades gingivales (clasificación de 1999) (10)	
Enfermedades gingivales inducidas por placa dental	
Gingivitis inducida por placa (sin otros factores locales contribuyentes)	(60)
Gingivitis inducida por placa con factores locales contribuyentes	(60)
Gingivitis ulcerativa necrotizante	(23, 80)
Gingivitis asociada a la pubertad	(60, 93)
Gingivitis asociada al ciclo menstrual	(60)
Gingivitis asociada al embarazo	(54, 60)
Granuloma piógeno asociado al embarazo	(60, 87)
Gingivitis asociada a diabetes mellitas	(34, 60)
Gingivitis asociada a leucemia	(60, 99)
Hiperplasia gingival inducida por fármacos	(60, 85)
Gingivitis asociada a los anticonceptivos orales (60)	
Gingivitis por déficit de ácido ascórbico	(19, 60)
Lesiones gingivales no inducidas por placa	
Lesiones asociadas a <i>Neisseria</i>	
<i>Gonorrhea</i>	(41, 83, 86)
Lesiones asociadas a <i>Treponema pallidum</i>	
	(41, 59, 82, 86)
Lesiones asociadas a estreptococos	(41, 53)
Lesiones asociadas a <i>Mycobacterium</i>	
<i>Tuberculosis</i>	(27, 83)
Angiomatosis bacilar	(57)
Gingivoestomatitis herpética primaria	(40, 83)
Herpes oral recurrente	(41, 83)
Infecciones por varicela-zoster	(41, 83)

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

Candidiasis gingival generalizada	(41, 83)
Eritema lineal gingival	(32)
Histoplasmosis	(28, 83)
Fibromatosis gingival hereditaria	(33, 42)
Manifestaciones gingivales de	
Liquen plano	(41, 46, 82)
Penfigoide de las mucosas	(24, 41, 82)
Pénfigo vulgar	(41, 66, 82)
Eritema multiforme	(14, 41, 58, 82)
Lupus eritematoso	(41, 82)
Dermatosis de IgA lineal	(20, 46, 82)
Granulomatosis de Wegener	(44, 46)
Psoriasis	(100)
Reacciones alérgicas de la encía a	
Materiales restauradores (mercurio, níquel, acrílico)	(41)
Pastas dentífricas	(25)
Colutorios	(41)
Aditivos de los chicles o goma de mascar	(49)
Alimentos y aditivos alimentarios	(41, 84)
Lesiones traumáticas de la encía	
Lesiones químicas	(4, 48, 67)
Lesiones físicas	(51, 74, 94)
Lesiones térmicas	(41)
Tomado de Armitage, Gary C. Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. Periodontology 2000. Vol. 9. 2005. 9 – 21.	

En la enfermedad periodontal participan más de una especie bacteriana, dichas especies forman parte de la flora comensal o endógena de la placa dentobacteriana. Los microorganismos interactúan formando un biofilm o biopelícula colonizando la encía que rodea al diente.

El biofilm es un microambiente que se genera constantemente con la formación de la película adquirida sobre la superficie dental, la encía, bolsas periodontales o

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

colonias bacterianas superficiales a las que se agregarán colonizadores tempranos como *Streptococcus oralis* y posteriormente colonizadores tardíos como *Porphyromonas gingivalis*.⁶⁻⁹

Esta colonización es selectiva, localizada y organizada, así que pueden distribuirse según los complejos microbianos de Socransky¹⁰ (fig. 1).

- Base: colonizadores primarios, gram positivos y anaerobios facultativos.
- Complejo naranja o puente: primeros anaerobios en su mayoría gram negativos.
- Complejo rojo: anaerobios gram negativos y espiroquetas, patógenos y oportunistas.

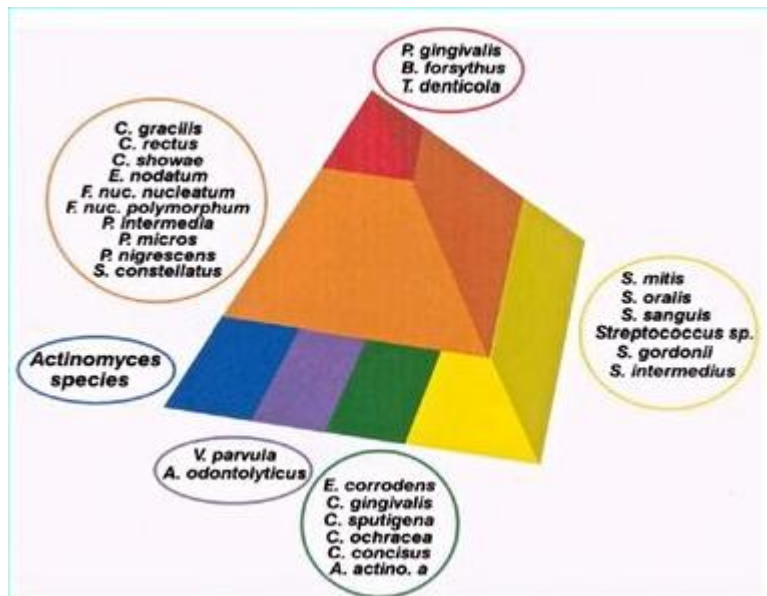


Fig. 1. Secuencia de colonización del biofilm de la placa supragingival por los complejos de Socransky

La presencia en cavidad oral de esta flora aunada a la producción de enzimas y toxinas inducen la liberación de mediadores químicos de la inflamación como las prostaglandinas y los derivados del ácido araquidónico, así como la síntesis de citocinas pro-inflamatorias que estimulan a las células endoteliales y fibroblastos a

producir metaloproteasas de la matriz extracelular, conduciendo a la destrucción del tejido conjuntivo y del hueso entre otros mecanismos propuestos, con la consiguiente pérdida del diente^{11,12,1,2,4,9,13-15}.

1.1. Periodontitis Crónica

En general, sabemos que la periodontitis con sus diferentes formas clínicas representa una de las enfermedades orales más frecuentes. Se estima que aproximadamente del 5 al 20% de la población se encuentra afectada por periodontitis generalizada severa¹⁶. Esta condición inflamatoria se asocia frecuentemente con infecciones bacterianas crónicas causadas por bacterias Gram negativas^{4,17,18}. Sin embargo, en los últimos años se ha considerado a la periodontitis como el resultado de una compleja interacción entre la flora microbiana y la respuesta del huésped, que se encuentra modificada por factores conductuales¹⁹. La periodontitis inducida por placa dentobacteriana consiste en la presencia de inflamación gingival con migración de la inserción epitelial, además de pérdida de tejido conjuntivo y hueso alveolar^{11,12,9,13,15-19}.

Se considera que la respuesta del huésped es clave en la expresión clínica de la periodontitis²⁰. Se han realizado intentos para establecer la evolución de la periodontitis basándose en el estudio del líquido gingival-crevicular (LGC), y en la presencia de mediadores inflamatorios como prostaglandina E2 (PGE2); citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina uno alfa (IL-1 α), e interleucina uno beta (IL-1 β), entre otras. Se ha encontrado que existe una asociación importante entre los marcadores inflamatorios y la presencia de periodontitis activa^{21,22}. Por otro lado, interleucina diez (IL-10) es una citocina con propiedades anti-inflamatorias, que regula tanto la respuesta inmune humoral como la celular, así como la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF. Estudios recientes muestran que la falta de IL-10 conduce a una mayor pérdida del hueso alveolar²³. En contraste, se ha reportado que en los sitios donde

hay mayor concentración de IL-10 el hueso alveolar se observa más sano que en aquellos donde hay menor concentración de ésta citocina²⁴.

2. Ecología bucal.

La cavidad bucal es considerada un ecosistema que provee un ambiente físico y químico propicio para la interacción de diferentes microorganismos. La microbiota oral comprende más de 600 especies endógenas y exógenas distribuidas en diferentes hábitats como son mucosa bucal, superficies dentales, película adquirida y placa dental, surco gingival, labios, lengua, paladar, saliva y materiales artificiales presentes⁶.

Existen factores intrínsecos y extrínsecos que favorecen o limitan el desarrollo microbiano como la temperatura, humedad, pH, presencia de leucocitos, higiene, alimentación e interacciones bacterianas.

Los principales microorganismos que constituyen la microbiota oral son: cocos grampositivos (estreptococos del grupo viridans como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius*), gram negativos (*Neisseria* y *Veillonella*), anaerobios estrictos como bacilos gram positivos (*Actinomyces*), anaerobios microaerófilos (*Lactobacillus*), bacilos gram negativos (*Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptorichia bucalis* y *Selenomonas*), estos últimos asociados frecuentemente a enfermedades periodontales y otros como treponemas, espiroquetas (*Treponema*), *Mycoplasma* y algunos hongos^{6,25,7,8}.

Las bacterias han sido clasificadas por Socransky²⁶ en complejos de acuerdo a la interacción microbiana y la patogenicidad (fig. 2).

- **Amarillo:** especies de *Streptococcus* orales, con capacidad para coagregar entre especies del mismo género.
- **Púrpura:** *Actinomyces odontolyticus* (Gram+) y *Veillonella parvula* (único Gram negativo y anaerobio entre los colonizadores primarios).

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

- **Azul:** todas las especies de Actinomyces excepto *A. viscosus*.
- **Verde:** bacilos gram negativos anaerobios facultativos (*Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*).
- **Naranja:** complejo puente, colonizadores secundarios. Todos anaerobios y mayormente gramnegativos (excepto *Streptococcus constellatus*, *Parvimonas micra* y *Eubacterium nodatum*, que son gram positivos). Inicia la etapa de remodelación de la placa supragingival.
- **Rojo:** anaerobios estrechamente asociados con periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*.

El complejo rojo es muy importante porque en él se encuentran las bacterias periodontopatógenas.

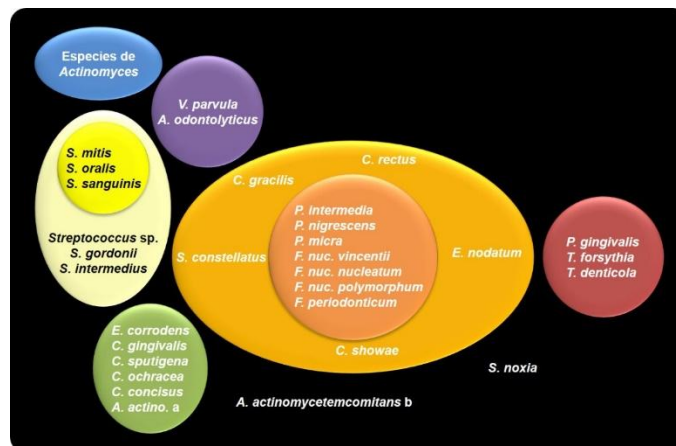


Fig. 2. Complejos bacterianos en la microbiota bucal

3. Características generales de los protozoos.

Los protozoos son organismos unicelulares eucariotas; pertenecen al reino protista, miden entre 3 y 100µm con uno o varios núcleos; aunque su morfología tamaño y número de organitos varía entre cada género y especie. Carecen de pared celular rígida, cuentan con elementos de locomoción, como seudópodos, flagelos, membranas ondulantes y cilios, que caracterizan a determinadas

especies. Su metabolismo es heterótrofo, pueden ingerir su nutrimento por medio de fagocitosis o pinocitosis. Se reproducen asexualmente por división simple o múltiple, sexuales y algunos alternan sus ciclos reproductivos^{24,27}.

La clasificación de los protozoos se basa en sus características morfológicas, fisiológicas y de reproducción, también se toma en cuenta su taxonomía y biología molecular. De acuerdo al interés médico se clasifican en:

- Amebas (Sarcodina), protozoos con movimiento ameboide, reproducción binaria.
- Flagelados (Mastigophora), con uno o más flagelos, división binaria (*Giardia*, *Trichomonas*, *Leshmania* y *Trypanosoma*).
- Apicomplexa (Apicomplexa), parásitos intracelulares de pequeño tamaño, alternan fases de reproducción sexual y asexual (*Cryptosporidium*, *Toxoplasma* y *Plasmodium*).
- Ciliados (Ciliophora) como *Balantium*.

Presentan dos fases en su ciclo vital, una activa que es el trofozoíto: que es la forma móvil, se mueve, alimenta y reproduce, además de que en esta fase ejerce su acción patógena, pero es incapaz de sobrevivir durante un tiempo prolongado fuera del hospedero. La fase de resistencia a las condiciones adversas es la de quiste, en la cual hay una actividad metabólica reducida, pero sobreviven al medio y son las formas infectantes^{24,27,28}.

3.1. *Trichomonas tenax*.

3.1.1. Taxonomía.

Phylum: *Protozoa*.

Subphylum: *Sarcomastigophora*.

Superclase: *Mastigophora*.

Clase: *Zoomastigophorea*.

Orden: *Trichomonadida*.

Familia: *Trichomonadidae*.

Género: *Trichomonas*.

Especie: *Trichomonas tenax*.

3.1.2. Ciclo biológico.

El mecanismo de infección de *Trichomonas tenax* es poco conocido, sin embargo siguiendo las características de otras especies se cree que su transmisión es por contacto directo, aunque también se ha mencionado que podría darse de forma indirecta por fómites (Fig. 3).

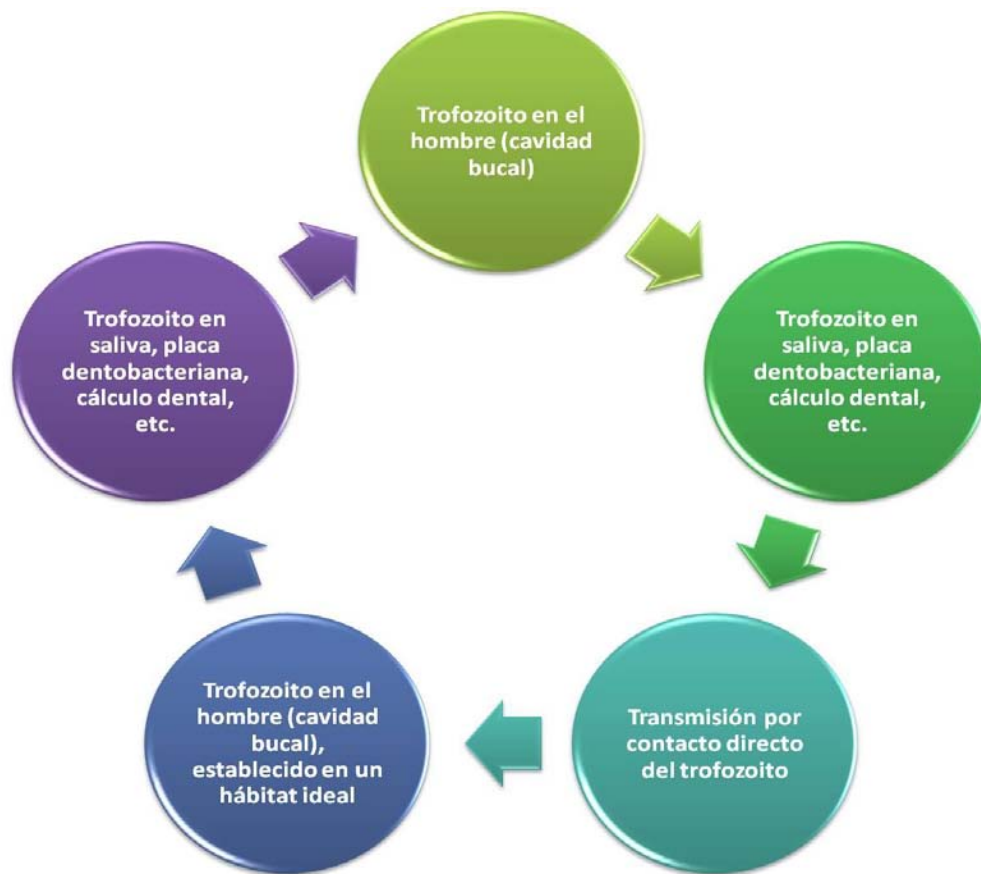


Fig. 3. Ciclo biológico de *Trichomonas tenax*

3.1.3. Antecedentes de *Trichomonas tenax*.

Trichomonas tenax ha recibido diferentes nombres desde que fue descrita por Otto Friedlich Müller en 1773 a partir de muestras obtenidas de cálculo dental y la denominó *Cercaria tenax*. Posteriormente, se utilizaron otros sinónimos para referirse a este parásito, como Wenyon que en 1926, la denominó *Trichomonas elongata* considerándola como el protozooario predominante en cavidad bucal. Mientras que diferentes autores apoyaron el nombre de *Trichomonas flagellata* para describir a este protozooario³⁰⁻³⁴. Goodey le modificó el nombre a *Trichomonas buccalis* y Ohira y Nogushi la denominaron *Tetratrichomonas hominis*.

Dobell en 1939 sustituyó el término utilizado por Ohira por *Trichomonas tenax*, considerando a *Trichomonas tenax* como el principal protozooario que se encuentra en cavidad oral y que es específicamente diferente a las encontrados en el intestino (*Trichomonas hominis*) y en el aparato genito-urinario (*Trichomonas vaginalis*) del ser humano (Fig. 4).

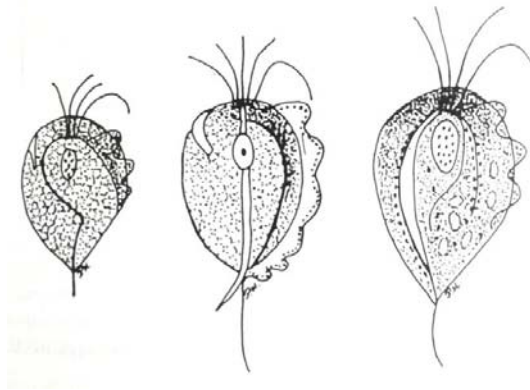


Fig. 4. Trofozoitos de *Trichomonas tenax*, *T. hominis* y *T. vaginalis* (Tomado de Tay J. Velasco, O, Lara R, Gutiérrez M. Parasitología médica. 7ª. Méndez editores. 2002)

3.1.4. Características generales de *Trichomonas tenax*.

Trichomonas tenax es un protozooario flagelado, tiene forma ovalada o piriforme, mide de 6 a 12 μm por 3.5 a 7 μm ; posee un citoplasma granular, ocasionalmente se observan vacuolas alimenticias y presentan movimiento unidireccional. Se observa un axostilo que recorre el cuerpo para emerger en forma libre en la parte posterior. Presenta cinco flagelos, cuatro anteriores libres y el quinto localizado en el borde de la membrana ondulante, la cual es más corta que la longitud del cuerpo; presenta una costa que se ubica a lado de la membrana ondulante. El complejo cinético se localiza en el extremo anterior del parásito, de donde se originan los flagelos. Posee un núcleo ovoide, vesicular y un citostoma en el lado opuesto de la membrana ondulante, el núcleo se localiza en el extremo anterior y contiene gránulos de cromatina en una zona lateral^{27,29}.

Trichomonas tenax es un protozooario comensal presente en cavidad oral³⁸, forma parte del biofilm dental subgingival y es posible aislarla en pacientes con pobre higiene oral y con enfermedad periodontal avanzada³⁹. Se ha postulado que la presencia de *Trichomonas tenax* en la cavidad oral humana es un importante indicador de una pobre higiene oral, ya que su incidencia es de tres a cuatro veces mayor en pacientes con enfermedad periodontal que en sujetos sanos⁴⁰⁻⁴².

Por otro lado, se ha demostrado que *Trichomonas tenax* presenta actividad proteolítica mediada por endopeptidasas de cisteína que hidrolizan diferentes tipos de moléculas de colágena (tipo I, III, IV y V) presentes en los tejidos periodontales^{43,44}. Se han encontrado fosfatasas ácidas en estructuras vesiculares de *Trichomonas tenax* localizadas en el Aparato de Golgi, en lisosomas primarios y secundarios, en granulos citoplásmicos y en el extremo libre de la membrana ondulante⁴⁵. Además, tiene la capacidad de lisar eritrocitos. Estos estudios sugieren la participación activa de *Trichomonas tenax* en la progresión de la enfermedad periodontal. Sin embargo, se requieren más estudios, para determinar la relación de *Trichomonas tenax* en la enfermedad periodontal⁴⁶.

Se ha reportado la presencia de una fase quística en el ciclo de vida de este protozoo en cavidad oral y en medio de cultivo⁴⁷. Se ha descrito por Benchimol la presencia de pseudoquistes de *Trichomonas tenax* refiriendo a esta fase morfológica como una transformación de los trichomonados en formas compactas, menos móviles, sin una pared quística verdadera, y que exhiben un flagelo interno. La descripción de una posible fase quística en el ciclo de vida de *Trichomonas tenax* es de suma importancia, ya que esta fase de resistencia del parásito podría contribuir a comprender la relación huésped-parásito, además de estudiar otros posibles mecanismos de transmisión.

Los estudios epidemiológicos orientados a determinar la frecuencia de *Trichomonas tenax* en cavidad oral son contradictorios, ya que reportan frecuencias muy altas del 90% en pacientes con enfermedad periodontal avanzada⁴⁹; del 43-48%^{47,50}; frecuencias de *Trichomonas tenax* del 28,30 y 35%^{51,52}, del 23.53%⁵² y del 9.6 %^{53,54} en pacientes con enfermedad periodontal. Por otro lado, se ha reportado la presencia de *Trichomonas tenax* en sujetos sanos entre el 11%^{55,56} y del 3%⁵⁷.

4. Métodos para estudiar la ultraestructura celular.

4.1. Microscopía Electrónica.

La microscopía electrónica es una técnica en la que se reemplaza la luz visible (de longitud de onda de 500nm), por un haz de electrones de longitud de onda del orden de 0,005nm. Logrando un incremento del aumento y del poder de resolución. Utiliza lentes electromagnéticos, creando campos electromagnéticos o electrostáticos que conducen el trayecto del haz de electrones. Para poder observar estas muestras se requiere de un procesado especial donde deben fijarse en glutaraldehído, los fragmentos deben ser pequeños y tienen que fijarse en forma de varios trocitos cúbicos de tejido de no más de 1 mm. Las muestras se incluyen en resinas sintéticas y se realizan cortes 10 veces más delgados que los de microscopía de luz, cortes ultrafinos. La tinción se realiza con sales de metales

pesados como citrato de plomo, tetraóxido de Osmio o acetato de uranilo, que permiten un contraste adecuado del tejido bajo el haz de electrones^{58,59}.

4.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) fue el primer ME desarrollado que utiliza un haz de electrones, fue introducido por Max Knoll y Ernest Ruska, 1931.

En esta técnica, un haz de electrones pasa a través de la muestra, lo cual proporciona la imagen. El microscopio electrónico de transmisión es capaz de generar un haz de electrones a alta tensión (80kV). La imagen formada se registra por una proyección sobre una pantalla fluorescente o una película fotográfica. Todo el sistema debe estar en una atmósfera de vacío. La formación de la imagen en el microscopio electrónico se debe principalmente a la dispersión de los electrones, la imagen se forma por la ausencia de estos electrones. Cuanto más elevado sea el número atómico del objeto, mayor dispersión obtenida^{58,59}.

4.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

En la microscopía SEM es formada mediante la focalización de una fina fuente de electrones sobre la superficie de la muestra. Los electrones barren la muestra en una serie de líneas y redes, construyéndose una imagen de la superficie. La imagen se forma a partir de los electrones secundarios. Los electrones secundarios son atraídos hacia el porta muestras (reflectante) mediante un potencial positivo (50 volts).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Se ha demostrado recientemente que existe una estrecha relación entre la presencia de este protozooario y la progresión de la enfermedad periodontal, sin embargo, el mecanismo exacto del daño tisular se desconoce^{60,54}. Por otro lado, se ha demostrado que también es posible aislarla en sujetos con pobre higiene oral pero no con enfermedad periodontal^{55,47,61}. Los datos epidemiológicos son muy variables, existen reportes de frecuencias en pacientes con periodontitis que van de un 11% hasta un 90%. Si *Trichomonas tenax* participa en el desarrollo y progresión de la enfermedad periodontal, y si ésta condición facilita cada vez más la proliferación de este protozooario, este círculo vicioso podría explicar entonces la alta incidencia de este microorganismo en el biofilm de pacientes con gingivitis y enfermedad periodontal.

Los mecanismos de transmisión descritos para adquirir trichomoniasis oral mediante la fase de trofozoito son; por contacto directo de una persona a otra por medio de besos, gotitas de saliva, fómites, y por compartir utensilios de comida, entre otros. La evidencia de otra forma morfológica dentro del ciclo de vida de *Trichomonas tenax* como el quiste podría aportar herramientas importantes para la descripción de otras posibles mecanismos de transmisión.

II I. OBJETIVO GENERAL

Describir la ultraestructura de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica.

. IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislar y cultivar *Trichomonas tenax* para realizar la descripción morfológica por microscopía electrónica de transmisión.

V. HIPÓTESIS

Si *Trichomonas tenax* presenta dentro de su ciclo de vida la forma de quiste entonces se podrá observar esta fase por microscopía electrónica.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental.

Se estudiaron muestras obtenidas de pacientes que acudieron a consulta a la Clínica de Periodoncia e Implantología de la División de Estudios de Posgrado y Odontología Preventiva de la Facultad de Odontología UNAM. Los sujetos fueron examinados en una sola visita en la que se realizó una evaluación del estado general y periodontal, se recolectó la muestra, de acuerdo a los procedimientos que se describen en el texto siguiente.

2. Población de Estudio

La población de estudio consistió en sujetos sistémicamente sanos, hombres o mujeres que oscilaron en edades entre 30 y 70 años, con diagnóstico de periodontitis crónica con base en la clasificación actualmente usada (International Workshop para la clasificación de condiciones y enfermedades periodontales, 1999). Se les informó a los pacientes los objetivos del trabajo, y se les entregó una copia de consentimiento aprobado por el Comité de ética de la Dependencia (0007-2013), los participantes leyeron el documento y acordaron firmar el consentimiento informado, estableciendo su deseo voluntario de participar.

3. Criterios de selección.

Todos los sujetos incluidos en este estudio presentaban por lo menos 6 dientes naturales y fueron diagnosticados con enfermedad periodontal. Se excluyeron del estudio aquellos que carecían de los dientes de Ramfjord y que presentaban alguna condición sistémica que pudiera influir sobre el curso o la enfermedad

periodontal como diabetes VIH/SIDA, hemofilia, enfermedades autoinmunes. Así mismo se excluyeron a las mujeres embarazadas o en lactancia.

3.1 Criterios de Inclusión.

Pacientes que aceptaron cooperar en este estudio, con diagnóstico de periodontitis crónica y sujetos periodontalmente sanos.

Pacientes entre 30 y 70 años de edad, de ambos sexos.

3.2 Criterios de Exclusión.

Se excluyeron de este estudio aquellos pacientes que refirieron estar bajo tratamiento farmacológico de antiparasitarios o antibióticos, quienes presentaron traumatismos como quemadura térmica o química y lesión mecánica reciente, aquellos con enfermedades sistémicas, mujeres embarazadas y pacientes no cooperadores.

Pacientes menores a 30 años y mayores de 70 años de edad.

4. Obtención de muestras.

4.1 Toma de muestra.

Cada participante recibió una evaluación periodontal completa realizada por especialistas. Se analizaron 6 dientes de Ramjord (16, 21, 24, 36, 41 y 44) y las mediciones clínicas se registraron en un total de 6 sitios a) mesiobucal, b) bucal, c) distobucal, d) distolingual, e) lingual y f) mesiolingual de cada paciente excluyendo los terceros molares.

Se registraron los siguientes parámetros clínicos: Acumulación de PDB (0/1, ausente o presente); Acumulación de cálculo dental (0/1, ausente/presente); Nivel de la inserción (mm); enrojecimiento gingival (0/1); Profundidad de la bolsa (mm); sangrado (0/1, ausente/presente); movilidad (I, II, III) y radiografías periapicales.

La profundidad de la bolsa y el nivel de inserción se tomaron 2 veces al mm más cercano utilizando una sonda periodontal “Carolina del Norte” (UNC) de 15 mm de longitud (Hu-Friedy). La muestra de placa y cálculo dental de los pacientes con periodontitis crónica se tomó con curetas Gracey ½, ¾, Goldman Fox 21; raspador de Morse, Jaquette 17/18.

Los especímenes de los sujetos con salud periodontal se tomaron con sondas periodontales y tipo WHO.

4.2 Procesamiento de muestras.

Las muestras obtenidas de ambos grupos experimentales se depositaron en tubos de microfuga con solución salina estéril (0.85%) y medios de cultivo para amibas y se incubaron a 35° y 37°C, este procedimiento se realizó para la identificación de *Trichomonas tenax*.

Una vez obtenidas las muestras se tomaron 150 µl que se depositaron en un portaobjetos y se observaron por microscopía de luz, permitiendo la identificación de *Trichomonas tenax* (fig. 8). El resto de la muestra se depositó en medio de cultivo huevo sangre donde se incubo a 37° por 3 días con observaciones cada 24 hrs.

5. Cultivo de *Trichomonas tenax*.

Una vez aislado, se cultivó al protozoario en diferentes medios de cultivo (RPMI-1640, Infusión cerebro corazón, caldo tioglicolato, medio de Robinson, huevo sangre) para evaluar durante 12 horas a temperatura de 37°C, establecidas estas condiciones, se realizaron curvas de crecimiento para determinar en cual medio de cultivo habia mayor crecimiento y supervivencia de los parásitos. Una vez seleccionado el medio, se realizaron subcultivos cada tercer día; hecho el subcultivo según lo establecido en las curvas de crecimiento se tomaron para realizar la microscopía electrónica.

6. Microscopía electrónica.

Para realizar la descripción ultraestructural de *Trichomonas tenax*, se obtuvieron 5 millones de parásitos del medio de cultivo seleccionado, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en fijador de Karnovsky (1,000 mosmol/kg)⁶² durante 2 horas a temperatura ambiente. Se siguió la técnica de rutina para microscopía y se incluyeron los parásitos en resina Spurr⁶³. Se realizaron cortes de 40 a 80nm en ultramicrotomo, se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se tomaron fotos en un microscopio electrónico JEOL 1200EX.

VII. RESULTADOS

En microscopía de luz se identificaron los trofozoitos de *Trichomonas tenax* (Fig. 5), son protozoarios ovoides que miden entre 10-20µm. Presentan cuatro flagelos anteriores libres y un quinto asociado a la superficie celular y que recorre el cuerpo del parásito hasta la región posterior formando parte de la membrana ondulante. El citoplasma es granular y en su interior se distingue un núcleo oval y su nucléolo.

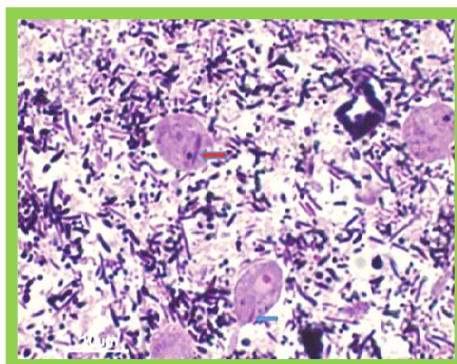


Fig. 5. Micrografía de microscopía de luz. Trofozoito piriforme de *T. tenax* (flechas) teñidos con azul de toluidina. 40x.

Una vez aislado el parásito, se tomó 1ml y se cultivó al protozoario en 5ml de diferentes medios de cultivo (RPMI-1640, Infusión cerebro corazón (BHI), caldo tioglicolato, medio de Robinson, huevo sangre) para evaluar durante 12 horas a temperatura de 37°C (Ver Anexo B). Establecidas estas condiciones, se realizaron curvas de crecimiento para determinar en cual medio de cultivo había mayor crecimiento y supervivencia de los parásitos, en ese cultivo se sembró *Trichomonas tenax* para posteriormente realizar la microscopía electrónica de transmisión.

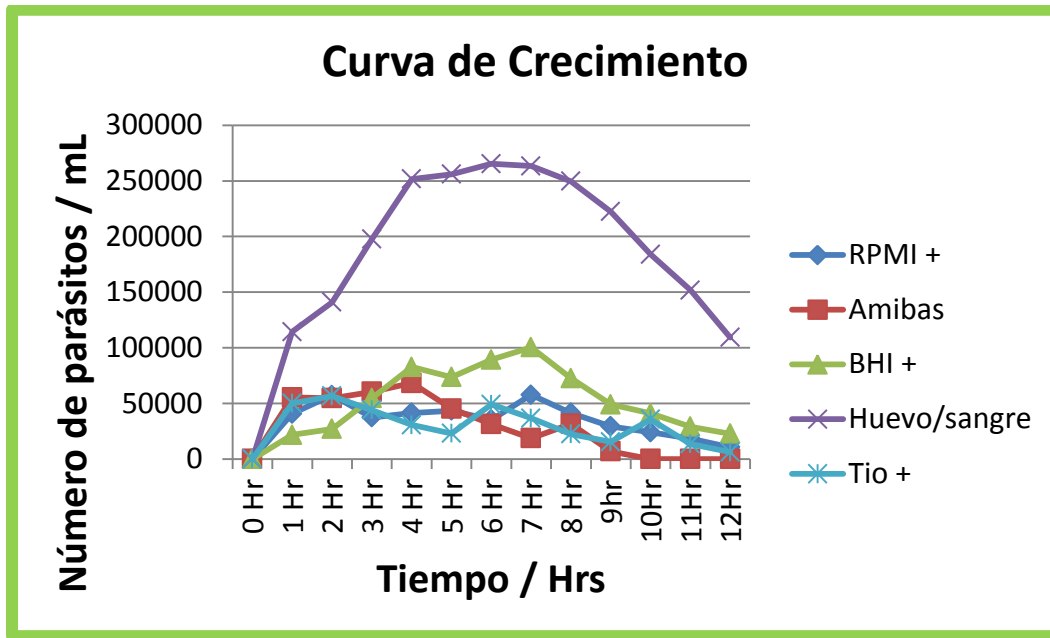
Se realizaron curvas de crecimiento por triplicado con los distintos medios de cultivo (RPMI-1640, Infusión cerebro corazón (BHI), caldo tioglicolato, medio de Robinson, huevo sangre), evaluando cada hora durante 12 horas a temperatura de 37°C (Ver Anexo D). Los resultados de las curvas de crecimiento mostraron que el

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

medio de cultivo en el que presentó mayor crecimiento y supervivencia de *Trichomonas tenax* fue el medio de huevo sangre, tomando esto en cuenta se seleccionó dicho medio para su cultivo hasta obtener la cantidad necesaria de protozoarios para procesarlos, elaborar los cortes y observar su ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) véase Tabla 2 y gráfica 1.

Tiempo	RPMI +	Amibas	BHI +	Huevo/sangre	Tio +
0 Hr	0	0	0	0	0
1 Hr	40666.6667	55333.3333	21666.6667	114333.333	50000
2 Hr	57333.3333	54666.6667	27000	141000	56666.6667
3 Hr	37333.3333	60333.3333	54666.6667	197666.667	44000
4 Hr	41333.3333	68333.3333	82666.6667	251666.667	30666.6667
5 Hr	43333.3333	45333.3333	73666.6667	256000	23000
6 Hr	35333.3333	31333.3333	89333.3333	265333.333	49000
7 Hr	57666.6667	18666.6667	100333.333	263333.333	36666.6667
8 Hr	41333.3333	31666.6667	72666.6667	249666.667	22333.3333
9hr	29333.3333	6833.33333	49000	222333.333	1533.33333
10Hr	24000	0	41000	184000	35666.6667
11Hr	18333.3333	0	29000	151666.667	13500
12Hr	10666.6667	0	22666.6667	109333.333	6100

Tabla 2. Base de datos que muestra el crecimiento exponencial y supervivencia de *Trichomonas tenax* en distintos medios.



Gráfica 1. Curva de crecimiento. Gráfica que muestra el crecimiento de *Trichomonas tenax* en diferentes medios de cultivo.

Para realizar la descripción morfológica de *Trichomonas tenax*, se cultivó hasta obtener un promedio de 5 millones de parásitos, se centrifugaron a 1 500 rpm durante 10 min, descartando el sobrenadante, se resuspendió el pellet para realizar histoquímica y cortes semifinos (Fig.6). Para realizar la microscopía electrónica de transmisión se resuspendió el pellet en fijador de Karnovsky (1,000 mosmol/kg)⁶² durante 2 horas a temperatura ambiente. Se siguió la técnica de rutina (ver Anexo C).

Se elaboraron cortes semifinos de las muestras y se tiñeron con azul de toluidina para observarse al microscopio óptico (fig. 6).

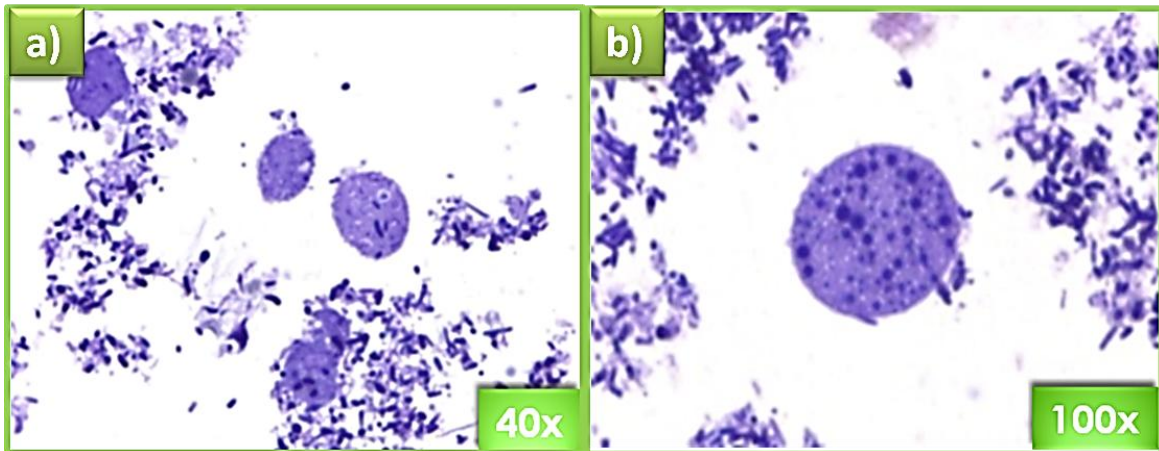


Fig. 6. Micrografía de *Trichomonas tenax* teñidos con azul de toluidina. a) Trofozoitos de *T. tenax* piriforme (40x). b) *T. tenax* con forma redonda (100x).

Ultraestructuralmente *Trichomonas tenax* presentó una forma ovoide y midió 13 μ m de longitud por 9 μ m de ancho aproximadamente, presenta una membrana celular festoneada íntegra y bien conservada (fig. 7).

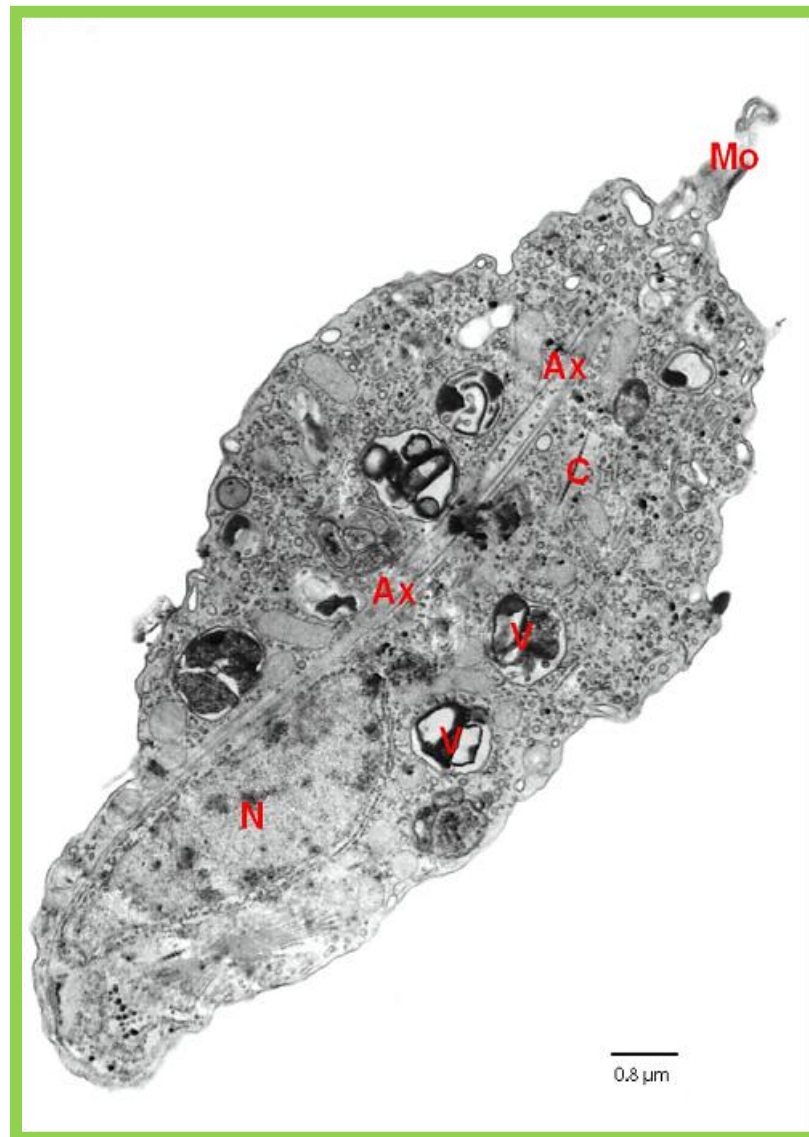


Fig. 7. Micrografía de MET. Corte longitudinal de *Trichomonas tenax*, se aprecian sus componentes estructurales, mostrando el núcleo en la región anterior. (N=núcleo, Ax=axostilo, C=costa, V=vacuolas fagocíticas).

Se distinguen cuatro flagelos anteriores libres y un flagelo posterior o recurrente que acompaña a la membrana ondulante. Los flagelos se originan en el complejo cineostomal formado por igual número de blefaroplastos o cuerpos basales (fig. 8).

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

El cineostoma o cuerpo basal está formado por un centriolo del cual emerge un axonema, se encuentra presente en los protozoarios que poseen 1 o más flagelos; es un cilindro corto con diámetro constante en toda la longitud del flagelo, parte desde la base del organelo y consta de 9 tripletes de microtúbulos en arreglo circular, cada microtúbululo se cierra en la porción terminal al tocar la pared y forma una estructura electrodensa en MET que recibe el nombre de placa terminal. El cinetosoma es indispensable para la formación y función del flagelo.

Los flagelos anteriores tienen la misma longitud promedio (7 - 15 μ m) y pueden separarse en dos grupos. Los flagelos están formados por microtúbululos conformando un axonema central, rodeado por membrana celular; el axonema central lo conforman 9 pares de microtúbululos exteriores que rodean a un par central (9 + 1) compuestos por tubulina, dineína y otras proteínas (Fig. 9). La porción terminal del flagelo terminal forma un "loop", que es característico de esta especie. La función principal es dar locomoción y proveer alimentación.

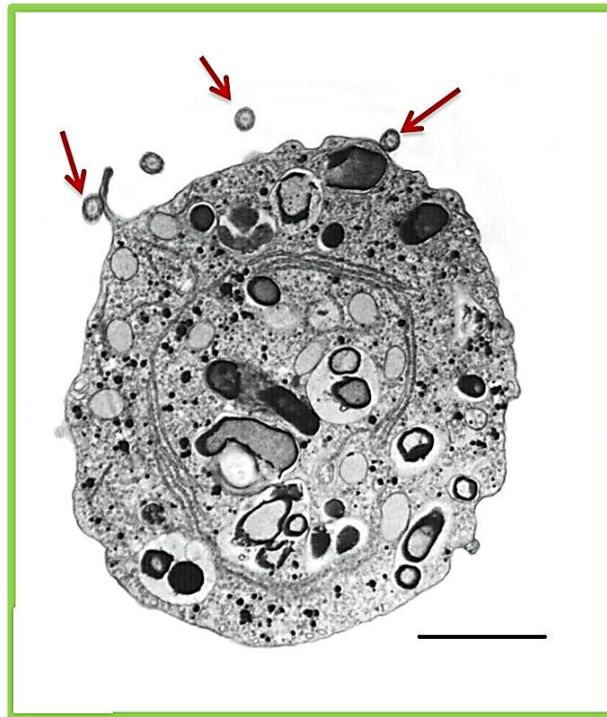


Fig. 8. Micrografía de MET. *T. tenax* se observan sus Flagelos (flechas). barra = 1.5 μ m



Fig. 9. Micrografía de *T. tenax* a mayor aumento, se observa la estructura característica del flagelo (círculo) barra = 1 μm

La membrana ondulante presenta no más de tres ondulaciones, se forma por la distensión del flagelo recurrente y junto con este recorre el cuerpo del parásito hasta la región posterior y termina en una extremidad libre (flagelo posterior). Tiene su origen en el complejo cineostomal donde se origina el flagelo recurrente, brinda locomoción a *Trichomonas tenax* (figuras 8 y 9).

La membrana celular está formada primordialmente por mucopolisacáridos y su conformación es trilaminar tiene 100nm de grosor. Actúa limitando la región intracitoplasmática del parásito del exterior.

Su citoplasma se divide en dos porciones ectoplasma y endoplasma. El ectoplasma favorece la movilidad, ingestión de alimentos, excreción, respiración y protección. El endoplasma se encarga de la nutrición, reserva de alimentos y reproducción del protozooario. El núcleo se encuentra localizado en la región

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

central y anterior es de forma ovoide, mide 3.5 μ m, sin embargo, se han observado muchas más formas e incluso la denominada “herradura de caballo” debido a la plasticidad de la membrana celular (descrita como en doble cisterna); presenta poros nucleares. Puede tener uno o varios nucléolos y gránulos de cromatina distribuidos y adosados en su mayoría a la membrana celular (fig. 10).

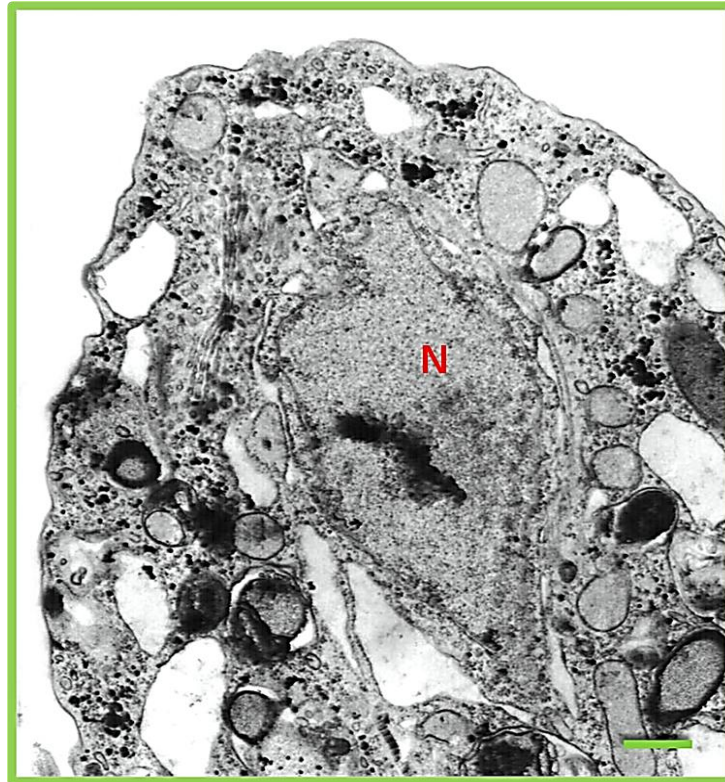


Fig. 10. Micrografía de MET. *Trichomonas tenax* donde se aprecian las características del núcleo y sus componentes. N=núcleo. barra = 1 μ m

El Axostilo es un organelo tubular, móvil que presentan algunos protozoarios flagelados; se extiende desde el cineostoma a la región terminal posterior, en ocasiones sobresale. Se encuentra asociado a hidrogenosomas participando en el metabolismo celular. Se encuentra formado por una hilera de microtúbulos y se divide en tres regiones: capitulum, tronco y extremo (fig. 11).

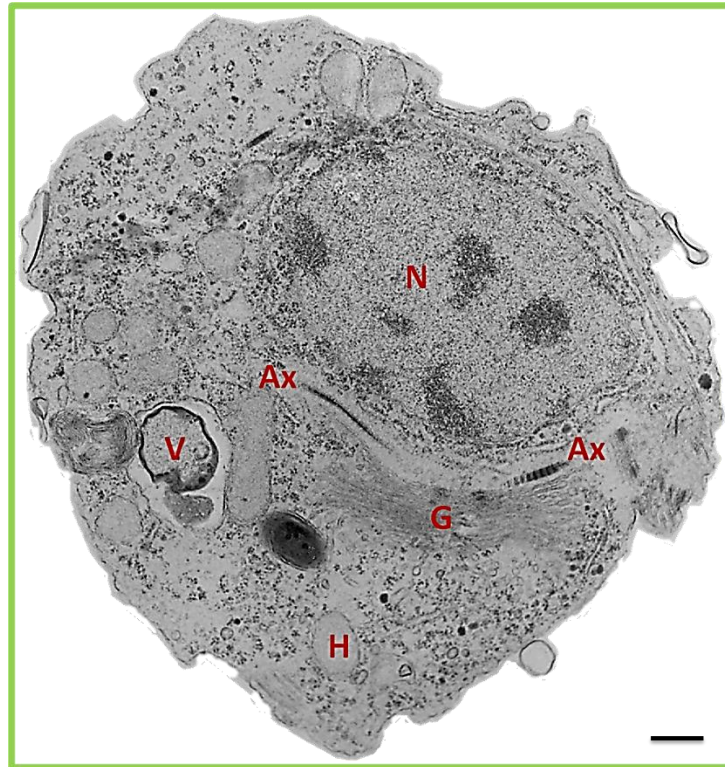


Fig. 11. Micrografía de MET. Corte transversal de *Trichomonas tenax*, se aprecian sus componentes estructurales, evidenciando el axostilo adyacente al núcleo redondeado (N=núcleo, Ax=axostilo, G=aparato de Golgi, H=hidrogenosomas, V=vacuolas fagocíticas).

La Pelta es un organelo de locomoción que presentan algunos flagelados, consiste en una depresión en forma de collar en el extremo anterior del axostilo del que emergen los flagelos; una lámina de microtúbulos. Su función es soportar al canal periflagelar (fig. 12).

La Costa se presenta en protozoarios flagelados, es un filamento longitudinal con estriaciones transversas con una periodicidad de ~42nm. Deriva del latín costa = costilla. Se origina del cinetosoma, dispuesta a lo largo de la superficie celular por debajo del falgelo recurrente y la membrana ondulante; su función es de apoyo estructural a la membrana celular (fig. 12).

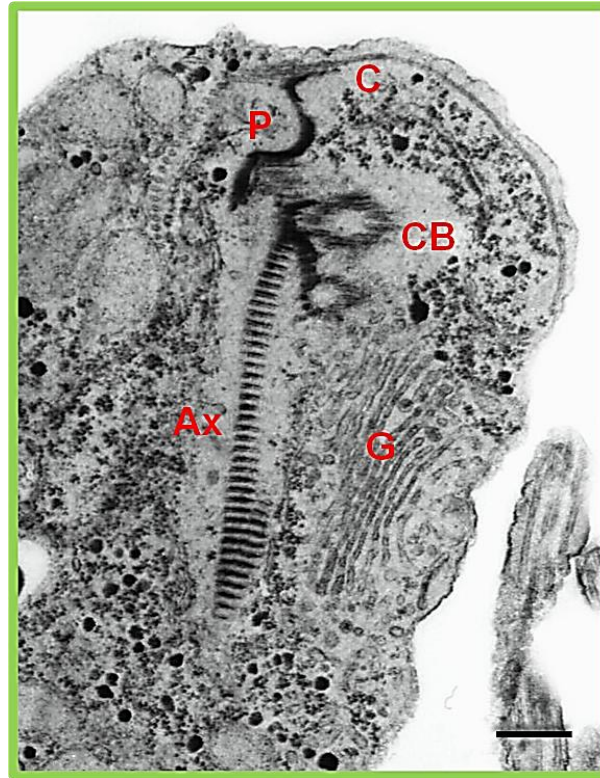


Fig. 12. Micrografía de *Trichomonas tenax* donde se exhiben sus componentes estructurales. C= costa, P= pelta, CB= cuerpos basales, Ax= axostilo y G= aparato de Golgi. Barra = 1 μ m

En la región anterior del parásito cercano al núcleo se encuentra el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso, dispersos en el citoplasma se observan ribosomas (compuestos por ARN de cadena sencilla y proteínas; que el protozooario necesitará para cubrir sus necesidades metabólicas). Las vacuolas fagocíticas (fagosomas) en su interior se pueden encontrar numerosas bacterias y eritrocitos en distintas fases de lisis; regulan la presión osmótica y expulsan productos de desecho (fig. 13). Los lisosomas contienen y transportan enzimas, los fagolisosomas son producto de la asociación con fagosomas que contienen materiales de desecho, así como cuerpos de inclusión (depósitos de almidón) y gránulos de glucógeno. Los hidrogenosomas o microsomas son compartimentos rodeados por una membrana, miden 0.5 – 3 μ m, se presenta en protozoarios

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

anaeróbios tricomonados o ciliados; se encargan del metabolismo de carbohidratos cuyo producto final es hidrógeno molecular (H_2). Estos organelos son remanencias de las mitocondrias, carecen de ADN (los códigos genéticos para proteínas hidrogenosómicas son nucleares). La función principal es la regulación intracelular de Ca^{2+} . *Trichomonas tenax* presenta una hilera de hidrogenosomas a lo largo de la Costa denominados gránulos paracostales, además de paraxostilares; permiten una mayor concentración de enzimas glicolíticas intermediarias y cofactores para realizar el catabolismo de carbohidratos (fig.14).



Fig. 13. Micrografía de *Trichomonas tenax*. Se observan en su interior numerosas vacuolas fagocíticas en diferentes etapas de digestión. barra= 1 μ m

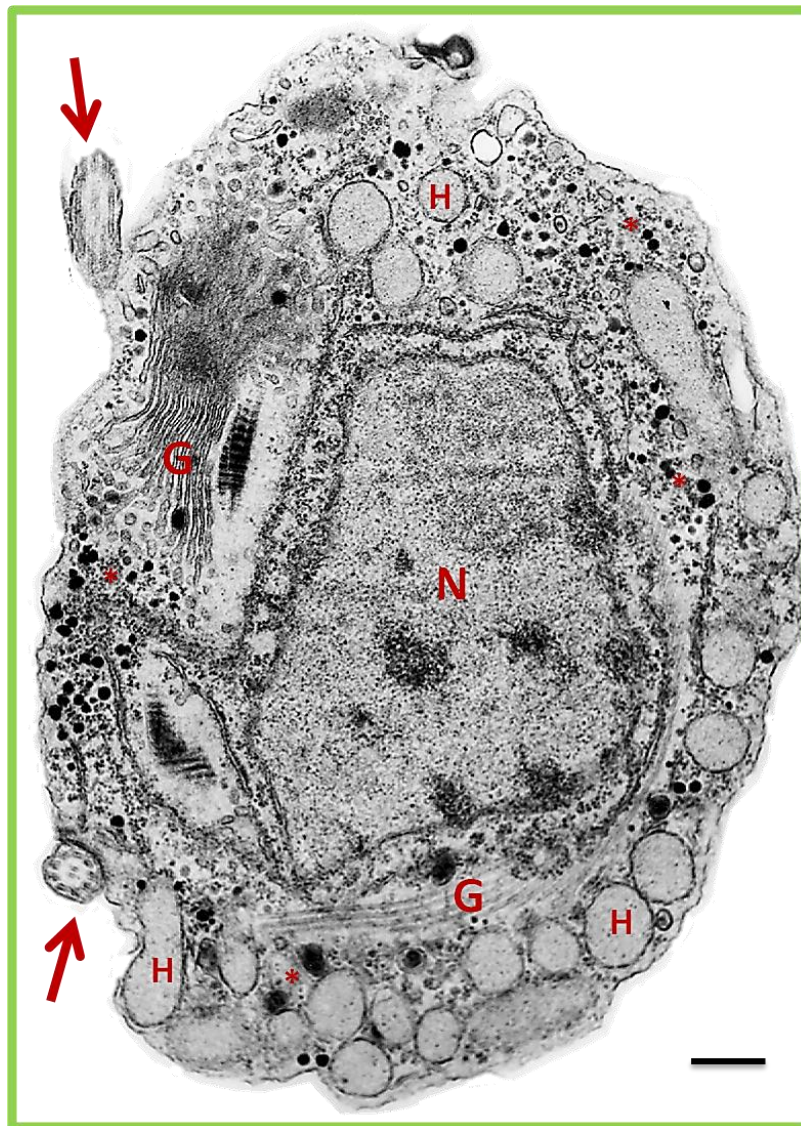


Fig. 14. Micrografía de *Trichomonas tenax* donde se aprecian sus componentes estructurales citoplasmáticos. N=núcleo, H= hidrogenosomas, G=aparato de Golgi, *= gránulos de glucógeno, Flagelos (flechas). barra= 1 μ m

También presenta estructuras redondas u ovoides que son vesículas de doble membrana de tamaño variable. Tienen actividad fagocítica digiriendo partes de la célula u organelos deteriorados o aberrantes. Mostrando así que *Trichomonas tenax* tiene actividad autofágica, dichas estructuras se denominan autofagosomas. (fig. 15). La autofagia se asocia a crecimiento celular, desarrollo y homeostasis en

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

mamíferos; en organismos inferiores se consideran como un fenómeno de muerte celular tipo II que se relaciona con estrés celular, falta de nutrientes, incremento de la temperatura o estrés oxidativo (fig. 16).

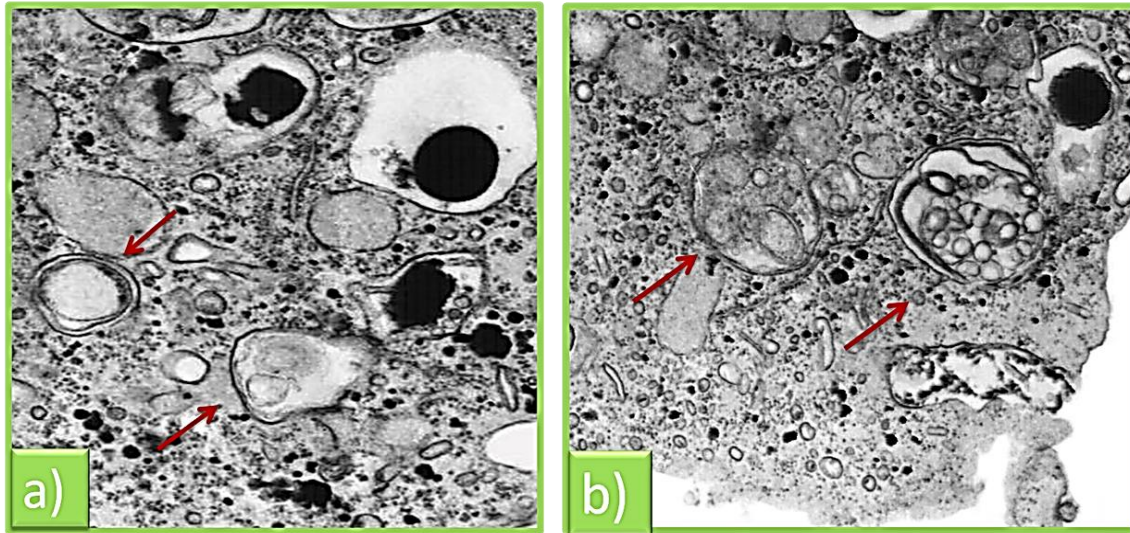


Fig. 15. Micrografía de *T. tenax*. a) y b) Se muestran autofagosomas en el citoplasma del parásito. (flechas).

Se observaron formas redondeadas de *Trichomonas tenax* semejantes a la formas quísticas presentes en otros protozoarios. Las observaciones realizadas al MET mostraron que estas formas presentan una membrana celular festoneada, bien conservada y no presenta pared quística, de tal forma que no se encuentra esta fase en su ciclo de vida por lo menos en medio de cultivo. (fig.20).



Fig. 16. Micrografía *Trichomonas tenax*. Se presenta un corte transversal donde se observa su membrana plasmática. Barra = 3 μ m.

VIII. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado antes se considera a *Trichomonas tenax* el principal protozooario que se encuentra en cavidad oral y que es específicamente diferente a las encontrados en el intestino (*Trichomonas hominis*) y en el aparato genito-urinario (*Trichomonas vaginalis*) del ser humano. *Trichomonas vaginalis* es la especie de mayor tamaño dentro del género *Trichomonas*; mide hasta 30µm sus características dependen de las condiciones ambientales en las que se desarrolle, en cultivos axénicos se le considera un protozooario de vida libre, piriforme y en cultivos celulares adopta una forma ameboide^{64,65}.

Se ha demostrado por más de 100 años la presencia de *Trichomonas tenax* en individuos que presentan alguna enfermedad en cavidad oral, incluyendo periodontitis⁶⁶. Diversos estudios han reportado la frecuencia de *Trichomonas tenax* en cavidad oral y lo han relacionado con una higiene oral deficiente, considerando la presencia de *Trichomonas tenax* como un importante determinante de infecciones ya que se han aislado en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica, presentando incidencias que van desde un 3% hasta el 20%.

A pesar de la alta incidencia de *Trichomonas tenax* en cavidad bucal y su asociación con la enfermedad periodontal; no ha sido considerado de importancia dentro de los microorganismos presentes en la microbiota oral y por tanto no se vincula su relación con la enfermedad periodontal. Estos datos aportan otra visión de la interacción y relación de los microorganismos presentes en la microbiota oral y la participación de *Trichomonas tenax* en la epidemiología de la enfermedad. Durante muchos años se le ha descrito como un comensal, sin embargo es importante resaltar que presenta actividad proteolítica por endopeptidasas que afectan al colágeno presente en los tejidos periodontales^{43,44} y la presencia de fosfatasas ácidas en sus componentes estructurales. Con los hallazgos en este estudio se sugiere a *Trichomonas tenax* como un probable patógeno de la cavidad bucal.

Trichomonas tenax igual que *Trichomonas vaginalis* se han descrito diferentes formas nucleares, sin embargo en esta revisión no encontramos la variante forma de herradura; su núcleo es oval con gránulos de cromatina dispersos cubierto por la membrana nuclear, aparato de Golgi, cuerpo parabasal, cuatro flagelos anteriores y uno más que recorre el borde libre acompañando a la membrana ondulante; el axostilo atraviesa el cuerpo celular, su citoplasma contiene hidrogenosomas que tienen funciones metabólicas⁶⁵. Sin embargo a diferencia de *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax* presenta estructuras redondas que poseen doble membrana de tamaño variable y que tienen actividad fagocítica mostrando así la capacidad autofágica de *Trichomonas tenax*; estas estructuras son denominadas autofagosomas^{27,28,48}.

Por otro lado, se ha reportado la presencia de una fase quística en el ciclo de vida de este protozooario en cavidad oral y en medio de cultivo⁴⁷. Este hallazgo coincide con lo observado en nuestro grupo de trabajo, en el que a partir de una muestra de cultivo se observó una forma redondeada que podría ser considerado como quiste⁶⁴. La descripción de una posible fase quística en el ciclo de vida de *Trichomonas tenax* es de suma importancia, ya que esta fase de resistencia del parásito apoyaría en la comprensión de la relación huésped-parásito, mostrando otro posible mecanismo de transmisión. Se ha descrito la presencia de pseudoquistes de *Trichomonas tenax* refiriendo a esta fase morfológica como una transformación de los tricomonados en formas compactas, menos móviles, sin una pared quística verdadera, y que exhiben un flagelo interno⁴⁸. En nuestra investigación observamos esta forma redondeada de *Trichomonas tenax* al microscopio de luz, sin embargo al observarlas por MET no se identificó pared quística, únicamente la membrana intacta del protozooario; descartando así la formación de quistes por *Trichomonas tenax*. Dicha forma redondeada ha sido considerada por algunos investigadores como un proceso de degeneración celular por un bloqueo de la citocinesis, considerándola como una célula gigante^{48,64}.

IX. CONCLUSIONES.

Se encontró una asociación significativa entre la presencia de *Trichomonas tenax* y la periodontitis crónica, sugiriendo su acción como un patógeno de la cavidad bucal y su incidencia en la enfermedad periodontal.

La observación de formas redondeadas de *Trichomonas tenax* al microscopio de luz, que podrían corresponder con formas quísticas, se han descartado pues las observaciones de MET revelaron la ausencia de pared quística y en su lugar observamos una membrana plasmática integra, por lo que concluimos que *Trichomonas tenax* solo presenta en su ciclo de vida la forma de trofozoito.

Si bien se han descrito diferentes formas nucleares en *Trichomonas tenax*, en esta revisión no descubrimos esas variantes, las observaciones realizadas correspondieron a núcleos ovals.

Trichomonas tenax presenta estructuras redondas de doble membrana de tamaño variable con actividad fagocítica denominadas autofagosomas, mostrando así su capacidad autofágica.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*: 1979; 6: 351-382
2. Socransky, SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res. Supplement to No. 2*. 1970. 203-222.
3. Armitage, Gary C. Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. *Periodontology 2000*. Vol. 9. 2005. 9 – 21.
4. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and condition. *Ann Periodontol* 1999b; 4.
5. Armitage, Gary C. Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. *Periodontology 2000*. Vol. 9. 2005. 9 – 21.
6. Liébana Ureña, J. Microbiología oral. 2ª edición. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid.2002. 241-260,509-511.
7. Jawetz Melnik y Adelberg. Microbiología médica. 15ª edición, Ed. Manual Moderno; 1995.
8. Negroni M. Microbiología estomatológica. 1ª edición, México, Editorial Panamericana, 1999.
9. Socransky SS, Haffajee AD. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontology 2000*. (Ed Esp) Vol.3. 2003. 12-55.
10. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MD, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998. 25 (2) 134-44.
11. Carranza, Newman, Takei. Periodontología clínica. 9ª edición. Mc Graw Hill Interamericana. 2002. 69-72,111-114, 421-425.
12. Lindhe Jan. Periodontología clínica e implantología odontológica. 3ª edición.

13. Haffajee AD., A. Bogren., H. Hasturk., M. Feres., N. J. Lopez., and S. S. Socransky et al. "Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations." J Clin Periodontol. 2004. 31(11) 996-1002.
14. Haffajee AD., Socransky SS., Ebersole JL. Survival analysis of periodontal sites before and after periodontal therapy. Journal of Clinical Periodontology 1985: 12: 553-567.
15. Haffajee A., Socransky S, Feres, M., Ximenez-Fyvie, LA. "Plaque microbiology in health and disease". In: Newman HN & Wilson M, ed. Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. Eastman Dental Institute, University College London. 1999: 255-282.
16. Burt B. 2005. Position paper; Epidemiology of periodontal diseases. J Periodontol 76: 1406-1419.
17. Haake S.K, Meyer D.H & Fives-Taylor P.M. 2006. Periodontal diseases. ASM press, Washington.
18. Socransky S.S. 1977. Microbiology of periodontal disease-present status and future considerations. J Periodontol. 48: 497-504.
19. Page R.C., Offenbacher S., Schroeder H.E., Seymour G.J., Kornman K.S. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000.14:216-248.
20. Darveau R.P., Tanner A., Page R.C. 1997. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000.14: 12-32.
21. Offenbacher S., Collins J.G., Yalda B., Haradon G. 1994. The role of prostaglandins in high risk periodontitis patients. In: Johnson NW, ed. Risk markers of Oral diseases, vol 3. Periodontal Diseases. Cambridge: Cambridge University Press; 1991: 76-106.

22. Page R.C. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. J. Periodontol 1992; 63 (Suppl.) 356-366.
23. Al-Rasheed A., Scheerens H., Rennick D.M., Fletcher H.M., Tatakis D.N. 2003. Accelerated alveolar loss in mice lacking interleukin-10. J. Dent Res. 82: 632-635.
24. Goutoudi P., Diza E., Arvanitidou M. 2004. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin 1- α and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. J. Dent. 32:511-520.
25. Pumarola A, Rodríguez Torres A, García Rodríguez JA y Piedrola Angulo G. Microbiología y parasitología médica. 2ª edición, Ediciones Científicas y Médicas S.A.; 1994.
26. SS Socransky, AD Haffajee 2005. Periodontal microbial ecology Periodontology 2000, 38:135-187.
27. Tay J. Velasco, O, Lara R, Gutiérrez M. Parasitología médica. 7ª edición. Méndez editores. 2002. 17-56.
28. Prats, G. Microbiología Clínica. Médica Panamericana. Madrid. 2006.
29. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AF. Diagnóstico microbiológico. 11ª edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires. 2004. 633, 641, 661 – 662, 666, 695 – 696.
30. Leuckart R. Die Parasiten des Menschen. 1879. 2 ed. Vol. 1. 8°. Leipzig & Heidelberg.
31. Brass A. Die thierischen Parasiten des Menschen. 1884. 8°. Cassel.
32. Blanchard R. Traite de Zoologie medicale. Vol. 1. 8°. Paris. [Whole work in 2 vols., dated 1889, 1890 Fasc. 1 (1-192) published 1885].
33. Braun M. Die thierischen Parasiten des Menschen. 1895. 2 ed. 8°. Wurzburg.

34. Doflein F. (1911) Lehrbuch der Protozoenkunde; eine Darstellung der Naturgeschichte der Protozoen mit besonderer Berücksichtigung der parasitischen und pathogenen Formen. Jena, 3rd edition, 492.
35. Goodey T, Wellings AW (1917) Observations on Entamoeba gingivalis from the human mouth, with a note on the trichomonad flagellate Tetratrichomonas buccalis. n.sp. Parasitology. 9:537-559.
36. Ohira T, Noguchi H. (1917) The cultivation of Trichomonas of the human mouth (Tetratrichomonas Hominis). Published February 1, from the Laboratories of the Rockefeller Institute for Medical Research. 341-347.
37. Dobell C. (1939) The common flagellate of the mouth Trichomonas tenax (O.F.M): Its discovery and its nomenclature. Parasitology; 31: 148-56.
38. Hersh S.M (1985) Pulmonary trichomoniasis and Trichomonas tenax. J. Med. Microbiol. Vol. 20: 1-10.
39. Kuratowska AJ., Dudko A., Kurnatowski P.(2004). Invasion of Trichomonas tenax in patients with periodontal diseases, Rev, Wlad Parazytol. 50 (3):397-403.
40. Nocito M. I, Vasconi C. MD, Ponce de León Horianski P (2003) Entamoeba gingivalis y Trichomonas tenax en pacientes diabéticos. RCOE 8 (1):13-23.
41. Pardi G. Perrone, M. Mazzali R. (2002) .Incidencia de Trichomonas tenax en pacientes con periodontitis marginal crónica. Acta Odontológica Venezolana. 40:2: 152-159.
42. Pardi G.,Perrone M., Mazzali R (2004) Incidencia de Trichomonas tenax en pacientes con gingivitis. Caracas, Venezuela.
43. Bozner P, Demes P (1991) Degradation of collagen types I,III,IV and V by extracellular proteinases of an oral flagellate Trichomonas tenax. Archs Oral Biol.36 (10):765-70.
44. Segovic S,Buntak-Kobler D.,Galic N.,Katunaric M (1998) Trichomonas tenax proteolytic activity.Coll Antropol.22 (Supp):45-9.

45. Ribaux CL., Magloire H., Joffre (1980) Données complémentaires à l'étude ultrastructurale de *Trichomonas tenax*. Localisation intracellulaire de la Phosphatase Acide. *J. Biol Buccale*. 8:213-228.
46. Nagao E., Yamamoto A., Igarashi T., Goto N., Sasa R (2000) Two distinct hemolysins in *Trichomonas tenax* ATCC 30207. *Oral Microbiol Immunol*. 15 (6) 355-9.
47. Wantland, W. W, Wantlad, E.M. and Windquist, D. L (1960). Incidence, ecology, and reproduction of oral protozoa. *J Dent Res Research* 39:863-72.
48. Benchimol M, de Andrade Rosa I, da Silva Fontes R, Burla Dias AJ. *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol Res*. 2008 Mar;102(4):597-604. Epub 2007 Nov 28.
49. Kofoid, C. A. Swezy, O. (1915) Mitosis and Multiple Fission in *Trichomona* de Flagellates. *Proc. Am. Acad. Arts and Sc.* 289.
50. Grassi AM, De Carneri I. (1961). Frequenza dell infezione da *Trichomonas tenax* ed *Entamoeba gingivalis* i soggetti di eta avanzata viventi in comunita. *Parassit*; 3 (1-2): 151-4.
51. Feki A, Molet B, Haag R, Kremer M. (1981) Les protozoaires de la cavité buccale humaine. (epidemiologicl correlations and pathogenic possibilities) *J Biol Buccale*; 9 (2): 155-61.
52. Cavalcanti de Albuquerque J, Muora de Mela C, Alcántara de Santana, Lopez Rivero J, Flavia Albuquerque. (2011) Incidence of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in samples of dental biofilm and saliva from patients with periodontal disease. *Rev Gaucha Odontol. Porto Alegre*. 59:1 35-40.

53. Gharavi MJ., Hekmat S., Ebrahimi A., Jahani MR (2006). Buccal cavity protozoa in patients referred to the faculty of dentistry in Tehran, Iran. *Iranian J Parasitol*: 1:1. 43 – 46.
54. Kurnatowska Aj., Kuratoski P (1998): Trichomoniasis of the oral cavity complicated by mycosis. *Parassitologia*.40:339-42.
55. Beatman LH. (1933). Studies on *Trichomonas buccalis*. *J Dent Res*; 13: 339-347.
56. Wantland WW, Wantland EM (1958) Studies in human mouth protozoa. *J Dent Res* 37:949-50.
57. Pardi G. Perrone, M. Mazzali R. (2002) .Incidencia de *Trichomonas tenax* en pacientes con periodontitis marginal crónica. *Acta Odontológica Venezolana*. 40:2: 152-159.
58. Vázquez N, Gerardo; Echeverría, O. Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biológicas. Fondo de Cultura Económica. México. 2000.
59. David B. Williams and C. Barry Carter, 1996, *Transmission Electron Microscopy*, Edit. Plenum Press, New York.
60. Athari A.,Soghandi L.,Haghughi A.,Kazemi B (2007) Prevalence of oral trichomoniasis in patients with periodontitis and gingivitis using PCR and direct smear.*Iranian J Pub Health*.36 (3):33.7.
61. Wantland WW and Lauer D. Correlation of some oral hygiene variables with age, sex, and incidence of oral protozoa. *Journal of Dental Research*.1970. 49: 293 – 297.
62. Karnovsky M.J.1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol*. 27:137A-138A.

63. Spurr A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding médium for electron microscopy. J Ultrastruct Res 26:31.
64. Velázquez de la Cruz Adriana. 2010. Frecuencia de *Trichomonas tenax* y *Entamoeba gingivalis*, en pacientes con gingivitis, periodontitis crónica y en sujetos periodontalmente sanos. p.p 1-60 Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista.
65. Costamagna Raul, S; Prado Figueroa, M. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. Parasitol. día v.25 n.3-4 Santiago jul. 2001.
66. Bass CC., Johns FM.: Pyorrhea Dentalis and Alveolaris, Specific Cause and Treatment. 1915. JAMA 64: 553-558.
67. <http://www.microbiologia.com.ar/bacterologia/fisiologia.php?Mostrar=medida>
68. <http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/CellBio/Growth/MGDirect.html>
69. Oscar Bastidas. Conteo celular con hematocitómetro, uso elemental del hematocitómetro. Technical note – Neubauer Cahmber Cell counting.
70. <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/conteo-celular.html>
71. <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/lab4/appb.html>

XI. ANEXOS

A. REACTIVOS.

Solución salina al 0.85 %.

Para preparar 500ml: pesar 4.25g de cloruro de sodio (NaCl) Baker®, aforar a 500ml con agua desionizada, esterilizar en autoclave a esterilizar en autoclave a 121°C durante 30 minutos a 15 libras de presión. Conservar a 4°C.

PBS 1x

Se requiere:

Fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$) Baker® .15M peso molecular 137.99

Fosfato dibásico de sodio (NaH_2PO_4) Baker® .15M peso molecular 137.99

De inicio se debe preparar el PBS Stock

1. Pesar 2.07g de Fosfato monobásico de sodio y mezclar en 100ml de agua desionizada.
2. Pesar 2.13g de Fosfato dibásico de sodio y mezclar en 100ml de agua desionizada.
3. Agregar monobásico al dibásico hasta obtener pH 7.2

Para obtener:

500ml = 5.35g NaCl + 50ml Stock + 450ml de agua desionizada

1L = 10.7g NaCl + 100ml Stock + 900ml de agua desionizada

2L = 21.7g NaCl + 200ml Stock + 1800ml de agua desionizada

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 30 minutos a 15 libras de presión. Conservar a 4°C.

Solución de Ringer.

Para preparar 1L: pesar 8g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.2g de cloruro de potasio (KCl) y 0.2 g de cloruro de calcio (CaCl_2) Baker®, mezclar en 200ml y aforar a 1000ml con agua desionizada; esterilizar en autoclave a 121°C durante 30 minutos a 15 libras de presión. Conservar a 4°C.

B. MEDIOS DE CULTIVO.

Medio de cultivo RPMI-1640

Para preparar 1L: 1 sobre de RPMI en polvo, disolver en 500ml y aforar a 1000ml con agua desionizada. Agregar 10ml de Hepes, 10ml de penicilina, 10ml de glutamina y 50ml de Suero fetal bovino. Filtrar y conservar a 4°C.

Medio de cultivo Infusión cerebro – corazón

Para preparar 1L: pesar 25g de infusión cerebro – corazón DIFCO®, rehidratar en 200ml y aforar a 1000ml con agua desionizada; esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Conservar a 4°C.

Medio de cultivo Tioglicolato de Sodio

Rehidratar 29.8 g del medio de tioglicolato DIBICO® en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Conservar a 4°C y guardar en la oscuridad.

Medio de cultivo Robinson

El medio se prepara como sigue:

1. Agar salino: agar 1.5% preparado en 0.7% de cloruro de sodio disuelto en 2.5ml; verter en botellas con tapa de rosca. Los tubos se colocan en autoclave con una inclinación de 45° a 15 libras de presión por 15 min.
2. Solución de eritromicina: preparar suspensión al 20% en 70% de etanol se prepara en matraz, se diluye a 0.5% con agua destilada. Conservar a 4°C.
3. Bactopeptona: se prepara 20% de la solución en agua destilada. Esterilizar a 5 libras de presión por 15 min.
4. Almidón de arroz como sustituto de BDH (SIGMA®).

5. Ftalato 0.05M: Disolver 204g de ftalato de sodio en 100ml de hidróxido de sodio al 40%, ajustar pH a 6.3, aforar a 2L. Esterilizar a 5 libras de presión por 15 min. Esta solución 0.5M se diluyó 1:10 en agua estéril.

6. Medio para determinar el crecimiento de *E. coli* "R": el stock contiene 125g de cloruro de sodio, 50g ácido cítrico monohidratado, 12.5g de fosfato de sodio deshidratado, 25g de sulfato de amonio, 1.25g de sulfato de magnesio heptahidratado y 100ml de ácido láctico (BDH, 90.08%) en 2.5L de agua. A 100ml del stock se agrega 7.4ml de hidróxido de sodio al 40% y 2.5ml de azul de bromotimol al 0.04% y se afora a 1L, se lleva a pH 7. Esterilizar a 5 libras de presión por 15 min. Conservar a 4°C. Este medio se puede usar por 4 semanas.

7. Medio básico para amibas "BR": Se cultiva *E. coli* en medio "R" durante 48 h a 37°C, se cierran y se mantienen en incubadora hasta por 2 meses cuidando que el pH no exceda 7.3.

8. Suero de oveja "S": se esteriliza con filtros Seitz a 56°C por 3 días consecutivos y almacenar a 4°C.

9. Medio complementado para crecimiento amibiano. "BRS": Se mezclan cantidades iguales de medio BR y suero S, se incuban a 37°C de 24 – 48 h y se almacenan en incubadora has por un mes. Se puede usar suero de caballo, conejo, buey o humano. (G.P DUTTA)

Nota: Todos los medios de cultivo antes mencionados fueron suplementados con 1g de L- cisteína al 1% para 100ml, 0.20g de ácido ascórbico al 0.02% para 100ml, 1g de peptona para 100ml, 1ml antibiótico para 100ml y 500µl vitamina K.

Medio de cultivo huevo-sangre.

Realizar el procedimiento en condiciones de esterilidad.

Lavar 5 huevos, limpiar con alcohol. Se colocan en un vaso de precipitado y se agrega 1ml de sangre de carnero desfibrinada por cada huevo, se colocan también perlas de vidrio estériles que facilitan la incorporación de los ingredientes. Una vez mezclado, se colocan 3ml en tubos de ensaye de 14ml con tapa de rosca

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

previamente esterilizados. Los tubos se colocan en autoclave con una inclinación de 45° a 15 libras de presión por 15 min. Cumplido este tiempo se agrega a cada tubo solución de Ringer hasta cubrir el medio sólido, 3g de almidón y 300 µl de antibiótico. Conservar a 4°C.

C. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Tinción de Hematoxilina-Eosina

Se colocan 30µl de muestras que se fija en el portaobjetos con metanol a manera de frotis, con un tiempo de exposición de 1 – 2 min. Se cubre el portaobjetos con hematoxilina durante 7min, se lava con agua corriente, se pasa por alcohol ácido y agua con amoniaco. Se deja en eosina por 2 minutos. Se lava con agua corriente hasta observar la muestra color rosa, si se tiñe en exceso se debe decolorar con alcohol de 96°, 10min en alcohol absoluto y xilol puro por 10 min. Para una preparación permanente se monta el cubreobjetos.

Técnica del Ácido periódico de Schiff (PAS).

Reactivo de Coleman Feulgen.

La tinción se prepara con 1g de fucsina básica, mezclar en 200 ml de agua desionizada caliente y llevar a ebullición, enfriar a temperatura ambiente y se agregan 2g de metabisulfito de potasio y 10ml de ácido clorhídrico normal. Se tapa el recipiente y se deja 24hr para decolorar, pasado este tiempo se agregan 0.5 g de carbón activado, se agita por 1mi y se filtra hasta que la solución decolora. Conservar a 4°C.

Las muestras se fijan en el portaobjetos con metanol a manera de frotis, con un tiempo de exposición de 1 – 2 min. Se cubre el portaobjetos con ácido periódico durante 5min, se lava con agua corriente y se deja en solución de Coleman Feulgen por 15 minutos. Se lava con agua corriente hasta observar la muestra color rosa, si se tiñe en exceso se debe decolorar con solución cloral al 5%. La muestra se pasa a solución de verde luz por pocos segundos, se lava con agua corriente de la llave y dejar secar. Para una preparación permanente después del lavado final hace sisadas en alcohol 70, 85, 96, absoluto de concentración y xilol. Finalmente montar el cubreobjetos.

Tinción de azul de Toluidina para cortes semifinos.

La tinción se prepara con 4% de Borato de Na (10g), se afora a 250 ml con agua bidestilada, se agrega 1.25g de azul de toluidina, se hierve en un matraz de 500 ml, con perlas de vidrio, se deja enfriar a temperatura ambiente y se filtra.

Para realizar los cortes semifinos las muestras se fijan con paraformaldehído y glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de amonio, se deshidrata con alcoholes a diferentes concentraciones y se incluye en resina epóxica de alta viscosidad (SPURR).

Técnica de rutina para microscopía electrónica de transmisión

Los parásitos se fijaron en solución de Karnovsky (1000 mOsm/kg) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron en amortiguador de cacodilatos 0.1 M, se postfijaron con tetraóxido de osmio 1%, se contrastaron y deshidrataron con una serie de alcohol etílico, serie de acetona, serie de material plástico soluble, seguido de esto se dio el segundo contraste y se aplicó un intermediario como el óxido de propileno; se incluyeron en resina epóxica SPURR. Se prepararon cortes finos (40-50 nm) con una navaja de diamante en un ultramicrotomo Reichert S, se hizo el montaje de los cortes sobre rejillas de cobre con membrana y se contrastaron con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo en 0.1% de NaOH. As preparaciones terminadas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EXII.

D. CURVA DE CRECIMIENTO.

Crecimiento celular

Es el incremento en el número de células. El crecimiento cuando las células se dividen por fisión binaria (de una célula se originan 2, de 2 se originan 4, de 4 se originan 8, etc.).

El crecimiento celular depende de variables como son el tiempo de generación celular, la viabilidad de la célula y la tasa de velocidad, donde la velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células por unidad de tiempo, denominado tiempo de generación. El crecimiento celular es exponencial donde el número de células se dobla cada cierto determinado tiempo, inicialmente la velocidad de incremento celular es lenta pero incrementa constante y progresivamente, pasando por las siguientes fases:

- Latencia: Tiempo que las células requieren para reorganizar sus sistemas enzimáticos.
- Logarítmica: Aumentan las células, alcanzan el ritmo máximo de duplicación.
- Estacionaria: El ritmo de división disminuye, existe un equilibrio entre las células viables y las que no lo son.
- Muerte: Pérdida de la viabilidad de las células, caída de la curva.

Conteo celular

Previo al conteo celular se prepararon muestras de 100µl en tubos eppendorf, colocando 50µl de muestra correspondiente a cada medio de cultivo y 50µl de solución salina; las muestras se colocaron en incubadora a 37°C y se revisaron cada hora durante 12 horas. El conteo celular se realizó tomando 10µl de la muestra con una micropipeta, se lee en cámara de Neubauer colocando cubreobjetos, se sitúa la punta de la micropipeta en el borde del cubreobjetos y se deposita el contenido en la cámara.

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

La cámara de Neubauer cuenta con una cuadrícula que forma cuatro cuadrantes, dos superiores y dos inferiores cada uno con 20 recuadros. Las células ubicadas dentro del cuadro o tocando los bordes superior e izquierdo deberán contarse. Es importante llevar un orden para no dejar fuera recuadro alguno (fig.1).

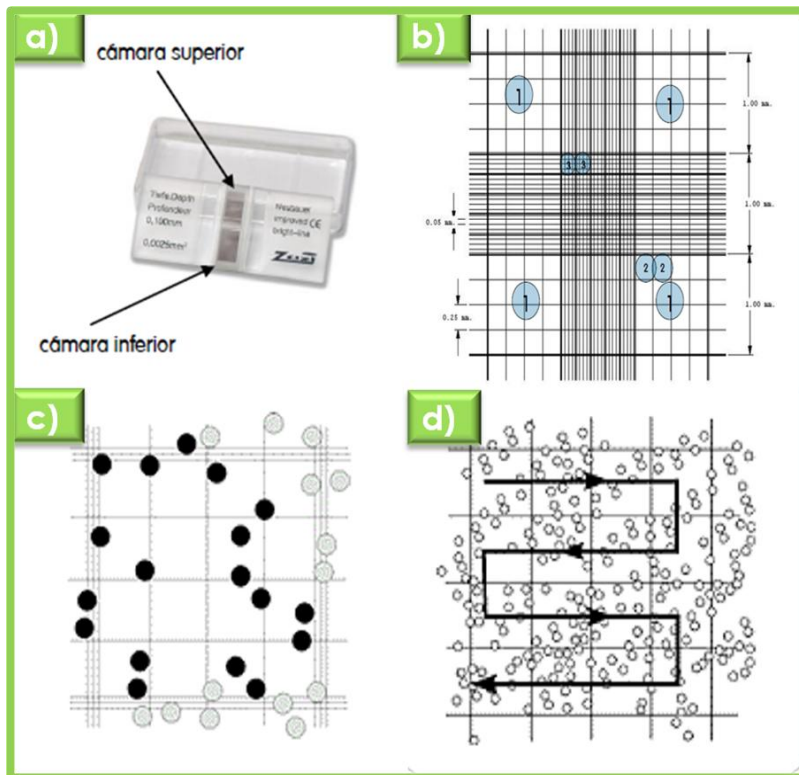


Fig.1. Esquema representativo del método de conteo celular. a) Cámara de Neubauer. b) Cuadrícula de la cámara de Neubauer a detalle. c) Distribución de las células en el cuadrante. d) Técnica para el conteo de la concentración celular. (Tomado y modificado de *Conteo celular con hematocítmetro, uso elemental del hematocítmetro. Technical note – Neubauer Chamber Cell counting*)

Para obtener el número total final se deben tomar en cuenta el número de células contadas en todos los cuadrantes y el volumen total de todos los cuadros, para ello se aplica una fórmula de concentración celular:

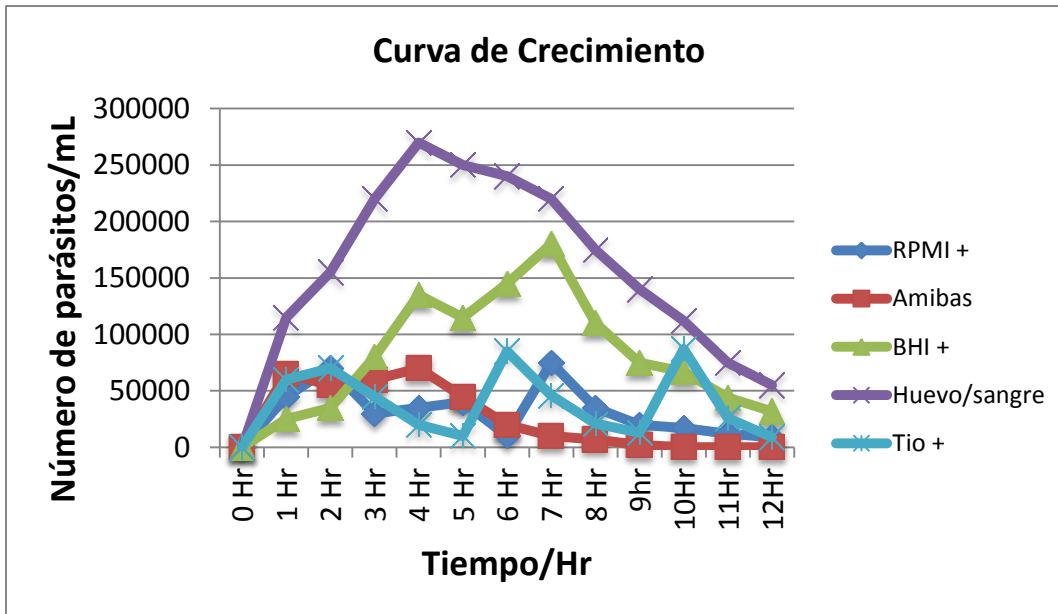
$$\text{Concentración} = \Sigma \text{ células} / 4 \times 20,000$$

Primera Curva de Crecimiento

Tiempo	RPMI +	Amibas	BHI +	Huevo/sangre	Tio +
0 Hr	0	0	0	0	0
1 Hr	45000	65000	25000	115000	60000
2 Hr	70000	55000	35000	155000	70000
3 Hr	30000	60000	80000	220000	45000
4 Hr	35000	70000	135000	270000	20000
5 Hr	40000	45000	115000	250000	10000
6 Hr	10000	20000	145000	240000	85000
7 Hr	75000	10000	180000	220000	46000
8 Hr	35000	7000	110000	175000	21000
9hr	20000	2200	75000	140000	13000
10Hr	17000	0	67000	112000	87000
11Hr	12000	0	44000	75000	26000
12Hr	9000	0	32000	55000	9000

Tabla 1. Base de datos que muestra el crecimiento exponencial y supervivencia de *Trichomonas tenax* en distintos medios, resultados correspondientes a la primera curva de crecimiento.

Caracterización ultraestructural de *Trichomonas tenax* aislada de pacientes con periodontitis crónica

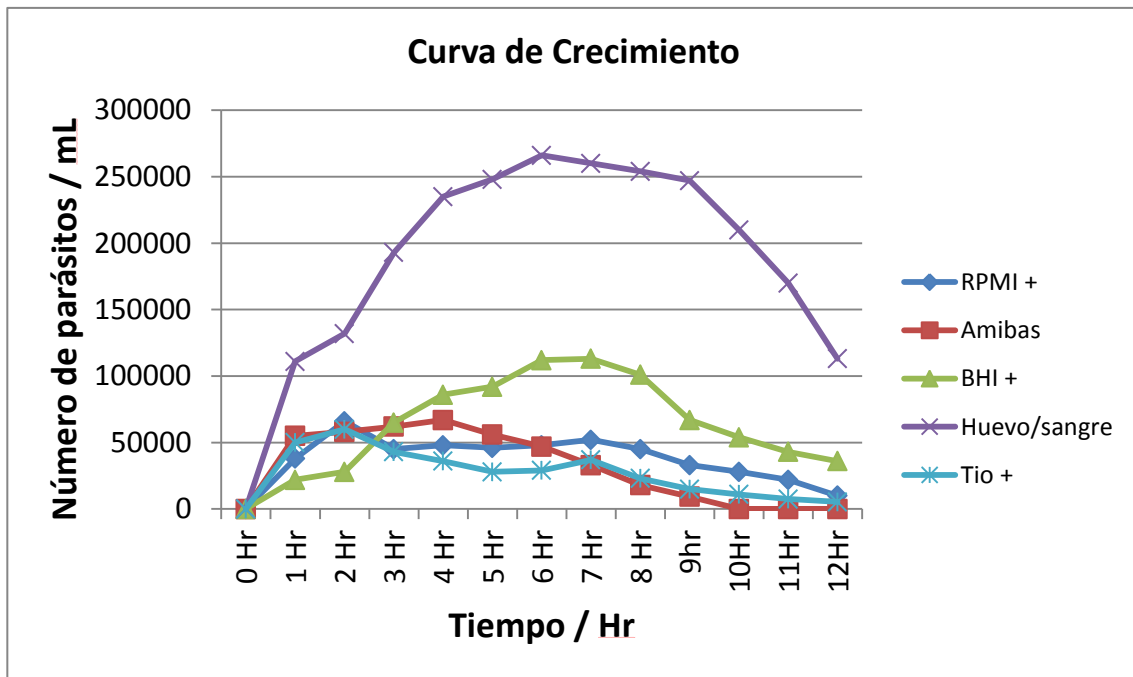


Gráfica 1. Primera curva de crecimiento. Se cultivó a *Trichomonas tenax* en distintos medios, observados por 12 horas para determinar su crecimiento exponencial y supervivencia.

Segunda Curva de Crecimiento

Tiempo	RPMI +	Amibas	BHI +	Huevo/sangre	Tio +
0 Hr	0	0	0	0	0
1 Hr	38000	55000	22000	111000	50000
2 Hr	66000	58000	28000	132000	60000
3 Hr	45000	62000	65000	193000	43000
4 Hr	48000	67000	86000	235000	36000
5 Hr	46000	56000	92000	248000	28000
6 Hr	48000	47000	112000	266000	29000
7 Hr	52000	33000	113000	260000	37000
8 Hr	45000	18000	101000	254000	23000
9hr	33000	9300	67000	247000	15000
10Hr	28000	0	54000	210000	11000
11Hr	22000	0	43000	170000	7500
12Hr	10000	0	36000	113000	5300

Tabla 2. Base de datos que muestra el crecimiento exponencial y supervivencia de *Trichomonas tenax* en distintos medios, resultados correspondientes a la segunda curva de crecimiento.

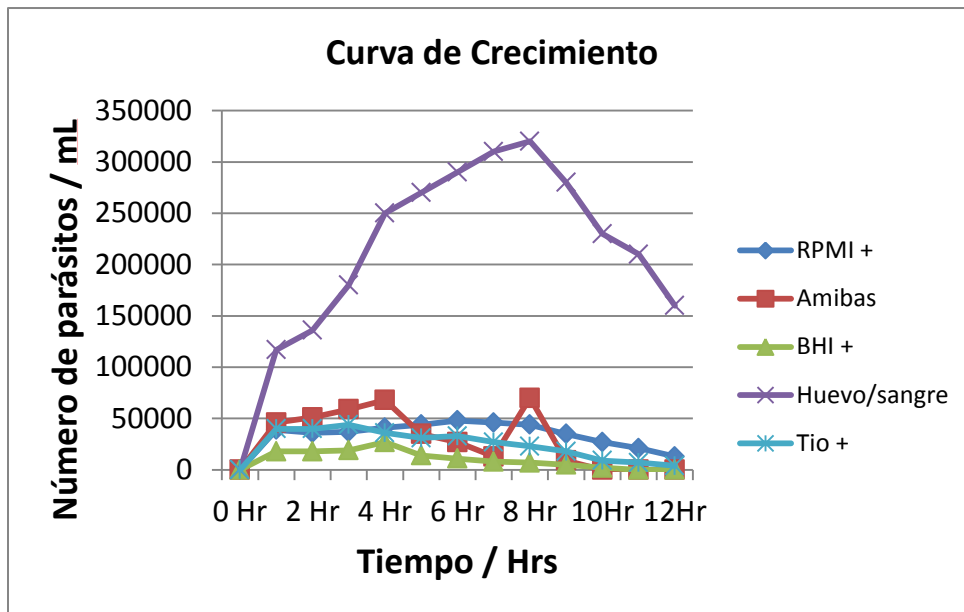


Gráfica 2. Segunda curva de crecimiento. Se cultivó a *Trichomonas tenax* en distintos medios, observados por 12 horas para determinar su crecimiento exponencial y supervivencia.

Tercera Curva de Crecimiento

Tiempo	RPMI +	Amibas	BHI +	Huevo/sangre	Tio +
0 Hr	0	0	0	0	0
1 Hr	39000	46000	18000	117000	40000
2 Hr	36000	51000	18000	136000	40000
3 Hr	37000	59000	19000	180000	44000
4 Hr	41000	68000	27000	250000	36000
5 Hr	44000	35000	14000	270000	31000
6 Hr	48000	27000	11000	290000	33000
7 Hr	46000	13000	8000	310000	27000
8 Hr	44000	70000	7000	320000	23000
9hr	35000	9000	5000	280000	18000
10Hr	27000	0	2000	230000	9000
11Hr	21000	0	0	210000	7000
12Hr	13000	0	0	160000	4000

Tabla 3. Base de datos que muestra el crecimiento exponencial y supervivencia de *Trichomonas tenax* en distintos medios, resultados correspondientes a la tercera curva de crecimiento.



Gráfica 3. Tercera curva de crecimiento. Se cultivó a *Trichomonas tenax* en distintos medios, observados por 12 horas para determinar su crecimiento exponencial y supervivencia.