



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Estandarización de ELISA polimixina para la identificación de LPS de
***Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* en muestras**
tomadas de bolsas periodontales

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO
P R E S E N T A:
HERNÁNDEZ LEÓN BRENDA ZOILA

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

ASESOR: MC. MAURILIO FLORES PIMENTEL

MÉXICO, DF., FEBRERO 2010

TESIS APOYADA POR PROYECTO PAPIME PE201307



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.

DEDICATORIAS

A Dios:

Por permitirme disfrutar de esta maravillosa vida, dejarme compartir cada momento con mis seres queridos. Por enseñarme que las lagrimas de hoy son la fuerza para seguir adelante mañana.

A mis padres: Ángel Gerardo Hernández Muñoz y Silvia Irma León Muñoz:

Por el apoyo que me brindaron para realizar esta importante meta, por haberme enseñado que siempre debemos fijarnos objetivos, y que a pesar de las dificultades que nos presenta la vida, podemos salir adelante y alcanzar el éxito cuando estamos decididos a perseverar en nuestros propósitos. *Gracias*

A mis Hermanos: Omar, Melina, Sonia, Daniel e Ivonne

Por compartir los momentos, tristes, melancólicos, felices e irrepetibles de nuestras vidas. *Gracias*

A Alejandro Cesar:

Por impulsarme a seguir adelante sin importar que tan dolorosa resulte superar las dificultades en la vida, por compartir su mundo, tiempo, amor y esperanza conmigo.

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis: DR. Rubén Marroquín Segura

Por su tiempo, empeño, dedicación, aprecio y transmitirme sus conocimientos, así como permitirme formar parte de su equipo de trabajo. *Gracias*

A mi asesor de tesis: MC. Maurilio Flores Pimentel.

Por su asesoría, orientación y disponibilidad para realizar este proyecto. *Gracias*

A los profesores:

MTRA. Yolanda Flores Cabrera y Dr. José Luis A. Mora

Por su disponibilidad y auxilio en todo momento para culminar este proyecto. *Gracias*

A mis sinodales: M en C Araceli García del Valle y Dra. Ma. Teresa Corona Ortega

Por su tiempo, atención, consejos y asesorías para mejorar este trabajo y hacer de mí una digna QFB. *Gracias.*

A mis compañeros del laboratorio de inmunología:

QFB. Guadalupe

QFB francisco

QFB Geovany

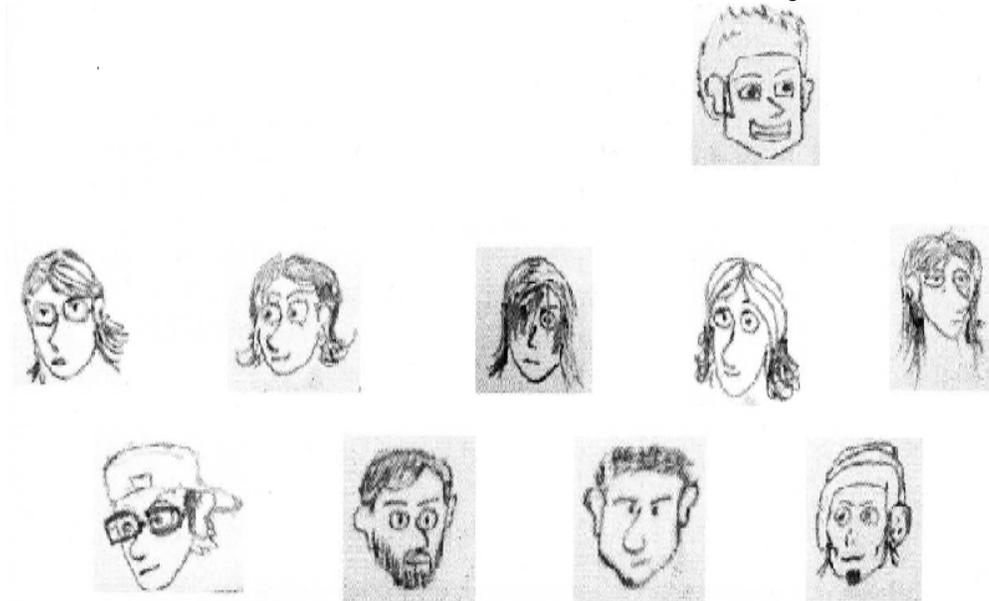
QFB. Blanca

QFB. Froylán

QFB Érick

QFB. Carmelo

Por su amistad, compañerismo y consejos para este proyecto. *Gracias*



“Por mi raza hablara el espíritu”

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	4
3.1. Gingivitis	4
3.1.1. Gingivitis inicial	5
3.1.2. Gingivitis temprana	5
:	
3.1.3. Gingivitis establecida:	6
3.1.4. La gingivitis ulceronecrosante	6
3.2. Periodontitis	6
3.2.1. Periodontitis crónica	7
3.2.2. Periodontitis agresiva	7
3.2.3. Periodontitis agresiva localizada	7
3.2.4. Periodontitis agresiva generalizada	7
3.3. Lipopolisacárido bacteriano y su efecto	9
3.4. Respuesta inmune en la enfermedad periodontal	10
3.5. <i>Prevotella intermedia</i>	15
3.5.1. Nutrición	15
3.5.2. Factores de virulencia	16
3.5.3. Etiopatogenia	16
3.6. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	17
3.6.1. Nutrición	18
3.6.2. Factores de virulencia	18
3.6.3. Etiopatogenia	19
3.7. Método de ácido sulfúrico y fenol	20
3.8. Tamices moleculares (cromatografía en columna)	20

3.9. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)	21
3.10. ELISA ligado a polimixina	22
4. Planteamiento del problema	24
5. Objetivo general	24
5.1. Objetivos específicos	24
6. Hipótesis	25
7. Diseño metodológico	25
8. Material	27
9. Diagrama de flujo	30
10. Método	31
11. Resultados	41
12. Análisis de resultados	65
13. Conclusiones	67
14. Anexo	68
14.1. Pacientes con lesión periodontal	68
14.2. Preparación de soluciones de trabajo	69
14.3. Preparación de la escala de McFarland	73
14.4. Calculos	74
15. Referencias	75

1. RESUMEN

El propósito de este trabajo fue estandarizar el método de ELISA polimixina para la identificación de LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* en muestra tomadas de bolsas periodontales

Se realizó el cultivo de las cepas para la obtención, purificación y cuantificación del LPS bacteriano de *Prevotella intermedia* y *Porphyromona gingivalis*, posteriormente los LPS fueron utilizados para inmunizar conejos Nueva Zelanda obteniéndose el anti-LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromona gingivalis*, que fueron purificados por cromatografía de exclusión. Una vez obtenidos los anticuerpos se fabricaron los conjugados.

La determinación del título de los LPS y conjugado anti-LPS se realizó mediante la técnica ELISA ligado a polimixina, sobre una placa de ELISA sensibilizada con luz UV y recubierta con polimixina en forma de tablero de ajedrez.

Una vez determinados los títulos de LPS y conjugado de cada bacteria, se realizó el análisis de las muestras obtenidas de pacientes con diagnóstico de enfermedad periodontal; encontrando 8 muestras positivas para LPS de *Prevotella intermedia* de las 50 muestras tomadas, representando el 14 % de la población en estudio y 3 muestras de las 50 muestras reflejaron ser positivas para el LPS de *Porphyromonas gingivalis* representando el 5% del total de las muestras en la población de estudio.

2. INTRODUCCIÓN

Durante siglos la enfermedad periodontal ha sido una de las principales causas de la pérdida de piezas dentales, y es considerada un problema de salud pública, especialmente en adultos mayores de 20 años.

La enfermedad periodontal se divide en dos grandes categorías, la enfermedad gingival y la periodontal, ocasionados por un sólo patógeno o bien por la asociación de varios; la clasificación del padecimiento depende del microorganismo que logre desarrollarse, la edad del paciente y tipo de lesión o manifestación.

Los microorganismos usualmente identificados en la enfermedad periodontal son: *Actynobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forshythus*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium spp.* y *Peptostreptococcus spp.*

De los microorganismos antes mencionados los tres primeros tienen relevancia por ser los agentes de la enfermedad periodontal más frecuentes en adultos, por las condiciones alcalinas en las que desarrollan estos agentes, en comparación al ambiente ácido prevalente en la boca de los infantes donde otros agentes son la causa de pérdida de piezas dentales.

Prevotella intermedia y *Porphyromonas gingivalis* se distinguen por estar relacionadas a partos prematuros, recién nacidos con bajo peso corporal y afecciones cardiovasculares, desarrollo de periodontitis y pérdida de piezas dentales en embarazadas; debido a la influencia hormonal durante el embarazo, la cual favorece el crecimiento y proliferación de estas bacterias.

Entre los problemas para identificar a *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, encontramos la dificultad para cultivar e identificar bajas concentraciones de estos microorganismos en bocas sanas (estado portador).

A pesar de estas dificultades se han desarrollado diversas técnicas rápidas y precisas para la identificación de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, como son: PCR, ELISA, anticuerpos monoclonales y espectrofotometría UV, entre otras.

En México no figuran antecedentes sobre el perfil de prevalencia de estos agentes, tampoco ninguna prueba como tal para la identificación de los agentes

responsables de la enfermedad periodontal; ni siquiera existen laboratorios que ofrezcan ensayos para hallar a estos agentes.

Encontrando esta dificultad, el siguiente trabajo tiene como objeto estandarizar la técnica de ELISA ligado a polimixina para identificar a *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* en una población de pacientes con enfermedad periodontal.

La técnica de ELISA ligado a polimixina, utiliza polimixina B sobre una placa de ELISA que adhiere eficazmente a los lipopolisacáridos (LPS) presentes en los especímenes, los cuales posteriormente son detectados inmunoenzimáticamente utilizando anticuerpos conjugados específicos contra dichos LPS.

El desarrollo de esta técnica de identificación podría evitar que la enfermedad periodontal avance hasta ser la causa de daños y pérdidas de dientes. Así como la posibilidad de realizar a nivel nacional el primer estudio y censo epidemiológico de enfermedad periodontal.

3. MARCO TEÓRICO

La boca, cavidad bucal o cavidad oral es la abertura por la cual se realiza la ingesta de alimentos, constituye parte del aparato digestivo. La cavidad bucal está colonizada por bacterias desde nuestro nacimiento hasta la muerte, colonizan tejidos blandos como encías, mejillas además de los dientes por encima y debajo del margen gingival.

Los procesos patológicos que afectan a las estructuras del periodonto, incluyen a la gingivitis y la periodontitis, los cuales se producen como consecuencia de un desequilibrio entre los microorganismos y los mecanismos de defensa del hospedero.

La enfermedad periodontal es un grupo de condiciones heterogéneas causadas en parte por infecciones bacterianas que afectan los tejidos de soporte de los dientes, llevando a la pérdida del hueso y ligamento periodontal y por otro lado, por la respuesta del huésped como consecuencia de la activación de la repuesta.

Las infecciones del periodonto se dividen en dos categorías principales:

- Enfermedades gingivales.
- Enfermedades periodontales.

La inflamación de las encías afecta a todas las personas en algún momento de sus vidas, lo que se conoce como gingivitis pero, si además de la inflamación, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, que son el soporte de los dientes, también son afectados y comienzan a ser destruidos, la enfermedad es conocida como periodontitis.

3.1. Gingivitis

Es la inflamación superficial de las encías causada por irritantes de las bacterias presentes en la boca (placa dental o bacteriana), y es común en todas las edades. Cabe resaltar que no siempre la gingivitis es ocasionada por la placa dentobacteriana, existen otros motivos como el uso de medicamentos, mala nutrición, virus, hongos, enfermedades mucocutáneas, reacciones alérgicas, traumas y por introducción de cuerpos extraños.¹

La gingivitis que interesa en este trabajo es aquella ocasionada por la placa dentobacteriana, en la que se ha observado que cerca de la mitad de la población aisladas es biota anaerobia, conformada fundamentalmente por *Actinomyces spp*, *Fusobacterium spp*, *Prevotella intermedia* y cocos anaerobios.

La gingivitis se clasifica en tres etapas según el estado de daño inducidos por la placa bacteriana:

- Gingivitis inicial.
- Gingivitis temprana.
- Gingivitis establecida.
- Gingivitis ulceronecrosante.

3.1.1. Gingivitis inicial: la encía se observa clínicamente normal, sin enrojecimiento, inflamación, color normal. La lesión se hace presente histopatológicamente, las bacterias de la placa dentobacteriana supragingival producen metabolitos, como el butirato, propionato, péptidos quimiotácticos, tales como el N-formil-metionil-leucil fenilalanina (FMLP) y lipopolisacáridos (LPS). Esto provoca que el epitelio de unión libere interleucina 8 (IL-8). Un gradiente quimiotáctico dentro del epitelio de unión y el surco gingival provocan que los granulocitos polimorfonucleares (PMN) migren del pared vascular. Se observan linfocitos y células plasmáticas dispersos.

3.1.2. Gingivitis temprana: la encía muestra enrojecimiento e inflamación, características de esta lesión. Aumento adicional en la permeabilidad vascular conduce a un fuerte influjo de proteínas plasmáticas, incluyendo reactantes de la fase aguda, complemento. Grandes cantidades de PMN llegan al tejido conectivo y epitelio de unión, que expresan IL-8. Esto viene acompañado de alteraciones estructurales en el fondo del surco y la proliferación lateral de células basales. Los macrófagos activados producen citocinas pro-inflamatorias interleucina 1(IL-1), interleucina6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), factor de necrosis tumoral α (FNT- α), citocinas como IL-8 y la proteína 1-quimioattractiva de monocitos (MCP-1), así como prostaglandina 2(PEG₂) y colagenasa tisular, asegurando así el reclutamiento adicional de linfocitos T y monocitos. Los linfocitos T interactúan con los fibroblastos, que muestran

alteraciones en su citoplasma. El infiltrado de la lesión ocupa alrededor de 10 a 15% del volumen de la encía libre.

3.1.3. Gingivitis establecida: las características de la lesión establecida son la proliferación lateral distinta del epitelio de unión, el desgarre epitelial que conduce a la formación de bolsas gingivales y de manera subsiguiente la proliferación de bacterias. Los componentes agudos de la inflamación persisten, las poblaciones específicas de células mononucleares dominan en el infiltrado. Además de los linfocitos T, se encuentran linfocitos B y células plasmáticas que producen globulinas, principalmente anticuerpos policlonales no específicos.

3.1.4. La gingivitis ulceronecrosante: es una enfermedad aguda dolorosa, confinada a la encía, los síntomas incluyen: dolor, aumento de volumen, necrosis de la punta de la papila interdental, formación de úlceras con seudomembranas de color amarillo o gris. Factores de riesgo relacionados con la adquisición de esta enfermedad son: higiene oral deficiente, tabaquismo, estrés psicológico, falta de sueño, infecciones por VIH y presunta asociación con herpes virus.¹

3.2. Periodontitis

Se denomina "piorrea" (en griego "flujo de pus"), incluye la inflamación crónica y destrucción del hueso que soporta los dientes. También, las fibras gingivales y el ligamento periodontal son destruidos y el borde de las encías se desprende de los dientes, formando lo que se llama una bolsa periodontal en la cual puede aparecer pus. La bolsa periodontal se agranda si el hueso es destruido más severamente y, en consecuencia los dientes se aflojan, al avanzar la enfermedad los dientes se pueden mover aún más y es frecuente que se forme un absceso e incluso que se caigan.

En pacientes con periodontitis del adulto se ha señalado una distribución relativa de bacilos móviles y espiroquetas. Observándose que tres cuartas partes corresponden a especies Gram negativas de las cuales casi el 100% son anaerobias; cabe resaltar que no siempre la periodontitis es ocasionada por la placa bacteriana, existen otros factores o razones por las cuales se desarrollan, sin embargo por cuestiones prácticas, señalaremos aquellas relacionadas con la placa bacteriana.¹

3.2.1. Periodontitis crónica: Enfermedad infecciosa, anteriormente conocida como periodontitis del adulto; es la forma más frecuente de inflamación del aparato de soporte dental con pérdida progresiva de la adherencia y de hueso alveolar.

Se caracteriza por destrucción dental directamente proporcional a la cantidad de placa presente, se favorece por otros factores, los cuales pueden ser anatómicos y provocan que la placa sea retenida cerca del diente, formación de bolsas y frecuentes cálculos subgingivales. En general la enfermedad progresa lentamente pero puede haber etapas de destrucción rápida. También la progresión de la enfermedad puede estar modificada por factores locales, enfermedades sistémicas y algunos factores extrínsecos como fumar, con frecuencia se presenta después de los 20 años de edad, pudiendo presentarse en niños y adolescentes.

3.2.2. Periodontitis agresiva: anteriormente conocida como periodontitis juvenil, se caracteriza por una rápida pérdida dental y destrucción ósea, así como un elevado deterioro del tejido periodontal. Están presentes elevados niveles de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, en la placa bacteriana así como anomalías en la fagocitosis y producciones incrementadas de prostaglandinas e interleucina 1 β (IL-1 β)⁴. La periodontitis agresiva puede ser:

- Localizada
- Generalizada

3.2.3. Periodontitis agresiva localizada: Afecta sólo a ciertos dientes (incisivos y premolares), causa una rápida pérdida del hueso alveolar lo que ocasiona la pérdida del diente; se presenta durante la pubertad, es la enfermedad periodontal con la asociación más clara con una bacteria oral, ya que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es a menudo el organismo subgingival predominante. Aunque otros microorganismos como *Porphyromona gingivalis* y *Prevotella intermedia* también se encuentran presentes.

3.2.4. Periodontitis agresiva generalizada: por lo general inicia antes de los 30 años, pero puede aparecer más tarde, causa una rápida pérdida por episodios del hueso alveolar lo que ocasiona la pérdida del diente, afecta la fijación interproximal generalizada, en por lo menos tres dientes permanentes

que no sean primeros molares o incisivos. Factores adicionales de riesgo: son estrés emocional, medicamentos, hormonas sexuales y tabaquismo.

Los agentes infecciosos asociados con la periodontitis agresiva son varios, entre los que destacan: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens* y *Wolinella recta*¹

El factor etiológico esencial de la enfermedad periodontal es placa dental proveniente de los restos de comida, del fluido que sale del borde de la encía y de varios tipos de bacterias y sus productos; así mismo, los factores del medio pueden establecer un contexto propicio para que se produzca este desequilibrio. Las bacterias son necesarias pero no suficientes para que se desarrolle la enfermedad, para ello hace falta un hospedero susceptible, donde además factores de riesgo ambientales o rasgos genéticos que modifiquen la acción bacteriana. Para que el ciclo infeccioso se desarrolle se tienen que reunir cuatro condiciones:

- 1) Presencia de bacterias patógenas.
- 2) Ausencia de bacterias protectoras.
- 3) Presencia de una situación favorable para el desarrollo de bacterias virulentas.
- 4) Deficiencia en la inmunidad innata o adquirida.

Los microorganismos más comúnmente hallados en la enfermedad periodontal son: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium spp.* y *Peptostreptococcus spp.* De los microorganismos antes mencionados los tres primeros tienen relevancia por ser los agentes de la enfermedad periodontal más frecuentes, también resaltan por estar involucrados en afectaciones de órganos como el corazón, pulmones e hígado, *Prevotella intermedia* se distingue por estar relacionada con nacimientos de niños con bajo peso corporal, afecciones cardiovasculares y partos prematuros, debido a la influencia hormonal durante el embarazo que interviene en el ciclo de crecimiento y proliferación de esta bacteria.

Desde 1950 se han llevado a cabo estudios epidemiológicos de enfermedad periodontal en europea, encontrándose que existe una relación directa causa-efecto entre la placa dental y la severidad de la enfermedad periodontal. Estudios transversales en adultos, muestran que la pérdida de hueso alveolar es más severa en individuos de los cuales tienen pobre higiene oral.

La patogenia de la enfermedad periodontal sugiere la presencia la inmunidad celular que participa en la destrucción del tejido gingival y periodontal.^{1, 2,3.}

3.3. El lipopolisacárido bacteriano y su efecto

EL lipopolisacárido (LPS) es una molécula compuesta por un porción lipofílica, el Lípido A una región de poli ó oligosacáridos que está covalentemente unida a su dominio de anclaje de membrana externa.

El LPS tiene enormes variantes debido a la diversidad de su composición química en la región del polisacárido y a las variaciones en la estructura final del lípido A (Fig. 1), formado principalmente por cadenas de manosa. El lípido A es el centro inmunoestimulador del LPS, determinando la endotoxicidad en especies mamíferas, de esta forma, es el responsable del efecto del lipopolisacárido, debido a su especificidad y al reconocimiento altamente sensible por numerosos componentes celulares y humorales de la inmunidad innata, vía receptor de manosa.^{2,3.}

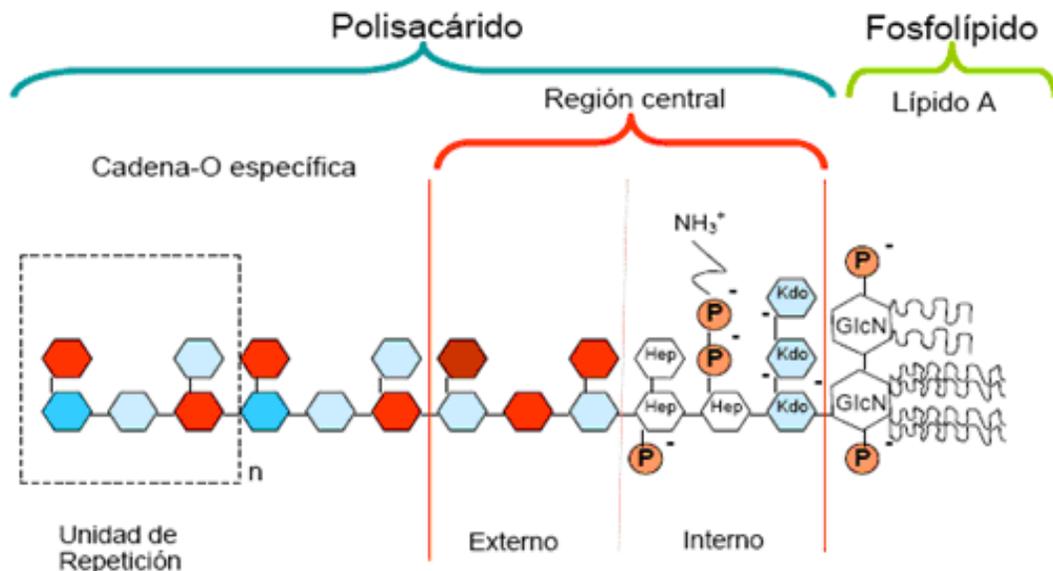


Figura 1. Composición del LPS^{4.}

El LPS es el componente mayoritario de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas, actúan como fuerte estimulador de la inmunidad natural o innata en diversas especies eucariotas de insectos y humanos.³

A concentraciones bajas el LPS estimula la producción de anticuerpos específicos, a concentraciones elevadas es un activador policlonal de células B, los anticuerpos para los polisacáridos tienden a ser predominantes del tipo IgM y también es el caso de los anticuerpos naturales para los antígenos de grupos sanguíneos.

Los anticuerpos tipo IgM juegan un papel importante en la defensa contra las infecciones bacterianas, es la más frecuente y se forma como respuesta primaria a un estímulo antigénico (fig.2). Son también los únicos anticuerpos o los predominantes entre los vertebrados más primitivos^{2, 5}.



Figura 2, Niveles de IgM e IgG que participan en la respuesta primaria y secundaria.⁶

La IgM no pasa la placenta, fija complemento, pero no el factor reumatoide; a diferencia de la IgG, es una inmunoglobulina opsonizante. Los anticuerpos tipo IgM son los más aptos para la aglutinación y lo son algo menos en la reacción inmunológica de precipitación.²

3.4. Respuesta inmune en la enfermedad periodontal

Las células epiteliales activadas por el LPS producen metaproteinasas de matriz que destruyen las fibras agregadas de colágeno y el epitelio de unión permitiendo la extensión apical del epitelio formando la bolsa periodontal.

Las metaloproteinasas de matriz median la pérdida de la ligadura y la prostaglandina media la resorción de hueso alveolar (y en algunos casos el cemento y la dentina), la bolsa gingival progresa para volverse una bolsa periodontal. Consecuente con esto hay cambios en la respuesta inflamatoria que termina en la producción de anticuerpos protectores y subsiguiente control de la infección o anticuerpos no protectores, destrucción de tejido conectivo y pérdida del hueso.^{3, 5.}

El incremento bacteriano así como sus productos de desecho interactúan con el epitelio penetrando hacia el tejido conectivo induciendo aumento en la expresión de moléculas de adhesión (selectina E) y productos pro-inflamatorios (citocinas). La permeabilidad vascular y la señales quimioatrayentes guían a los leucocitos en especial a los neutrófilos al tejido gingival. Si persiste la acción microbiana nociva en cuestión de días aparece la gingivitis (Fig. 3).

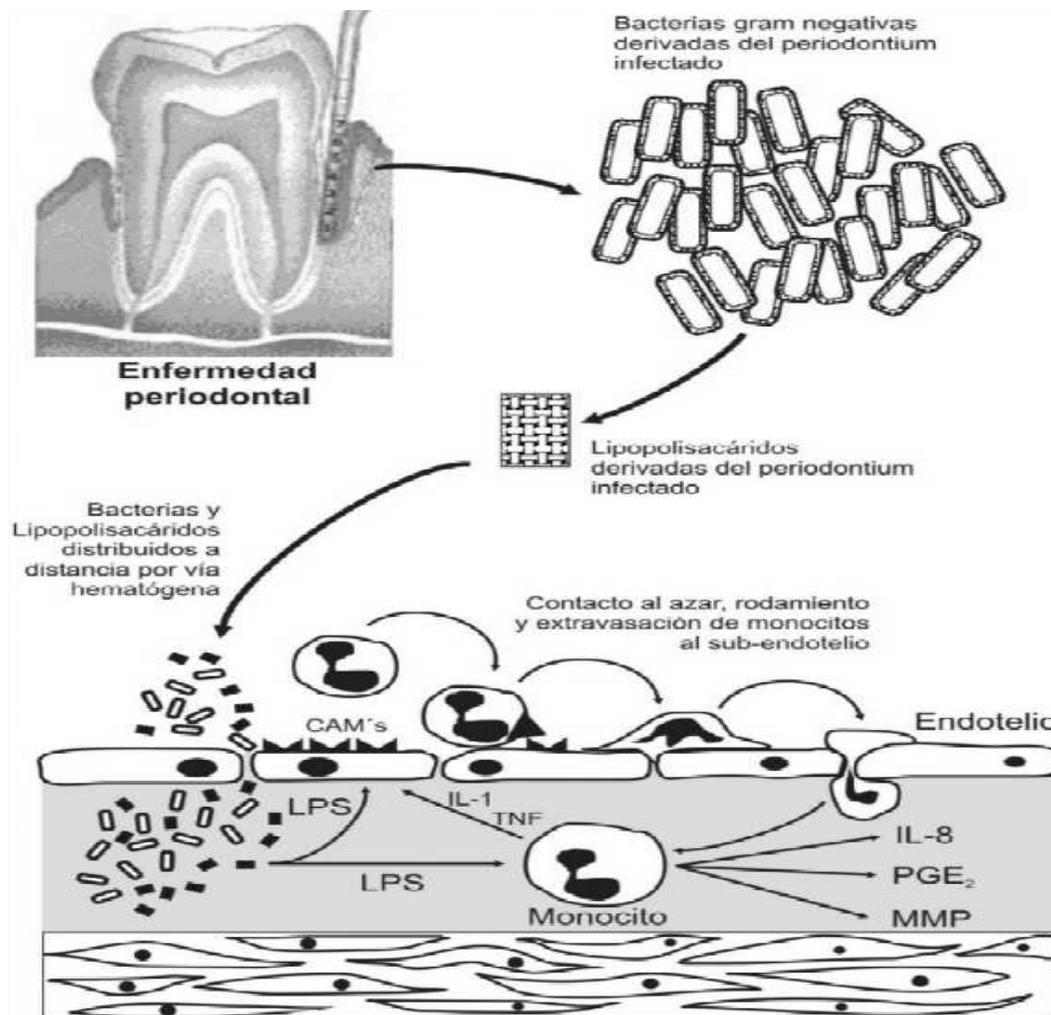


Figura 3. Respuesta del sistema inmune ante la presencia del LPS bacteriano⁷

Tras la acción microbiana se presenta una inflamación, misma que aumenta al persistir la infección bacteriana evadiendo las defensas del huésped, cuando esto ocurre la placa supragingival se extiende hacia el surco gingival interrumpiendo la unión entre mayor parte de la porción coronaria del epitelio de unión y la superficie de la raíz formando una bolsa superficial gingival, esta última proporciona las sustancias bacterianas irrigando el tejido y activando células epiteliales que secretan IL-8 y células endoteliales para aumentar la expresión de las moléculas de adhesión que resulta en la migración de linfocitos, edema y formación de infiltrado celular inflamatorio formado por monocitos, linfocitos T CD8+ y CD4+, linfocitos B y neutrófilos.

Las Citocinas producidas por estas células y los antígenos bacterianos conducen la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos creando una respuesta humoral.

Los macrófagos activados por el LPS producen IL-1 β , factor de necrosis tumoral α (TNF- α), metaloproteinasas de matriz y prostaglandinas E2 (PGE₂). La IL-1 β y el TNF- α activan los fibroblastos residentes para producir PGE₂ y metaloproteinasas. Ambos activan tipos celulares que disminuyen la producción de inhibidores de metaloproteinasas de tejido, dando como resultado un gran aumento de los niveles de metaloproteinasas de matriz, destruyéndose componentes de la matriz extracelular creando espacio para la expansión de tejido.

La resorción ósea se activa tras la presencia de IL-1, TNF α , TNF β , IL-6, PGE₂, IL-8, IL-3, IFG en la gingiva inflamada y fluido crevicular durante la enfermedad periodontal.

La resorción del hueso, se lleve por la interacción entre las células formadoras del hueso "osteoblastos" y las células encargadas propiamente de la resorción ósea "osteoclastos". El principal mecanismo regulador de la actividad osteoclastica es llevada a cabo por miembros de la familia de receptores de TNF: RANK (Receptor-activador del factor nuclear- κ B), la osteoprotegerina OPG y el ligando RANK-L. El RANK está expresado en precursores osteoclasticos y osteoclastos maduros, mientras que su ligando el RANK-L, una proteína transmembrana, está expresada particularmente en los osteoblastos.^{1, 3, 5, 7}

La unión entre el RANK-L y el RANK en las células precursoras osteoclasticas estimula la producción de osteoclastos maduros. Los osteoblastos también producen una proteína soluble de unión con el RANK-L, llamada osteoprotegerina “OPG”, la cual contrarresta los efectos de la unión RANK-RANK-L. Estudios recientes han demostrado que las interacciones entre el OGP, RANK-L y el RANK forman una intrincada regulación en la osteoporosis y las enfermedades osteolíticas, como la artritis, enfermedad periodontal y metástasis óseas asociadas a tumores. ^{1, 3, 7}

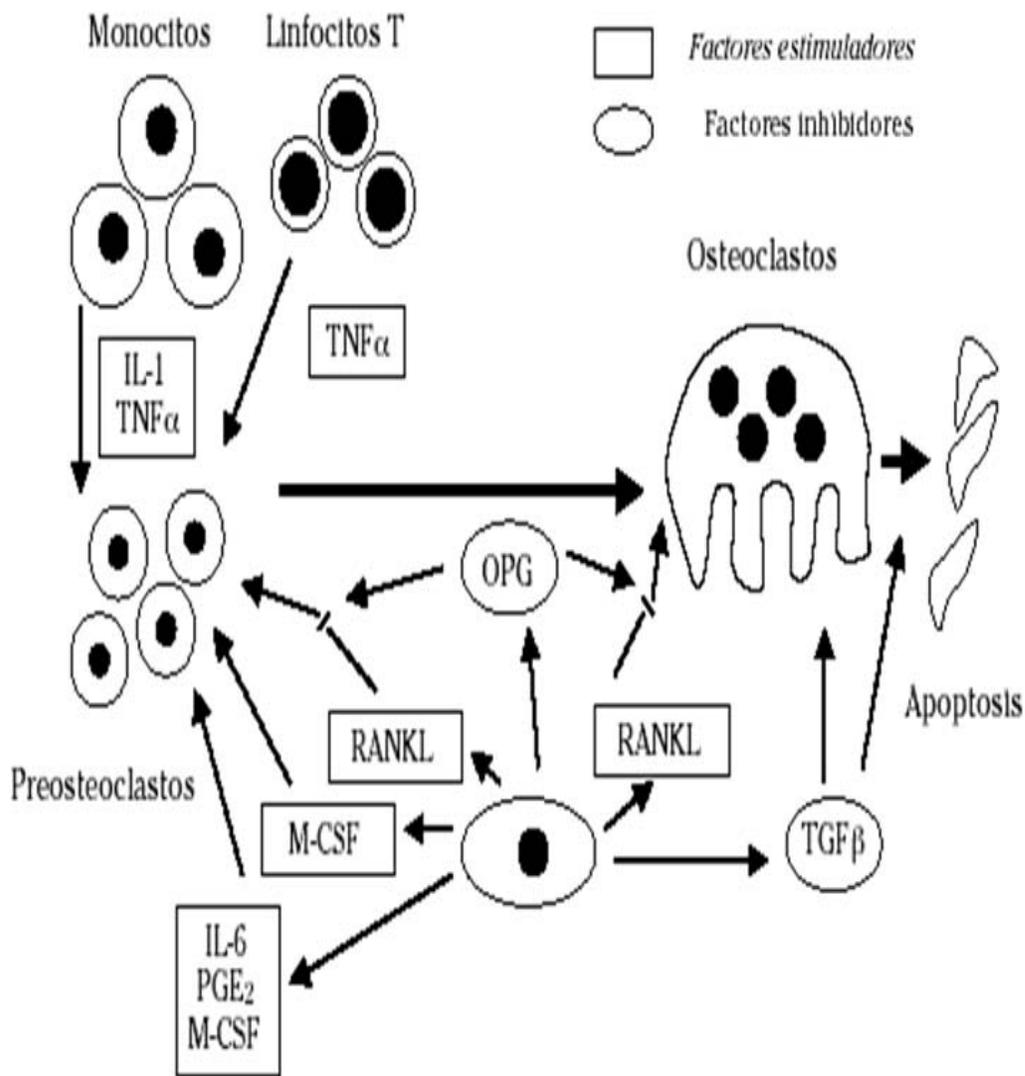


Figura 4. Mecanismo de resorción ósea⁷

Otros factores, además del sistema RANK-L, tales como las citocinas están involucradas en la fisiología y patología del tejido óseo:

A través del procesamiento y presentación de antígenos de los microorganismos patógenos periodontales (vía células dendríticas, macrófagos, células B activadas, etc.) las células T-CD4, se activan y producen moléculas de RANK-L, las cuales pueden activar directamente a los osteoclastos e inducir la resorción ósea, así como promover la diferenciación y activación de los precursores de osteoclastos. El receptor natural del RANK-L, el OGP, producido por las células del estroma (osteoblastos, condrocitos) puede competir por la unión a las moléculas de RANK-L, contrarrestando así los efectos de la resorción ósea. ^{1, 3, 5, 7}

3.5. *Prevotella intermedia*

Prevotella intermedia es un bacteroide de pigmentación negra, Gram negativo, bacilo o bacilo corto, extremos redondeados, inmóvil, anaerobio estricto con hábitat en surco gingival^{5,11}.

Su morfología colonial macroscópica se caracteriza por colonias negras-cafés, o pardas, son redondas, convexas, brillantes y lisas (Fig. 4), en ocasiones alfa hemolíticas, crecen en condiciones de anaerobiosis estricta (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂, "o" 90% H₂, 10% CO₂), a una temperatura de 36° C, el crecimiento es de 4 a 7 días.^{8,9}

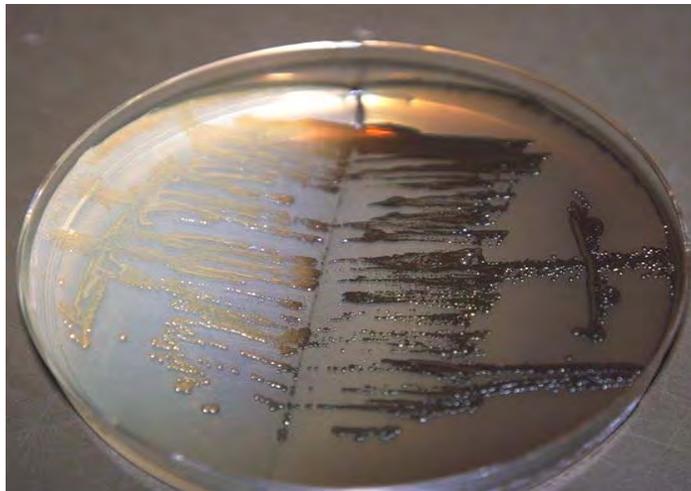


Figura 5. Colonias de *Prevotella intermedia* sobre agar sangre hemina-menadiona.

Son indol positivo, catalasa positiva, glucosa positiva, sucrosa positiva, lactosa negativa, catalasa negativa, hidrólisis de la esculina negativa, hidrólisis de la gelatina negativa, reducción de nitratos negativa, lipasa positiva, β -glucosamidasas negativa, tripsina negativa, quimotripsina movilidad negativa, α -galactosidasas, α -fucosidasas, sensible a la bilis, resistente a la vancomicina, colistina y kanamicina, sensible a la bacitracina y el metronidazol.^{8,9,10,11}

3.5.1. Nutrición

Metabolizan carbohidratos, peptonas, o productos intermedios metabólicos, crecen bien sobre medios enriquecidos con vitamina K, hemina, extracto de levadura, sangre, que son citotóxicos, formiato de sodio, fumarato de sodio, progesterona, estradiol o naftoquinona, requieren de un hidrato de carbono fermentable (dextrosa) produciendo butirato y succinato.

Posee una exigencia de hierro para desarrollarse, al ocurrir una falta de hierro en el sistema de poros de la bacteria (Sideroporos, los cuales quelan la hemina), utiliza la hemina (Hierro protoporfirina IX).

Un grupo de compuestos de donde obtiene la hemina y a su vez el hierro para cubrir su requerimiento en el anfitrión son: la hemoglobina, haptoglobina, mioglobina, hemopexina, metahemoglobina, oxihemoglobina, albúmina, lactoperoxidasa, catalasa y citocromo C; otra fuente de obtención de hierro son la adición de sales inorgánicas como: hierro ferrico, hierro ferrosos y hierro inorgánico no nitrogenado.

La hemina acumulada en la membrana extracelular actúa como receptor del oxígeno, promoviendo un micro ambiente anaerobio y contribuyendo el color verde, pardo u oscuro de las colonias.

Requiere de ambientes con sustratos abundantes de nitrógeno (péptidos y aminoácidos) y baja tensión de oxígeno.^{8, 9, 11.}

Se suelen cultivar en:

- Agar brucella base enriquecido con sangre desfibrinada de carnero, hemina y menadiona.
- Agar columbia base hemina, menadiona, vancomicina y sangre desfibrinada de carnero.
- Agar brucella base, con extracto de levadura, L-cisteina, hemina, menadiona en anaerobiosis.
- Agra soya tripticasa con 5% de sangre de cordero desfibrinada en anaerobiosis y extracto de levadura.

3.5.2. Factores de virulencia

Posee una capsula polisacárida, que confiere protección contra la fagocitosis y la destrucción de los polimorfos nucleares.

Poseen gran variedad de enzimas que sirven como factores de virulencia como son: lecitinasa, colagenasa, heparinasa, hialuronidasa, gelatinasa, fibrinolisisina, enzimas proteolíticas como lecitinasa, lipasa, condroitin-sulfatasa, desoxirribonucleasa, fosfatasa, neuroamidasa, elastasas, enzimas protectoras de oxígeno como la superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa^{5, 8, 9, 11.}

3.5.3. Etiopatogenia

Se encuentra en la gingivitis ulcerativa necrosante aguda y en ciertas formas de periodontitis. Poseen diversos factores de virulencia como proteasa para

inmunoglobulinas, fimbrias de agregación y congregación, síntesis de metabolitos tóxicos que causan muerte celular al contacto, lipopolisacáridos.^{1, 11, 12.}

3.6 *Porphyromonas gingivalis*

Microorganismo en forma de cocos o bacilos cortos (cocobacilos), Pertenece al grupo de “bacteroides de pigmentación negra o verde oscuro o bacteroides melaninogenicus, Gram negativo, anaerobio estricto, inmóvil, asacrolítico, fimbrias (esencial para la unión a las células del huésped) colagenasas, desoxirribonucleasas, fosfolipidasas, proteasas o gingipainas (arginina-cisteína gingipaina y lisina-cisteína gingipaina que contribuyen a la hidrólisis de proteínas y hemoglobina; así como la acumulación de hemina) anti- IgA e IgG, heparina, hialuronidasa, cápsula, hemolisinas, hemaglutinina, lipopolisacáridos, proteínas de la membrana externa, endotoxinas y ácidos grasos.

Prueba de CAAM (NCBZ-GLY-GLY-ARG-clorhidrato de 7-amido-4-metil coumarina, para la detección de una enzima tipo tripsina) positiva, prueba de fluorescencia a la luz UV negativa, crecimiento en bilis negativo, sensible a la vancomicina.^{8, 9, 10, 13.}

Las colonias de *Porphyromonas gingivalis*, al crecer sobre agar sangre, son redondas, convexas, brillantes y lisas, blanquecinas al inicio para luego tornarse crema (Fig. 5). Después de 4 a 8 días las colonias oscurecen tomando un color rojo profundo, verdoso o negro desde su borde hasta el centro.

Es poco común en personas sanas, aunque pudiera estar en cantidades escasas en sujetos sanos y con gingivitis.^{8, 9, 10, 11, 13.}



Figura 6. Colonias de *Porphyromonas gingivalis* sobre Agar Sangre Hemina-Menadiona.¹⁴

3.6.1. Nutrición

Posee una exigencia obligada de hierro para desarrollarse, al ocurrir una falta de hierro en el sistema de poros de la bacteria (sideroporos, los cuales quelan la hemina), utiliza la hemina (hierro protoporfirina IX).

La hemina acumulada en la membrana extracelular actúa como receptor del oxígeno, promoviendo un micro ambiente anaerobio y contribuyendo el color verde, pardo u oscuro de las colonias.

Requiere de ambientes con sustratos abundantes de nitrógeno (péptidos y aminoácidos), baja tensión de oxígeno.^{8, 9, 10.}

Se cultiva en:

- Agar sangre con suplemento de vitamina K y hemina en anaerobiosis.
- Agar brucella base suplementado con sangre desfibrinada de carnero, hemina y menadiona.
- Agar columbia base hemina, menadiona, sulfato de colistina, ácido nalixídico, bacitracina, sangre desfibrinada de carnero.
- Agar brucella base, con extracto de levadura, L-cisteína, hemina, menadiona en anaerobiosis.
- Agra soya tripticasa con 5% de sangre de cordero desfibrinada en anaerobiosis y extracto de levadura.

3.6.2. Factores de virulencia.

El LPS induce la producción de IL-6 e IL-8 desde fibroblastos del ligamento periodontal en humanos, también posee un gran número de enzimas proteinasas y productos finales de su metabolismo activos contra un amplio espectro de proteínas.

La actividad enzimática de *Porphyromonas gingivalis* se relaciona con la cisteína, proveyendo ventajas metabólicas, como la capacidad de utilizar proteínas largas del hospedero, para su desarrollo y crecimiento.

Otra causa importante de virulencia es la gran cantidad de enzimas hidrolíticas, proteolíticas y lipolíticas capaces de hidrolizar péptidos unidos.

Dentro de las proteinasas se consideran a las colagenasas y a las aminopéptidasas importantes en la patogénesis de la bacteria. Existen

proteinasas críticas específicas como la arginina y lisina proteinasas, producidas por *Porphyromonas gingivalis*, y que reciben el nombre de gingipainas, estas son un potente regulador de la permeabilidad vascular, siendo capaces de inducir la permeabilidad vascular en plasma humano y unirse directamente a bradiquininas, se consideran quimiotácticas para Polimorfo nucleares (PMN).

La arg-gingipaina inactiva especies de oxígeno reactivas producidas por los PMN, primordial mecanismo de protección del hospedero. Otras proteinasas que protegen a la *Porphyromonas gingivalis* de las defensas del albergador son las proteinasas inmunoglobulinas como IgA1, IgA2 e IgG.

Las proteinasas caseinolíticas son capaces de degradar el colágeno tipo I y IV, IgG humana, fibronectina, complemento (C3, C4, C5 y C5a) e inhibir la actividad bactericida de los PMN.

Algunas proteínas expresadas en la superficie bacteriana conocidas como hemaglutininas, promueven la colonización por unión de bacterias a receptores (usualmente a oligosacáridos) de células humanas. Se consideran que son al menos cinco tipos de hemaglutininas que expresa *Porphyromonas gingivalis*^{8, 9, 10}.

3.6.3. Etiopatogenia.

Porphyromonas gingivalis predomina en la periodontitis, participa en la formación del saco periodontal, la destrucción del tejido conectivo la resorción del hueso alveolar a través de mecanismo directos e indirectos. Se presenta en enfermedad periodontal destructiva. Induce respuestas inmunitarias elevadas generales y locales en diversos tipos de periodontitis.^{8, 9, 10}.

3.7. Método de ácido sulfúrico y fenol

Las bacterias poseen gran número de carbohidratos diferentes: azúcares libres, derivados de azúcares, polisacáridos simples (polímeros de azúcares) y polisacáridos complejos (polímeros de azúcares diferentes, aminoazúcares, ácidos urónicos, etc). Algunas macromoléculas contienen además componentes no glucídicos (lipopolisacáridos, peptidoglucanos, ácidos teicoicos, ácidos nucleicos, glucoproteínas, etc).

Ningún método permite la determinación de todos los azúcares presentes en bacterias, ya que diferentes glúcidos generan diferente intensidad de color a una cierta longitud de onda, sin embargo los métodos de antrona, ácido sulfúrico y fenol son los más utilizados por su simplicidad, rapidez y baja interferencia con otros componentes celulares, lo cual los convierte en los métodos de elección para la determinación de un índice confiable de “carbohidratos totales”, se basa en la reacción colorida producida por la condensación de los productos de degradación de los azúcares (despolimerización, ciclación y deshidratación), obtenidas por el tratamiento de ácidos minerales fuertes (HCL, H₂SO₄, H₃PO₄) con diversos reactivos orgánicos.¹⁵

3.8. Tamices moleculares (cromatografía en columna)

La cromatografía de exclusión o filtración en gel es una clase de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de compuestos en función de su tamaño molecular, en este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un gel, que se introduce en una columna como soporte cromatográfico.

El gel está constituido por partículas esféricas homogéneas que tienen poros de un determinado tamaño. Las moléculas difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retenidas en su paso por la columna y se retarda su elución, las moléculas grandes no entran en los poros de las partículas del gel y por ello eluyen rápidamente en lo que se denomina “volumen de exclusión” de la columna; se dice que son excluidas del gel, de esta forma, las moléculas se separan en función de su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular. En esta técnica, se definen los siguientes parámetros:

- El intervalo de fraccionamiento de un tipo de gel es el comprendido entre los valores extremos (máximo y mínimo) de pesos moleculares, para los cuales el gel tiene capacidad de separar distintas sustancias.
- El volumen de elusión es el volumen que debe pasar a través de la columna para eluir un compuesto.
- El volumen de exclusión de la columna es el volumen en el que eluyen las moléculas de tamaño superior al intervalo de fraccionamiento del gel, corresponde al volumen total de los huecos entre las partículas del gel.

Un gel es una red tridimensional cuya estructura está entrecruzada al azar, los geles utilizados como tamiz molecular son polímeros hidrofílicos e insolubles cuyas cadenas poliméricas se entrecruzan hasta formar una red tridimensional. Los geles normalmente utilizados son de tres tipos:

- Dextrano
- Agarosa
- Poliacrilamida.

El gel de dextrano (polímero ramificado de glucosa, entrecruzado y formado en pequeñas bolitas) se comercializa con el nombre de SEPHADEX; existen distintos tipos, según el tamaño de poro, proporcionando límites de exclusión comprendidos entre 1 y 200,000 Dalton. Estos geles se identifican por una denominación de G-10 hasta G-200, índice que se refiere a la capacidad de retención de agua del gel multiplicada por 10.¹⁵

3.9. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).

La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay), como todo ensayo inmunoenzimático, la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos.

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática; al estar uno de los componentes (antígeno o

anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato (cromógeno) específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro, este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, utiliza reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc.

La fase sólida debe ser de un tipo que permita un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y la reproducibilidad de la unión de antígenos o anticuerpos sobre su superficie.

En la actualidad la técnica se lleva a cabo en micro placas de poliestireno, material ideal debido a que su estructura química lo hace un material naturalmente hidrofóbico, lo que permite la adsorción pasiva de un gran número de biomoléculas, el poliestireno puede ser fácilmente modificado para aumentar sus propiedades hidrofóbicas, se ha encontrado que un método fácilmente aplicable es su exposición a la luz UV.

Las placas de 96 pocillos y un volumen de 350µL son especialmente favorables para procesar un elevado número de muestras y una vez tapizadas, el material inmobilizado permanece reactivo mucho tiempo siempre que se mantenga seco y a baja temperatura.^{16, 17, 18.}

3.10. ELISA ligado a polimixina

El ELISA ligado a polimixina se ofrece como método de detección por utilizar polimixina B que adhiere eficazmente a los lipopolisacáridos presentes en las membranas de las células bacterianas Gram.negativas¹⁹, a demás de utilizar anticuerpos específicos, traducándose en un procedimiento sensible y capaz de estandarizarse.

Esta técnica es una modificación del ELISA directo, en donde en lugar de utilizar un anticuerpo específico fijado al soporte (la placa de poliestireno irradiada con UV), se utiliza polimixina que adhiere eficazmente a los LPS de manera inespecífica presentes en la muestra; después de realizar los respectivos lavados, se adiciona el anticuerpo específico (IgM-Anti LPS) generado para el agente que se pretende identificar, los anticuerpos específicos incorporados a la peróxidasa se unirán sólo al LPS de interés, sin importar que otros LPS se hayan unido a la placa, una vez hechos lo lavados, se adiciona el sustrato y cromógeno que al actuar, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.^{20 21}

4. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La periodontitis y la gingivitis son padecimientos que ocasionan pérdida de piezas dentales en la población del mundo. *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*; tienen relevancia por encontrarse dentro de los tres primeros tipos de bacterias involucradas en la enfermedad periodontal en adultos. Los microorganismos antes mencionados poseen características que hacen difícil su identificación por métodos convencionales (cultivo, pruebas bioquímicas, tinciones, etc.).

En México no hay datos sobre el perfil de prevalencia de estos agentes, tampoco exámenes como tales para la identificación de los agentes responsables de la enfermedad periodontal, ni laboratorios que ofrezcan ensayos para identificación a estos agentes. Encontrando este problema, el siguiente trabajo tiene como objeto estandarizar una técnica sensible y eficaz, que nos permita detectar a los agentes responsables.

5. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de ELISA Polimixina para la identificación de LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* en muestras tomadas de bolsas periondentales humanas.

5.1. Objetivos específicos

- Obtención, purificación y cuantificación del LPS bacteriano de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*.
- Obtención de antígeno "O" e inmunización de un conejo Nueva Zelanda.
- Obtención y purificación de IgM anti-LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromona gingivalis*.
- Determinar el título del anticuerpo mediante aglutinación activa.
- Elaboración de los conjugados anti-LPS.
- Determinar el título del conjugado anti-LPS mediante la técnica ELISA ligado a polimixina, realizando un tablero de ajedrez.
- Probar el ELISA ligado a Polimixina para detectar *Prevotella intermedia* y *Porphyromona gingivalis* en la población de estudio.

6. HIPÓTESIS

La periodontitis y la gingivitis son padecimientos relacionados con la presencia de *Prevotella intermedia* y *Pophyromonas gingivalis*, estos microorganismos poseen lipopolisacáridos específicos que activan la respuesta inmune celular y humoral con el fin de destruirlos, causando en este proceso daños prominentes en la zona afectada; el LPS genera anticuerpos de tipo IgM específicos; si la polimixina B adhiere eficazmente a los lipopolisacáridos presentes en las membranas de las células bacterianas Gram negativas, entonces será posible desarrollar un método estandarizado de ELISA ligado a polimixina, que fije eficazmente a los lipopolisacáridos de *Prevotella intermedia* y *Pophyromonas gingivalis* permitiendo identificarlos con sus correspondientes anticuerpos conjugados específicos contra dichos LPS en muestras de bolsas periodontales.

7- DISEÑO METODOLÓGICO

Población en estudio

Muestras obtenidas de individuos de edades entre 20 y 70 años, con enfermedad periodontal, provenientes de los servicios que ofrecen las clínicas de endoperio (endodoncia-periodoncia) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Criterios de inclusión

Muestras periodontales de pacientes entre 20 a 70 años, con diagnóstico de enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis), sin tratamiento de antibióticos previo (mínimo un mes antes) a la toma del espécimen.

Criterios de exclusión

Muestras periodontales de pacientes con edad de 0 a 20 años y mayores de 70 años, que padezcan enfermedad periodontal, o bien paciente con periodontitis con tratamiento antibiótico previo a la toma de muestra.

Tipo de estudio

Transversal, observacional, prospectivo.

Variables involucradas en el estudio**Variable dependiente:**

- Edad de los pacientes donantes de la muestra.
- Concentración del Antígeno (LPS) presente en las muestras.

Variables independientes:

- Sexo de los pacientes donantes de muestra periodontal.
- Clínica de la cual proceden las muestras periodontales.

8. MATERIAL

Material biológico

- Cepa de Prevotella intermedia ATCC 25611.
- Cepa de Porphyromonas gingivalis ATCC 33277.
- Sangre desfibrinada de carnero.
- Conejo Nueva Zelanda (NZW)
- Muestras periodontales

Equipo

- Incubadora, UL Listed
- Olla de presión presto 21Lt.
- Espectrofotómetro UV/Visible, Jenway 6305-
- Lector de ELISA, Awareness Technology Inc.
- Lámpara UV, UVP, Inc.
- Refrigerador, Whirpool-
- Vortex, Scientific Industries Inc.
- Centrifuga, Damon Iec Division.
- Balanza granataria, Ohaus.
- Balanza analítica, Ohaus.

Material de vidrio

- Matraz Erlenmeyer de 2000 mL, 1000 mL, 500 mL, 250 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL y 10 mL, Kimax y Pyrex.
- Pipetas graduadas de 10 mL, 5 mL, 1mL y 0.1 mL Kimax,
- Probetas de 100 mL, 50 mL, 10 mL kimax.
- Termómetro con escala de -10 a 150° C.
- Tubos de ensayo de 13X100 Pyrex.
- Tubos de ensayo de 18X150 Pyrex.
- Portaobjetos cornig.
- Cubreobjetos cornig.
- Desecador de vidrio Vakuumfest.

Medios de cultivo

- Agar-Agar, Dibico
- Agar soya tripticaseína, Bioxon
- Extracto de levadura, Bioxon

Reactivos

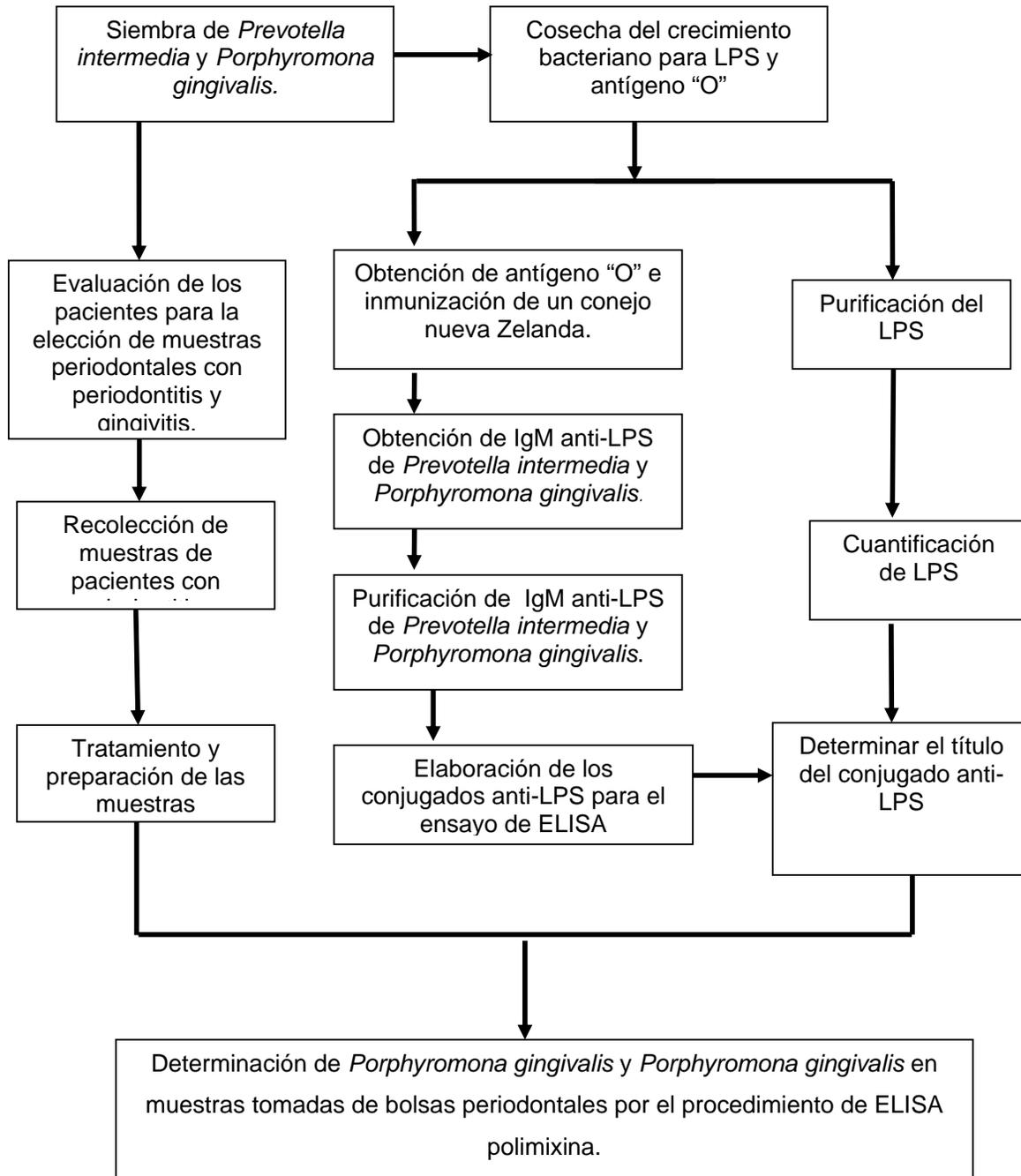
- Agua destilada
- Acetona J.T. Baker
- Acido cítrico J.T. Baker.
- Acido sulfúrico J.T. Baker.
- Albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich.
- Alcohol etílico, J.T. Baker.
- Azul brillante R, Sigma.
- Bicarbonato de sodio, Hycel de México.
- Carbonato de sodio, Hycel de México.
- Cloruro de potasio, Técnica química S.A.
- Cloruro de sodio, Hycel de México.
- Colato de sodio, Sigma-Aldrich.
- Cristal violeta, Sigma chemical Co.
- Dextrosa anhidra, Hycel de México.
- Fenol, Hycel de México.
- Formaldehído, Hycel de México.
- Fosfato de potasio monobásico, Hycel de México.
- Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado, Hycel de México.
- Glicerol, Sigma-Aldrich.
- Glutaraldehído, Sigma-Aldrich.
- Hemina, Sigma-Aldrich.
- Hidróxido de sodio, J.T. Baker.
- L-Lisina, Hycel de México.
- Lugol, Hycel de México.
- Menadiona, Sigma-Aldrich.
- Ortofenilendiamina, Sigma de México, S.A. de C.V.
- Peróxidasa de rábano, Sigma de México, S.A. de C.V.
- Peróxido de hidrógeno 30 v/v, Sigma de México, S.A. de C.V.

- Safranina, Sigma de México, S.A. de C.V.
- Solución Salina 0.85%, Delmed
- Fosfato de potasio monobásico, Técnica Química S.A.
- Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado, J.T. Baker
- Cloruro de potasio, Técnica Química S.A.
- Safranina, Sigma de México, S.A. de C.V.
- Sulfato de polimixina, Laboratorios Sophia S.A. de C.V.
- Tween 20, técnica química S.A.
- Timerosal, Sigma de México.

Otros

- Asa microbiológica
- Asa micológica
- Algodón.
- benzal
- Cajas Petri estéril de plástico de 100 X 15 mm, SYM laboratorios.
- Cámara de anaerobiosis.
- Columna de 1 X 50 cm, Dialysis tubing Sigma.
- Gasas.
- Encendedor.
- con una solución de hipoclorito de sodio y Jeringas estériles de 1 mL, 5 mL, 10 mL y 20 mL.
- Membrana de celulosa de 21 X 33 mm 1200 Daltons.
- Mecheros Fisher.
- Parafilm M 4 pulgadas,
- Pipetas semiautomáticas de 5 a 40 μ L Finnpiquette, 40 a 200 μ L Labssystem y 100 a 1000 μ L Proline.
- Película antiadherente, Kleen pack.
- Pinzas de tres dedos con nuez.
- Placa de microtitulación para ELISA.
- Shephadex G200,
- Soporte universal.
- Tabletas efervescentes.
- Velas.

8. DIAGRAMA DE FLUJO



10. MÉTODO

10.1. Mantenimiento de las cepas

Realizar la siembra de las cepas en agar soya tripticasa enriquecido con hemina y menadiona en cajas Petri, incubar durante 7 días en condiciones de anaerobiosis a 36° C.

Nota: La concentración requerida final de hemina en el medio es de 5 µg /mL. Concentración de menadiona (vitamina K) final requerida en el medio es de 1 µg /mL

10.2. Preparación del medio de cultivo.

Preparar 500 mL de agar soya tripticasa enriquecido con extracto de levadura, suero de carnero al 10% o sangre de carnero al 5%, hemina 5 µg /mL, menadiona 1 µg /mL. (ASTHM).

Preparación

Pesar 20 g de agar soya tripticasa, 2.5 extracto de levadura y 2.5 agar agar, disolver en 500 mL de agua destilada, añadir 2.5 mL de una solución madre de hemina, esterilizar a 121° C / 15 lb/ in³ por 15 minutos en autoclave. Preparar el área de siembra con dos mecheros Fisher, sanitizar la mesa de trabajo.

Dejar enfriar a 50° C el medio de cultivo, añadir en condiciones estériles 25 mL de sangre de carnero estéril y desfibrinada, agregar a través de un filtro estéril 0.3 mL de la solución de menadiona al medio, mezclar y dispensar 30 mL de medio en cajas Petri estériles de plástico, eliminar las burbujas de aire pasando la flama del mechero sobre la superficie del agar, cerrar las cajas y esperar que solidifiquen.

Con fines de control de calidad incubar una de las cajas a 36° C por 24 horas, sembrar, observar si existen contaminaciones (crecimiento) que afecten la siembra de las bacterias de interés, sembrar una vez verificado el medio de cultivo.

10.3. Siembra de las cepas

Preparar el área de siembra con dos mecheros Fisher, sanitizar la mesa de trabajo. Etiquetar dos cajas para cada cepa a sembrar, realizar una siembra masiva en las placas de agar ASTHM, incubar a 37° C en condiciones de

anaerobiosis generada con 4 tabletas efervescentes y una vela, en jarra de anaerobiosis o en desecador. Esperar de 5 a 7 días.

Al cabo de 7 días revisar el crecimiento, realizar tinción de Gram al crecimiento bacteriano de cada caja para verificar la pureza de la siembra y el Gram de los microorganismos.

10.4. Resiembra de las cepas

Realizar tinción de Gram al crecimiento bacteriano de cada caja para verificar la pureza de la siembra y el Gram de los microorganismos. Una vez verificado el Gram y la morfología colonial, sembrar en masivo 5 cajas Petri de ASTHM (agar sangre soya tripticasa enriquecido con hemina y menadiona) y dos por estría en 4 cuadrantes con el fin de aislar colonias, para cada una de las cepas a trabajar, incubar a 35° C en condiciones de anaerobiosis de 5 a 7 días. Realizar tinción de Gram para verificar la pureza de la siembra y el Gram de los microorganismos.

10.5. Cosecha del crecimiento bacteriano²²

Realizar tinción de Gram al crecimiento obtenido en las cajas inoculadas en masivo y las cajas donde se aislaron colonias.

Cosechar el crecimiento masivo de cada caja, tomar 5 mL de solución salina fisiológica (SSF) con una jeringa estéril de 5 mL, verte sobre la superficie de la caja y despegar cuidadosamente el crecimiento ayudándonos con una asa, una vez obtenida una suspensión aspirar con la misma jeringa y coleccionar dentro de un tubo de centrifugación de 50 mL marca Nalgene.

Realizar la misma operación dos veces más con 5 mL de SSF hasta levantar la mayor cantidad de biomasa posible de la placa.

Verter el líquido de cada lavado en tubos tipo Nalgene. Calibrar los tubos por pesadas con otro tubo y centrifugar a 6000 rpm por 1 hora para eliminar el medio de cultivo.

Decantar el sobrenadante en un bote con benzal o hipoclorito de sodio, resuspender el botón en 5 mL de solución salina, agregar 10 mL más de solución salina y centrifugar a 6000rpm por 1 hora, repetir la operación por lo menos cuatro veces, decantar por completo el último lavado, tapar con parafilm los tubos y refrigerar.

Nota realizar la operación para cada una de las cepas a trabajar.

10.6. Preparación del LPS para la prueba de aglutinación activa²²

Medir 2 mL de solución SSF en un tubo de 13 X 100 con tapa. Tomar una asada del botón bacteriano reservado en el refrigerador.

Ajustar los 2 mL de solución salina fisiológica (SSF) al tubo número 3 del nefelómetro de McFarland. Colocar el tubo etiquetado sin tapar, con la suspensión bacteriana ajustada, en un baño de agua en ebullición por 120 minutos, sin cerrar el tubo, retirar el tubo después de 120 minutos, enfriar a temperatura ambiente y agregar formaldehído para obtener una concentración de 0.3% de formaldehído.

Tapar el tubo y mezclar, abrir y agregar una pizca de azul brillante con el asa micrológica, homogenizar, reservar en refrigeración hasta su uso.

Nota realizar la operación para cada una de las cepas a trabajar.

10.7. Extracción y purificación del LPS²³

Resuspender el botón celular obtenido en la cosecha. Con 2 mL de PBS (buffer de fosfatos), agitar con vortex, transferir la suspensión bacteriana a un tubo de 18X150 con tapa limpia y etiquetada con el nombre de la cepa que será trabajada.

Lavar con 3 mL más de PBS el tubo donde se reservo el botón, con el fin de recuperar la mayor parte de células bacterianas.

Preparar una solución acuosa de fenol (9:1).agregar 3 mL de la solución acuosa de fenol por cada 5 mL de suspensión bacteriana. Tapar el tubo, agitar en vortex hasta homogenizar y refrigerar 24 horas.

Pasadas las 24 horas, agitar el tubo de la suspensión bacteriana con fenol. Introducirlo en un baño de agua a 70° C por 90 minutos.

Dejar enfriar a temperatura ambiente, transferir el contenido del tubo de 18 X 150 a un tubo de centrífuga Nalgene, tapar con parafilm, calibrar el tubo por pesadas con otro tubo y centrifugar 3 000 rpm por 30 minutos.

Separar la fase acuosa (superior) de la fase fenólica (inferior) y la interfase (capa intermedia), reservar en un tubo limpio etiquetar con fracción acuosa con el nombre de la cepa que será trabajada.

Realizar una segunda extracción de la fase fenólica e interfase con 3 ml de PBS, homogenizar agitando y transferir a un tubo de 18 X 150 con tapa.

Llevar el tubo a un baño de agua a 70° C por 60 minutos. Dejar enfriar el contenido del tubo a temperatura ambiente y transferir a un tubo para centrifuga Nalgene, calibrar el tubo por pesadas con otro tubo, tapar con parafilm y centrifugar 3000 rpm por 30 min.

Separar la fase acuosa (superior) de la fase fenólica (inferior) y la interfase (capa intermedia). Reservar en el tubo asignado para colectar la fase acuosa de interés.

Realizar una tercera extracción de la fase fenólica e interfase con 3 mL de PBS, homogenizar agitando y transferir a un tubo de 18 X 150 con tapa.

Llevar el tubo a un baño de agua a 70° C por 30 minutos. Dejar enfriar el contenido del tubo a temperatura ambiente y transferir a un tubo para centrifuga Nalgene, calibrar el tubo por pesadas con otro tubo, tapar con parafilm y centrifugar 3000 rpm por 30 min. Separar la fase acuosa (superior) de la fase fenólica (inferior) y la interfase (capa intermedia), reservar en el tubo asignado para colectar la fase acuosa de interés. Cerrar el tubo con las fases acuosas acumuladas, transferir la fase acuosa a una membrana de celulosa, que sellada de un lado con un nudo y atado con una liga, atar el extremo abierto con un nudo y amarrar con un trozo de liga para evitar que el líquido dentro de la membrana salga.

Sujetar con un hilo de algodón de 50 cm de largo un contrapeso y un extremo de la membrana, sumergir en 2 litro de PBS (dialisar). Cambiar el PBS cada 24 horas durante 3 días.

Habiendo pasado los 3 días de diálisis, drenar el PBS, colocar sobre una caja de Petri estéril desechable la membrana de celulosa que contiene el LPS y transferir con cuidado en un tubo limpio con tapa, bien etiquetado. Refrigerar hasta su uso.

Nota realizar la operación para cada una de las cepas a trabajar.

10.8. Cuantificación de LPS por el método de fenol-ácido sulfúrico¹⁵

Realizar una curva patrón empleando el método de fenol-ácido sulfúrico para azúcares reductores.

Pesar 0.01g de dextrosa anhidra, llevar 100 mL con agua destilada en un matraz aforado. Esta solución es el estándar con una concentración final de 0.1 mg/mL.

Realizar una curva patrón con una serie de 10 tubos más un blanco. Como a continuación se indica.

# de tubo	Std de dextrosa (mL)	agua destilada (mL)	fenol al 80% (mL)	H ₂ SO ₄ conc. (mL)
Blanco	0.0	1.0	0.1	5.0
1	0.1	0.9	0.1	5.0
2	0.2	0.8	0.1	5.0
3	0.3	0.7	0.1	5.0
4	0.4	0.6	0.1	5.0
5	0.5	0.5	0.1	5.0
6	0.6	0.4	0.1	5.0
7	0.7	0.3	0.1	5.0
8	0.8	0.2	0.1	5.0
9	0.9	0.1	0.1	5.0
10	1.0	0.0	0.1	5.0

Reposar de 20 a 30 minutos y leer a 490 nm

Cuadro 1. Curva patrón de azúcares reductores, concentración del estándar 100 µg/ mL de dextrosa anhidra.

Realizar diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 del LPS purificado en agua destilada-

Dilución	mL de la dilución	fenol al 80% (mL)	H ₂ SO ₄ conc. (mL)
1:10	2.0	0.1	5.0
1:50	2.0	0.1	5.0
1:100	2.0	0.1	5.0

Reposar de 20 a 30 minutos y leer a 490 nm

Cuadro 2. Tratamiento para las muestras de LPS.

Nota realizar la operación para cada una de las cepas a trabajar.

10.9. Preparación del antígeno “O” (LPS) para la inmunización²²

Tomar con una jeringa estéril de 2 mL solución salina al 0.85%, verter sobre una caja Petri previamente inoculada con la cepa de interés, despegar cuidadosamente el crecimiento ayudándonos con la aguja de la jeringa, una vez obtenida la suspensión aspirar con la misma jeringa, etiquetar un tubo, colocar 2 mL de solución salina estéril y agregar gota a gota la suspensión bacteriana correspondiente hasta igualar al tubo 1 del nefelómetro de McFarland (3.00×10^8 bacterias / mL), llevar a baño María los tubos debidamente identificados hasta ebullición y dejarlos por 2 horas, transcurrido este tiempo enfriar a temperatura ambiente y refrigerar hasta su uso.

Nota: Realizar el procedimiento para cada una de las cepas a trabajar.

10.10. Inmunización

Inmunización de conejo de raza Nueva Zelanda Blanco (NZB) con un peso de 2,800 g por vía intravenosa.

Utilizar dos conejos Nueva Zelanda Blanco (NZB), Marcar realizando muescas en las orejas de los conejos para su identificación e inmunización con la cepa de interés.

Inocular utilizando los tubos ajustados al tubo 1 del nefelómetro de McFarland reservados en el refrigerador, como se indica en el siguiente esquema de inmunización (cuadro 3):

Día	Volumen (mL)
0	0.25
3	0.25
7	0.3
10	0.3
16	sangrar

Cuadro 3. Esquema de inmunización del conejo.

Nota: Realizar el procedimiento para cada una de las cepas a trabajar.

10.11. Obtención de la sangre de conejo inmunizado

Anestesiarse al conejo utilizando éter. Obtener sangre por punción cardiaca en la fecha programada de la inmunización. Rasurar la zona a puncionar y sanitizar con alcohol yodo 2%, puncionar con jeringas estériles desechables de 20 mL.

La sangre obtenida se colecta en tubos estériles junto al mechero, se deja coagular. Separar el suero en tubos limpios y etiquetados.

Nota: Realizar el procedimiento para cada una de las cepas a trabajar.

10.12. Purificación de la IgM anti-LPS²⁴

Pesar 17 g de peso seco de Sephadex G-200 en un litro de agua destilada, hervir por 5 horas, esto provee suficiente gel para una columna de 1 cm de diámetro por 50 cm de altura. Enfriar el gel a temperatura ambiente y desgasificar usando una bomba de vacío.

Colocar la columna en posición vertical sobre un soporte universal sujeta con dos pinzas de tres dedos con nuez, agregar la mitad de amortiguador de fosfatos (PBS) y después adicione con agitación el Sephadex hasta llenar la columna. Abrir la válvula.

Calcular el volumen vacío utilizando dextran azul disuelto en 1 mL de agua destilada, esperar hasta la obtención del colorante en el volumen que sale de la columna.

Pasar el suero de conejo anti LPS (IgM) y eluir con amortiguador de fosfato a 0.1M a pH 6.8 (PBS), tomando fracciones de 3 mL, se aconseja tomar hasta 12 fracciones.

El primer pico contiene IgM, α -2 macroglobulina y algunas lipoproteínas, los complejos de hemoglobina–haptoglobina a veces están presentes y son detectables fácilmente por un color rojizo.

- Preparar las soluciones buffer de trabajo el día en que serán utilizadas.

Nota: Realizar el procedimiento para cada una de las cepas a trabajar.

10.13. Determinar el título del anticuerpo mediante aglutinación activa

Realizar aglutinación del antígeno "O" de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* contra la su respectiva IgM anti-LPS sobre una placa de vidrio y mezclar con aplicador de madera, agitar por 30 segundos para verificar la potencia del anticuerpo.

Reacción de aglutinación activa con antígeno "O" (LPS) y anticuerpos (IgM)

Correspondencia de Vol.	Vol. de Suero o conjugado	Antígeno "O" (LPS)
1:20	80 µL	Una gota
1:40	40 µL	Una gota
1:80	20 µL	Una gota
1:160	10 µL	Una gota
1:320	5 µL	Una gota

Cuadro 4. Procedimiento para la elaboración de la aglutinación activa en placa.

En caso de ser positivo en todas las concentraciones, realizar diluciones 1/10, 1/20, 1/40, etc, con PBS del suero o conjugado y efectuar nuevamente la prueba con los mismos volúmenes.

Utilizar el antígeno y el anticuerpo a temperatura ambiente para observar notoriamente la aglutinación.

Nota: Realizar el procedimiento para cada una de las cepas a trabajar.

10.14. Preparación del conjugado²³

Disolver 10 mg de peroxidasa de rábano en 200 µL de buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8 que contenga 1.25% de glutaraldehído, dejar 18 horas a temperatura ambiente.

Eliminar el glutaraldehído con una membrana G12000 Daltons, dialisar estabilizando con PBS.

Concentrar a 1 mL y adicionar 1 mL de IgM en salina y 0.1 mL de buffer de bicarbonato de sodio 1M pH 9.5.

Agitar suavemente y dejar 24 horas a 4° C, adicionar 0.1 mL de lisina 0.2M. Dejar 2 horas a temperatura ambiente y dializar contra PBS a 4° C por 2 días.

El conjugado se separa de la peroxidasa libre por diálisis contra agua destilada durante 24 horas. Dializar extraer de la membrana de diálisis la solución que contiene el conjugado, verter dentro de un tubo limpio y centrifugar 3000 rpm por 15 minutos.

Decantar el sobrenadante y redissolver en PBS con 0.01% de timerozal o formalina el precipitado obtenido (conjugado obtenido como precipitado).

Reservar el sobrenadante en un tubo etiquetado y agregar timerozal o formalina al 0.01% (conjugado obtenido en el sobrenadante).

Nota: Realizar el procedimiento para cada una de las cepas a trabajar.

10.15. Obtención del título del conjugado para ELISA

Disolver 1 mg en 20 mL de Sulfato de polimixina B en PBS (amortiguador de fosfatos 0.01M con 0.85% de cloruro de sodio) para obtener una concentración final de 50 µg/ mL. Colocar 100 µL en cada de pozo de una placa de ELISA irradiada con UV por 1h²⁵, incubar a 37° C por una hora la placa, lavar 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05% y colocar 200 µL de bloqueador en cada uno de los pozos, incubar a 37° C durante 30 minutos, lavar 4 veces y adicionar 100 µL por pozo de cada una de las diluciones de LPS, cubrir la placa e incubar a 37° C por 30 minutos.

Lavar los pozos con PBS-tween al 0.05%. Colocar 100 µL en cada pozo de cada una de las diluciones del conjugado, cubrir la placa e incubar a 37° C por 30 minutos.

Lavar los pozos con PBS-tween al 0.05%. Colocar 100 µL por pozo del sustrato y el cromógeno en cada pozo, cubrir la placa e incubar a 37° C 15 a 30 minutos. Leer la placa en un lector de ELISA Awareness Technology INC, a 450 nm.

Realizar la gráfica Ab Vs log de dilución del conjugado, reportar la dilución de LPS y conjugado con la mejor respuesta.

Se colocan muestras negativas y con la siguiente fórmula se calcula el corte (cut off). Corte = Media de los valores negativos + 2 desviaciones estándar de la media. De tal manera que todo valor que este por arriba será considerado positivo y lo que sea igual o menor al valor de corte será negativo. Aquellas muestras positivas que estén cercanas al valor de corte se repetirán^{20, 21}.

Nota: Realizar la operación para cada una de las cepas a trabajar.

10.16. Toma de muestra

Para la evaluación, selección y toma de muestras se conto con el apoyo del Dr. Eduardo Llamosas director de la clínica de endoperio y de sus equipo de trabajo, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Colocar una punta de papel filtro número 70 sobre la bolsa en el periodonto afectado por 10 a 15 segundos, retirar la punta y colocarla en un tubo estéril etiquetado con el nombre del paciente, fecha de la toma y numero asignado. Guardar las muestras en refrigeración a 4° C, hasta su uso.

10.17. Preparación de las muestras para ELISA

Tomar 450 µL de muestra y agregar 50 µL de colato de sodio al 5 %, calentar por 10 minutos a 100° C. Dejar enfriar a temperatura ambiente y centrifugar a 3000rpm por 5 minutos. Separar el sobrenadante claro y reservar hasta su uso. Disolver 1 mg en 20 mL de Sulfato de polimixina B en PBS (amortiguador de fosfatos 0.01M con 0.85 % de cloruro de sodio) para obtener una concentración final de 50 µg/ mL. Colocar 100 µL en cada de pozo de una placa de ELISA irradiada con UV por 1h²⁵, incubar a 37° C, lavar 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05% y colocar 200 µL de bloqueador en cada uno de los pozos, incubar a 37° C durante 45 minutos, lavar y adicionar 100 µL de cada una las muestras biológicas tratadas en cada pozo. Cubrir la placa e incubar a 37° C por 45 minutos. Lavar los pozos con PBS-tween al 0.05%. Colocar 100 µL por pozo del sustrato y el cromógeno en cada pozo, cubrir la placa e incubar a 37° C 15 a 30 minutos. Leer la placa en un lector de ELISA Awareness Technology INC, a 450 nm^{20, 21}.

Se colocan muestras negativas y con la siguiente fórmula se calcula el corte (cut off). Corte = Media de los valores negativos + 2 desviaciones estándar de la media. De tal manera que todo valor que este por arriba será considerado positivo y lo que sea igual o menor al valor de corte será negativo. Aquellas muestras positivas que estén cercanas al valor de corte se repetirán.^{20, 21}.

Nota: Realizar la operación para cada una de las cepas a trabajar.

Resultados

Resultados de la reacción de aglutinación antígeno "O" de *Prevotella intermedia* y anticuerpos en suero

Vol.	Correspondencia de Vol.	Dilución 1:10	Dilución 1:20	Dilución 1:40	Dilución 1:80
80 µL	+++	++	+	+	-----
40 µL	+++	++	+	+	-----
20 µL	+++	++	+	-----	-----
10 µL	+++	++	+	-----	-----
5 µL	+++	++	+	-----	-----

Grado de aglutinación: +++= aglutinación abundante y definida, ++= mediana aglutinación, + = poca aglutinación. ----= sin aglutinación.

Cuadro 5. Aglutinación obtenida con el suero de conejo inmunizado y el antígeno O de *Prevotella intermedia*, obsérvese la capacidad de aglutinación que posee el anticuerpo generado aun estando en suero frente al antígeno que le dio origen.

Resultados de la reacción de aglutinación antígenos "O" de *Prevotella intermedia* y anticuerpos purificados

Vol.	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5
80 µL	+++	++	+	-----	-----
40 µL	+++	++	+	-----	-----
20 µL	+++	++	-----	-----	-----
10 µL	+++	++	-----	-----	-----
5 µL	+++	++	-----	-----	-----

Grado de aglutinación: +++= aglutinación abundante y definida, ++= mediana aglutinación, + = poca aglutinación. ----= sin aglutinación.

Cuadro 6. Aglutinación obtenida con el anticuerpo purificado (anti-LPS de *Prevotella intermedia*) y el antígeno "O" de *Prevotella intermedia*. En negritas la fracción con mayor respuesta de aglutinación frente a diversas diluciones.

Para elaborar el conjugado de *Prevotella intermedia* se escogió la fracción con mayor cantidad de IgM, hallada por una mayor aglutinación, en este caso es la fracción 1.

**Resultados de la reacción de aglutinación antígeno “O” de
Porphyromonas gingivalis y anticuerpos en suero**

Vol.	Correspondencia de Vol.	Dilución 1:10	Dilución 1:20	Dilución 1:40	Dilución 1:80
80 µL	1:20	+++	++	+	+
40 µL	1:40	+++	++	+	-----
20 µL	1:80	+++	++	+	-----
10 µL	1:160	+++	++	+	-----
5 µL	1:320	+++	++	+	-----

Grado de aglutinación: +++= aglutinación abundante y definida, ++= mediana aglutinación, += poca aglutinación. ----= sin aglutinación.

Cuadro 7. Aglutinación obtenida con el suero de conejo inmunizado y el antígeno O de *Porphyromonas gingivalis*, obsérvese la capacidad de aglutinación que posee el anticuerpo generado aun estando en suero frente al antígeno o que le dio origen.

**Resultados de la reacción de aglutinación antígeno “O” de
Porphyromonas gingivalis y anticuerpos purificados**

Vol.	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4	Fracción 5
80 µL	+++	++	+	+	-----
40 µL	+++	++	+	-----	-----
20 µL	+++	++	+	-----	-----
10 µL	+++	++	+	-----	-----
5 µL	+++	++	+	-----	-----

Grado de aglutinación: +++= aglutinación abundante y definida, ++= mediana aglutinación, += poca aglutinación. ----= sin aglutinación.

Cuadro 8. Aglutinación lograda con el anticuerpo purificado (anti-LPS de *Porphyromonas gingivalis*) y el antígeno O de *Porphyromonas gingivalis*, preste atención en la capacidad de aglutinación que poseen las primeras fracciones obtenidas de la separación de suero en fracciones con cromatografía de exclusión molecular. En negritas la fracción con mayor respuesta de aglutinación frente a diversas diluciones.

Para elaborar el conjugado de *Porphyromonas gingivalis* se escogió la fracción con mayor cantidad de IgM, hallada por una mayor aglutinación, en este caso es la fracción 1.

Curva patrón de azúcares reductores para cuantificar LPS de *Prevotella intermedia*

Para la cuantificación del LPS extraído y purificado, se realizó una curva estándar de azúcares reductores por el método de fenol ácido sulfúrico, estándar utilizado dextrosa anhidra 130 µg/mL

Tubo	Absorbancia (Ab)	Concentración en µg de dextrosa
0	0	0
1	0.153	13
2	0.334	26
3	0.382	39
4	0.497	52
5	0.633	65
6	0.642	78
7	0.786	91
8	0.779	104
9	0.887	117
10	1.049	130

Cuadro 9. Absorbancia obtenidas de la Curva patrón de azúcares reductores para *Prevotella intermedia*

Determinación de la concentración obtenida de una dilución 1:10 de LPS extraído y purificado de *Prevotella intermedia* el método de Galanos-Westphal.

Dilución	Absorbancia	Concentración	Concentración final del extracto acuoso de LPS
1/10	0.341	35 µg	700 µg/mL

Cuadro 10 Concentración obtenida de lipopolisacáridos por el método gráfico.

Dilución	Absorbancia	Concentración	Concentración final del extracto acuoso de LPS
1/10	0.341	35.41 µg	708.2 µg/mL

Cuadro 11 Concentración obtenida de lipopolisacáridos por el método lineal.

Cálculos

Ecuación de la recta $y=mx +b$

Donde:

X=concentración de LPS

y= Absorbancia

m=pendiente

b=ordenada al origen.

$$y= 0.0073x+0.0825.$$

$$X= 0.341- 0.0825/0.0073$$

x= 35.4109589 por el factor de dilución 10.

Concentración de LPS= **354.1095 µg**

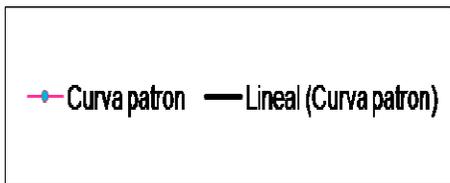
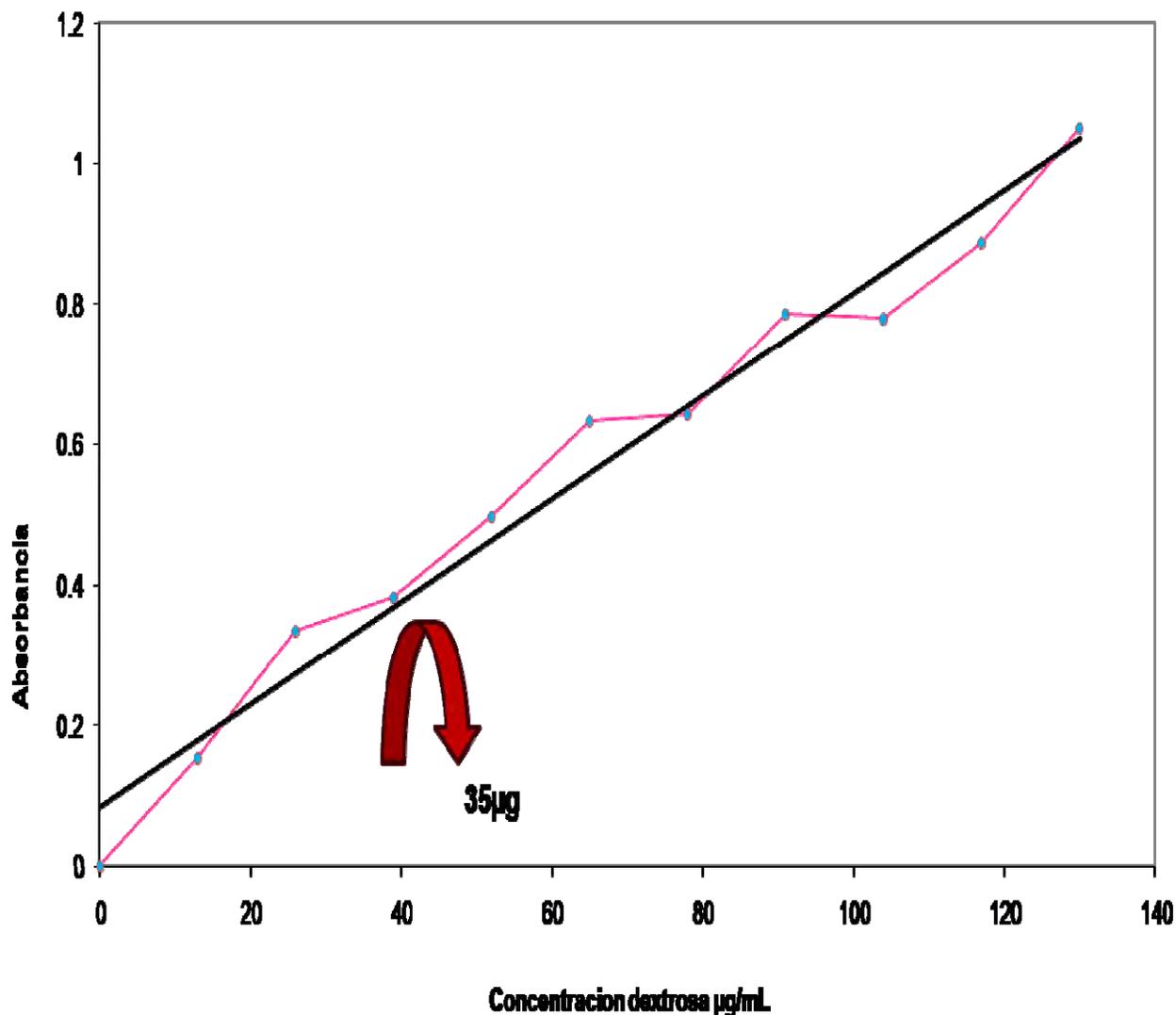
Para realizar la dilución se tomo 0.5 mL del LPS purificado para 1mL de LPS la concentración es 708.2 µg/mL.

$$0.5 \text{ mL} \dots\dots\dots 354.1095 \mu\text{g}$$

$$1\text{mL}\dots\dots\dots X.$$

$$X=708.219 \mu\text{g/mL}$$

CURVA PATRON DE DEXTROSA



$$y = 0.007x + 0.082$$
$$R^2 = 0.973$$

Grafica 1. Curva patrón de azúcares reductores método fenol ácido sulfúrico, en negro curva estándar de azúcares reductores (real), en rosa curva lineal obtenida por regresión lineal, donde se realizo la interpolación de la absorbancia obtenida de la dilución 1:10 de LPS de *Prevotella intermedia*.

**Curva patrón de azúcares reductores para cuantificar LPS de
*Porphyromonas gingivalis***

Para la cuantificación del LPS extraído y purificado, se realizó una curva estándar de azúcares reductores por el método de fenol ácido sulfúrico, estándar utilizado dextrosa anhidra 120 µg/mL.

Tubo	Absorbancia (Ab)	Concentración en µg de dextrosa
0	0	0
1	0.114	12
2	0.126	24
3	0.168	36
4	0.302	48
5	0.329	60
6	0.364	72

Cuadro12 .Absorbancia obtenidas de la Curva patrón de azúcares reductores para
Porphyromona gingivalis

Determinación de la concentración obtenida de una dilución 1:10 de LPS extraído y purificado de *Porphyromonas gingivalis* por el método de Galanos-Westphal.

Dilución	Absorbancia	Concentración	Concentración final del extracto acuoso de LPS
1/10	0.16	28 µg	560 µg/mL

Cuadro 13. Concentración obtenida de lipopolisacàridos por el método gráfico.

Dilución	Absorbancia	Concentración	Concentración final del extracto acuoso de LPS
-----------------	--------------------	----------------------	---

1/10	0.16	27.745 µg	554.9 µg/mL
------	------	-----------	-------------

Cuadro 14. Concentración obtenida de lipopolisacáridos por el método lineal.

Cálculos

Ecuación de la recta $y=mx+b$.

Donde

X=concentración de LPS

y= Absorbancia

m=pendiente

b=ordenada al origen.

$y= 0.0051x+0.0185$.

$$x= 0.16 -0.0185/0.0051$$

X= 27.74509804 por el factor de dilución 10.

Concentración de LPS= 277.45099804 µg

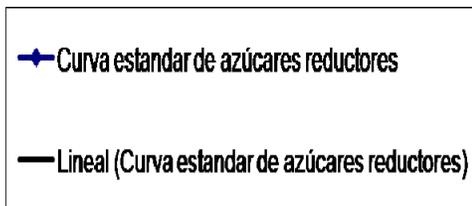
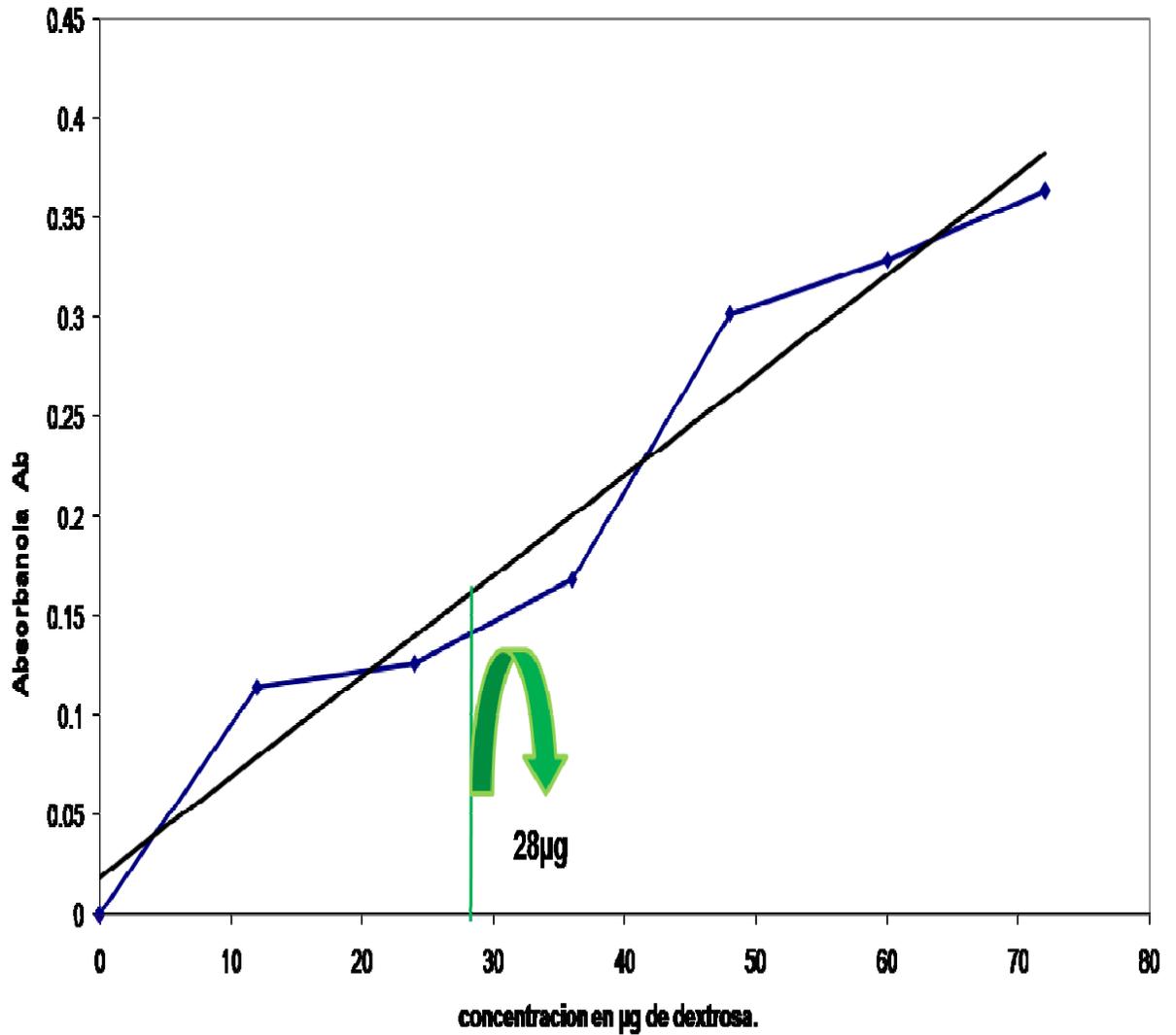
Para realizar la dilución se tomo 0.5 mL del LPS purificado para 1 mL de LPS la concentración es 554.9019608 µg/mL.

0.5 mL.....277.45099804 µg

1mL.....X

X=554.9019608 µg/mL

CURVA PATRON DE DEXTROSA



$$y = 0.005x + 0.018$$
$$R^2 = 0.954$$

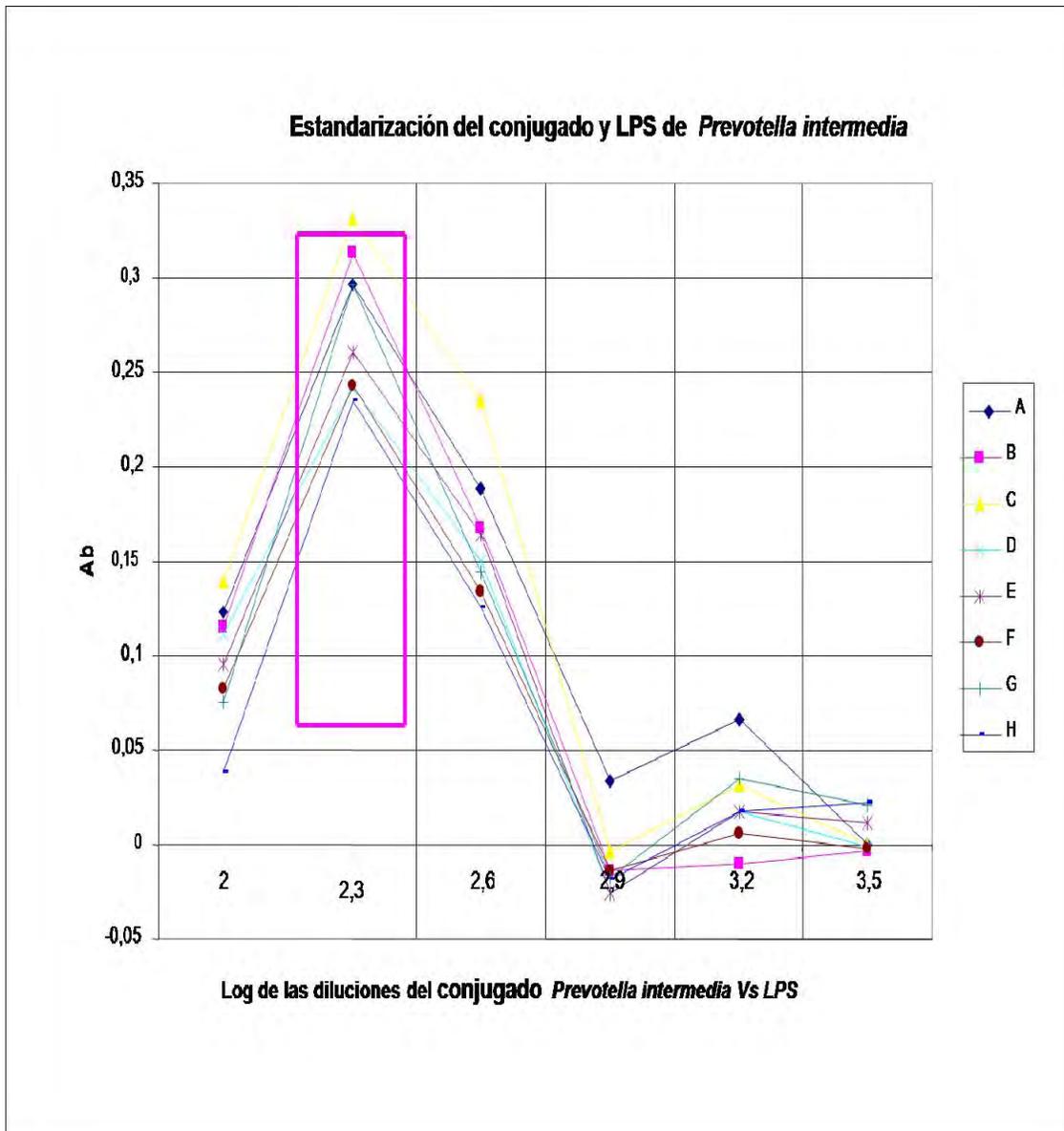
Grafica 2. Curva patrón de azúcares reductores método fenol acido sulfúrico, en azul curva estándar de azúcares reductores (real), en verde curva lineal obtenida por regresión lineal, donde se realizo la interpolación de la absorbancia obtenida de la dilución 1:10 de LPS de *Porphyromonas gingivalis*.

**Resultados de la titulación del conjugado anti-LPS y el título del LPS de
*Prevotella intermedia***

Se realizó la titulación del conjugado por el método de tablero de ajedrez, probando la fracción de conjugado obtenida; estableciéndose que la dilución de conjugado con mejor respuesta frente las diversas diluciones del LPS de *Prevotella intermedia* es 1:200

Dilución del conjugado de <i>Prevotella intermedia</i>							
Dilución del conjugado		100	200	400	800	1600	3200
Log del la dilución de conjugado		2	2,3	2,6	2,9	3,2	3,5
Dilución del LPS		1	2	3	4	5	6
2	A	0,123	0,297	0,188	0,034	0,066	0
4	B	0,115	0,313	0,168	0,014	-0,01	0,004
8	C	0,14	0,331	0,235	0,004	0,031	0
16	D	0,112	0,242	0,15	0,026	0,017	-0,001
32	E	0,095	0,206	0,164	0,026	0,017	0,012
64	F	0,082	0,243	0,134	0,014	0,006	-0,002
128	G	0,076	0,297	0,144	0,018	0,035	0,021
PBS	H	0,038	0,235	0,126	0,019	0,018	0,022

Cuadro 15. Placa de ELISA en disposición de tablero de ajedrez para determinar el título del conjugado, en vertical y nombradas con letras las diluciones de LPS, en horizontal y marcadas en azul el logaritmo de las diluciones del conjugado anti-LPS obtenido.



Grafica 3. Comparación de las respuestas a las diversas diluciones de conjugado obtenido frente a diferentes diluciones de LPS. Marcada en el rectángulo rosa la dilución del conjugado con la mejor respuesta en relación con las diluciones de LPS.

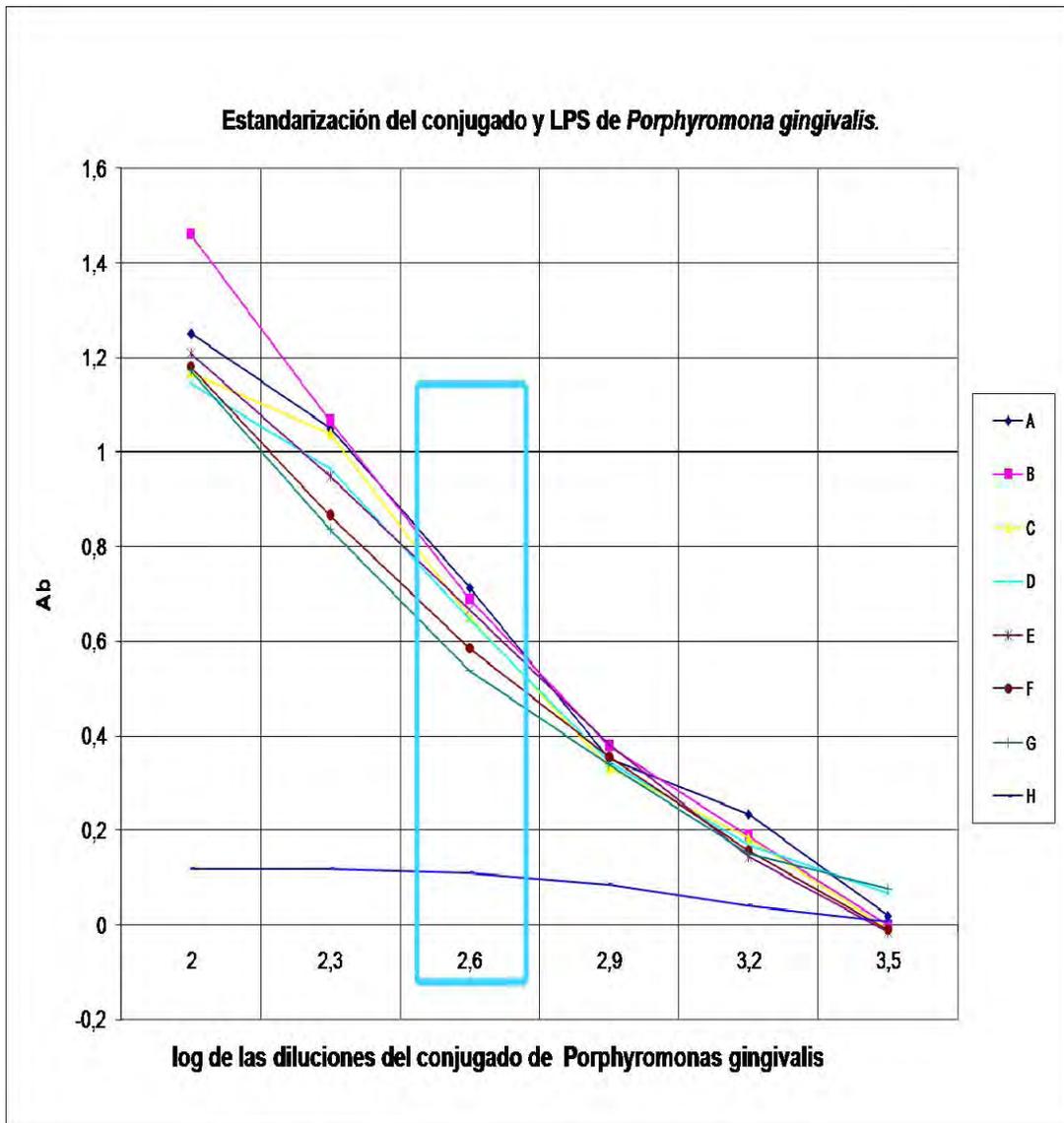
El título de LPS para la preparación del ELSA ligado a polimixina, se determino observando las respuestas de las diluciones de LPS de *Prevotella intermedia* frente a las diluciones del conjugado, obteniéndose que La dilución 1:8 de LPS equivalente a **88.52 µg/mL** conserva una respuesta dominante en comparación a las otras diluciones de LPS

Resultados de la titulación del conjugado anti-LPS y el título del LPS de *Porphyromonas gingivalis*

Se realizó la titulación del conjugado por el método de tablero de ajedrez, probando la fracción de conjugado; estableciéndose que la dilución de conjugado con mayor respuesta frente a del LPS de *Porphyromona gingivalis* es la fracción 1:400.

Dilución del conjugado de <i>Porphyromonas gingivalis</i>							
Dilución del conjugado		100	200	400	800	1600	3200
Log del la dilución de conjugado		2	2,3	2,6	2,9	3,2	3,5
Dilución del LPS		1	2	3	4	5	6
2	A	1,251	1,05	0,713	0,352	0,235	0,02
4	B	1,461	1,067	0,69	0,379	0,189	0
8	C	1,168	1,04	0,651	0,332	0,183	-0,009
16	D	1,145	0,964	0,646	0,344	0,169	0,066
32	E	1,209	0,949	0,667	0,382	0,144	-0,015
64	F	1,18	0,866	0,585	0,355	0,157	-0,01
128	G	1,172	0,837	0,538	0,34	0,151	0,077
PBS	H	0,119	0,119	0,11	0,086	0,04	0,008

Cuadro 16. Placa de ELISA en disposición de tablero de ajedrez para determinar el título del conjugado, en vertical y nombradas con letras las diluciones de LPS, en horizontal y marcadas en verde el logaritmo de las diluciones del conjugado anti-LPS derivado como sobrenadante.



Grafica 4. Comparación de las respuestas a las diversas diluciones de conjugado obtenido frente a diferentes diluciones de LPS. Marcada en el rectángulo azul la dilución de conjugado con la respuesta media en relación con las diluciones de LPS.

El título de LPS para la preparación del ELSA ligado a polimixina, se determino observando las respuestas de las diluciones de LPS de *Porphyromonas gingivalis* frente a las diluciones del conjugado, obteniéndose que la dilución 1:8 de LPS correspondiente **69.365 µg/mL**, posee una respuesta media que alcanza lecturas superiores a 1 en absorbancia con relación a diluciones de conjugado elegida.

Cruzamientos

Para evaluar la especificidad de los conjugados elaborados, se realizaron cruzamientos utilizando cada uno de los LPS y sus respectivos conjugados a las concentraciones establecidas para cada bacteria de interés con el ELISA polimixina, como se muestra en la siguiente tabla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A.a	Pg	Pi	PBS	A.a	Pg	Pi	PBS	A.a	Pg	Pi	PBS
B	A.a	Pg	PI	PBS	A.a	Pg	PI	PBS	A.a	Pg	PI	PBS
C	A.a	Pg	Pi	PBS	A.a	Pg	Pi	PBS	A.a	Pg	Pi	PBS
D	A.a	Pg	PI	PBS	A.a	Pg	PI	PBS	A.a	Pg	PI	PBS
E	A.a	Pg	Pi	PBS	A.a	Pg	Pi	PBS	A.a	Pg	Pi	PBS
F	A.a	Pg	PI	PBS	A.a	Pg	PI	PBS	A.a	Pg	PI	PBS
G	A.a	Pg	PI	PBS	A.a	Pg	PI	PBS	A.a	Pg	PI	PBS
H	A.a	Pg	Pi	PBS	A.a	Pg	Pi	PBS	A.a	Pg	Pi	PBS

Conjugado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Conjugado de *Porphyromonas gingivalis*

Conjugado de *Prevotella intermedia*

Cuadro 17. Diluciones de LPS (horizontal) y conjugados (vertical) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) y *Prevotella intermedia* (Pi) en la placa de ELISA.

Para determinar si existe o no respuestas cruzadas en los pozos de los otros LPS probados, se realizó el cálculo del corte para cada conjugado utilizando solo los pozos de PBS siguiendo la siguiente fórmula:

Corte = Media de los valores negativos + 2 desviaciones estándar de la media, de tal manera que todo valor que este por arriba será considerado positivo y lo que sea igual o menor al valor de corte será negativo. Aquellas muestras positivas que estén cercanas al valor de corte se repetirán

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,297	0,539	0,461	0,594	0,435	1,008	0,557	0,526	0,444	0,419	0,461	0,432
B	1,246	0,527	0,441	0,497	0,428	0,941	0,392	0,419	0,412	0,443	0,472	0,408
C	1,169	0,480	0,477	0,461	0,412	0,831	0,412	0,420	0,405	0,426	0,485	0,410
D	1,063	0,511	0,476	0,450	0,414	0,795	0,426	0,432	0,428	0,413	0,529	0,443
E	1,196	0,472	0,469	0,461	0,408	0,843	0,428	0,418	0,423	0,418	0,521	0,418
F	1,022	0,562	0,493	0,478	0,420	0,794	0,407	0,403	0,417	0,441	0,612	0,412
G	1,306	0,498	0,507	0,456	0,415	0,831	0,405	0,431	0,413	0,415	0,471	0,417
H	0,673	0,502	0,494	0,454	0,420	0,815	0,406	0,486	0,430	0,433	0,524	0,429

Media	0,481	Media	0,442	Media	0,421
Dvstd	0,048	Dvstd	0,042	Dvstd	0,012
corte	0,577	corte	0,526	corte	0,446

	Conjugado de <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> .
	Conjugado de <i>Porphyromonas gingivalis</i> .
	Conjugado de <i>Prevotella intermedia</i> .
	Blancos con PBS.
	Pozos positivos valores.

Cuadro.18. Absorbancias conseguidas de los cruzamientos, en verde claro los valores positivos obtenidos a partir de los pozos de PBS para cada conjugado probado.

Una vez calculado cada uno de los cortes para los conjugados probados, se observa que sólo existe repuesta en aquellos pozos donde se encuentran sus LPS correspondientes.

ELISA ligado a polimixina para identificar *Prevotella intermedia* en muestras tomadas de bolsas periodontales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS	PBS										
B	1	2	2'	3	4	5	6	7	8	9	10	PBS
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	PBS
D	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	PBS
E	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	PBS
F	44	45	46	47	48	49	50	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	A	B	C	D	F	G	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
H	PBS											

Control positivo (LPS *Prevotella intermedia* dilución 1/8)

Muestras de pacientes con lesión periodontal

Blanco con PBS

Muestras de pacientes sin lesión periodontal

Cuadro 19. Colocación en tablero de ajedrez de las muestras en la placa de ELISA.

**Absorbancias obtenidas de las muestras para determinar
*Prevotella intermedia***

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,259	0,210	0,223	0,234	0,153	0,112	0,134	0,124	0,246	0,123	0,140	0,038
B	0,064	0,180	0,024	0,023	0,018	0,011	0,006	0,017	0,038	0,021	0,012	0,011
C	0,076	0,126	0,006	0,012	0,007	0,000	0,017	0,000	0,062	0,000	0,035	0,012
D	0,036	0,035	0,035	0,029	0,031	0,012	0,026	0,024	0,023	0,057	0,056	0,000
E	0,038	0,083	0,070	0,017	0,022	0,019	0,017	0,016	0,016	0,007	0,014	0,000
F	0,022	0,019	0,068	0,036	0,018	0,031	0,027	0,036	0,030	0,003	0,041	0,044
G	0,048	0,030	0,020	0,023	0,035	0,020	0,016	0,099	0,023	0,055	0,032	0,046
H	0,027	0,010	0,029	0,014	0,027	0,003	0,005	0,043	0,026	0,058	0,082	0,016

Control positivo (LPS *Prevotella intermedia* dilución 1/ 8)

Muestras de pacientes con lesión periodontal

Blanco con PBS

Muestras de pacientes sin lesión periodontal

Cuadro 20. Absorbancias obtenidas del ELISA ligado a polimixina.

Calculo del valor de corte para *Prevotella intermedia*

Absorbancias de los controles negativos con PBS *Prevotella intermedia*

0.027	0.043	0.012	0.003
0.01	0.026	0	0.041
0.029	0.058	0	0.016
0.014	0.082	0.044	0.099
0.027	0.016	0.046	0.023
0.003	0.038	0.036	0.055
0.005	0.011	0.03	0.032

Cuadro 21. controles negativos (pozos con PBS)

	N	Minimo	Máximo	Media	Std. Desviación
<i>Prevotella intermedia</i>	28	0.000	0.099	0.02964	0.023721

CORTE: Media + 2 (desviación estándar)

$$\text{CORTE} = 0.02964 + (0.023721 \times 2) = 0.077082$$

Valores mayores al corte en los controles negativos omitirlos y re calcular el corte, realizar esta operación hasta obtener un valor de corte que no sea superado por algún valor de las muestras negativas, de tal manera que todo valor que este por encima será considerado positivo, valores iguales o menores al serán considerados negativos. Aquellas muestras cercanas al valor de corte se repetirán.

Absorbancias de los controles negativos con PBS *Prevotella intermedia*

0.027	0.043	0.00	0.041
0.010	0.026	0.00	0.016
0.029	0.058	0.044	0.023
0.014	0.016	0.046	0.055
0.027	0.038	0.036	0.032
0.003	0.011	0.03	
0.005	0.012	0.003	

Cuadro 22. controles negativos (pozos con PBS).

	N	Minimo	Máximo	Media	Std. Desviación
<i>Prevotella intermedia</i>	26	0.000	0.058	0.02496	0.016818

$$\text{CORTE} = 0.02496 + (0.016818 \times 2) = \underline{\underline{0.058596}}$$

Resultados de los valores de absorbancia obtenidos en las muestras para determinar *Prevotella intermedia*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,259	0,210	0,223	0,234	0,153	0,112	0,134	0,124	0,246	0,123	0,140	0,038
B	0,064	0,180	0,024	0,023	0,018	0,011	0,006	0,017	0,038	0,021	0,012	0,011
C	0,076	0,126	0,006	0,012	0,007	0,000	0,017	0,000	0,062	0,000	0,035	0,012
D	0,036	0,035	0,035	0,029	0,031	0,012	0,026	0,024	0,023	0,057	0,056	0,000
E	0,038	0,083	0,070	0,017	0,022	0,019	0,017	0,016	0,016	0,007	0,014	0,000
F	0,022	0,019	0,068	0,036	0,018	0,031	0,027	0,036	0,030	0,003	0,041	0,044
G	0,048	0,030	0,020	0,023	0,035	0,020	0,016	0,099	0,023	0,055	0,032	0,046
H	0,027	0,010	0,029	0,014	0,027	0,003	0,005	0,043	0,026	0,058	0,082	0,016

Control positivo (LPS *Prevotella intermedia* dilución 1/ 8)

Muestras de pacientes con lesión periodontal

Blanco con PBS

Muestras de pacientes sin lesión periodontal

Muestras positivas > 0.058596 nm

Cuadro 23. Tablero de ajedrez del ELISA ligado a polimixina. En color azul muestras con adsorbancias mayores al valor del corte calculado (muestras positivas > corte 0.058596).

Resultados del ELISA ligado a polimixina aplicado a muestras tomadas de bolsas periodontales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS	PBS										
B	1	2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PBS
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	PBS
D	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	PBS
E	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	PBS
F	44	45	46	47	48	49	50	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	A	B	C	D	F	G	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
H	PBS											

Control positivo (LPS *Prevotella intermedia* dilución 1/8)

Muestras de pacientes con lesión periodontal

Blanco con PBS

Muestras de pacientes sin lesión periodontal

Muestras positivas

Cuadro 24. Tablero de ajedrez donde se muestran en azul las muestras positivas para *Prevotella intermedia*.

ELISA ligado a polimixina para identificar *Porphyromonas gingivalis* en muestras tomadas de bolsas periodontales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS											
B	1	2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	PBS
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	PBS
D	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	PBS
E	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	PBS
F	44	45	46	47	48	49	50	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	A	B	C	D	F	G	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
H	PBS											

Control positivo (LPS *Porphyromonas gingivalis* dilución 1/ 8)

Muestras de pacientes con lesión periodontal

Blanco con PBS

Muestras de pacientes sin lesión periodontal

Cuadro 25.Colocación en tablero de ajedrez de las muestras en la placa de ELISA.

Absorbancias obtenidas de las muestras para determinar *Porphyromonas gingivalis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,957	0,698	0,753	0,642	0,72	0,618	0,698	0,777	0,665	0,567	0,641	0,067
B	0,099	0,082	0,049	0,051	0,044	0,022	0,026	0,027	0,019	0,03	0,061	0,061
C	0,043	0,079	0,072	0,043	0,028	0,024	0,08	0,032	0,032	0,066	0,021	0,054
D	0,095	0,053	0,067	0,041	0,041	0,027	0,022	0,032	0,01	0,016	0,03	0,039
E	0,09	0,077	0,066	0,059	0,009	0,027	0,113	0,081	0,02	0,012	0,015	0,048
F	0,033	0,04	0,029	0,031	0,02	0,021	0,019	0,007	0,004	0,015	0,032	0,033
G	0,054	0,06	0,033	0,042	0,035	0,082	0,03	0,02	0,066	0,05	0,026	0,033
H	0,121	0,048	0,091	0,035	0,079	0,062	0,091	0,09	0,03	0,036	0,052	0,046

 Control positivo (LPS *Porphyromonas gingivalis* dilución 1/8)

 Muestras de pacientes con lesión periodontal

 Blanco con PBS

 Muestras de pacientes sin lesión periodontal

Cuadro 26. Absorbancias obtenidas del ELISA ligado a polimixina

Calculo del valor de corte para *Porphyromonas gingivalis*

Absorbancias de los controles negativos con PBS <i>Porphyromonas gingivalis</i>			
--	--	--	--

0.121	0.090	0.054	0.015
0.048	0.030	0.039	0.032
0.091	0.036	0.048	0.030
0.035	0.052	0.033	0.020
0.079	0.046	0.033	0.066
0.062	0.067	0.007	0.050
0.091	0.061	0.004	0.026

Cuadro 27. controles negativos (pozos con PBS).

	N	Minimo	Máximo	Media	Std. Desviación
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	28	0.004	0.121	0.04879	0.027599

CORTE: Media + 2 (desviación estándar)

$$\text{CORTE} = 0.04879 + (0.027599 \times 2) = 0.103988$$

Valores mayores al corte en los controles negativos omitirlos y re calcular el corte, realizar esta operación hasta obtener un valor de corte que no sea superado por algún valor de las muestras negativas, de tal manera que todo valor que este por encima será considerado positivo, valores iguales o menores al serán considerados negativos. Aquellas muestras cercanas al valor de corte se repetirán.

Absorbancias de los controles negativos con PBS <i>Porphyromonas gingivalis</i>			
--	--	--	--

0.048	0.09	0.054	0.015
0.091	0.03	0.039	0.032
0.035	0.036	0.048	0.03
0.079	0.052	0.033	0.02
0.062	0.046	0.033	0.066
0.091	0.067	0.007	0.05
	0.061	0.004	0.026

Cuadro 28. controles negativos (pozos con PBS).

	N	Minimo	Maximo	Media	Std. Desviacion
<i>Porphyromona gingivalis</i>	27	0.004	0.091	0.04611	0.024146

$$\text{CORTE} = 0.04611 + (0.024146 \times 2) = 0.094402$$

Resultados de los valores de absorbancia obtenidos en las muestras para determinar *Porphyromonas gingivalis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,957	0,698	0,753	0,642	0,72	0,618	0,698	0,777	0,665	0,567	0,641	0,067
B	0,099	0,082	0,049	0,051	0,044	0,022	0,026	0,027	0,019	0,03	0,061	0,061
C	0,043	0,079	0,072	0,043	0,028	0,024	0,08	0,032	0,032	0,066	0,021	0,054
D	0,095	0,053	0,067	0,041	0,041	0,027	0,022	0,032	0,01	0,016	0,03	0,039
E	0,09	0,077	0,066	0,059	0,009	0,027	0,113	0,081	0,02	0,012	0,015	0,048
F	0,033	0,04	0,029	0,031	0,02	0,021	0,019	0,007	0,004	0,015	0,032	0,033
G	0,054	0,06	0,033	0,042	0,035	0,082	0,03	0,02	0,066	0,05	0,026	0,033
H	0,121	0,048	0,091	0,035	0,079	0,062	0,091	0,09	0,03	0,036	0,052	0,046

Control positivo (LPS *Porphyromonas gingivalis* dilución 1/ 8)

Muestras de pacientes con lesión periodontal

Blanco con PBS

Muestras de pacientes sin lesión periodontal

Muestras positivas > 0.094402nm

Cuadro 29. Tablero de ajedrez del ELISA ligado a polimixina. En color azul muestras con adsorbancias mayores al valor del corte calculado (muestras positivas >corte 0.094402).

Resultados del ELISA ligado a polimixina aplicado a muestras tomadas de bolsas periodontales.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS											
B	1	2	2'	3	4	5	6	7	8	9	10	PBS
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	PBS
D	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	PBS
E	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	PBS
F	44	45	46	47	48	49	50	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	A	B	C	D	F	G	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
H	PBS											

Control positivo (LPS *Porphyromonas gingivalis* dilución 1/ 8)

Muestras de pacientes con lesión periodontal

Blanco con PBS

Muestras de pacientes sin lesión periodontal

Muestras positivas

Cuadro 30. Tablero de ajedrez donde se exponen en azul las muestras positivas para *Porphyromona gingivalis*.

12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la siembra de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, fue necesario modificar el medio de cultivo para optimizar el crecimiento de ambas cepas. Lográndose como primordial elección el medio de Agar soya tripticasa enriquecido con extracto de levadura, suero de carnero al 10% o sangre de carnero al 5%, hemina 5µg/mL, menadiona 1 µg /mL. (ASTHM).

Los crecimientos bacterianos de ambas cepas proporcionaron a la cantidad necesaria de biomasa para la extracción de LPS para aglutinación activa, antígeno “O”, inmunizar al conejo y la obtención de anticuerpos específicos.

Para comprobar la presencia de los anticuerpos en el suero de conejo, se realizó la aglutinación activa, logrando observar una aglutinación definida a pesar de encontrarse en suero en el caso de cada cepa de trabajo (*Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*).

La aglutinación activa también fue utilizada para verificar la pureza de la IgM obtenida, comprobando que en efecto la mayor actividad de anticuerpo se obtiene en los primeros mililitros de la fracción inicial obtenidos de la separación por cromatografía de exclusión.

Para la cuantificación del LPS extraído y purificado por el método de Galanos Wesphat, se realizó una curva estándar de azúcares reductores por el método de fenol ácido sulfúrico, donde las concentración de LPS obtenidos para *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* es de 708.2µg /mL y 554.9 µg /mL respectivamente; Concentraciones que demostraron ser competentes para los usos destinados en esta tesis.

Las diluciones de conjugado y LPS seleccionadas, estuvieron sujetas a algunas consideraciones con el fin de hallar las concentraciones capaces de emitir respuestas confiables y definidas. Los criterios que se usaron fueron aplicados directamente en las graficas absorbancia Vs logaritmo de la dilución del conjugado generadas; primero buscar la respuesta adecuada o con el mayor valor de absorbancia, siempre y cuando la absorbancia no rebasara el valor de 1, evitando así errores espectrofotométricos; después buscar las concentraciones de conjugado y LPS con la respuesta media y /o más alta, asegurando la respuesta en diversas concentraciones.

Para demostrar que los conjugados fabricados para *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* son específicos para sus respectivos LPS, se realizaron cruzamientos probando cada conjugado con distintos LPS de bacterias relacionadas con la enfermedad periodontal, una vez revelada la placa de ELISA y calculado el corte, se encontró que sólo había respuesta de los conjugados para sus respectivos lipopolisacáridos. Evidenciando la especificidad de los mismos.

La determinación del LPS de *Prevotella intermedia* con la técnica de ELISA ligado a polimixina aplicada a 57 muestras, 50 muestras de pacientes con enfermedad periodontal y 7 muestras de pacientes aparentemente sanos sin lesiones; arrojó 8 muestras positivas para el LPS de *Prevotella intermedia*, clasificadas dentro de las 50 muestras con lesión periodontal. Representando el 14% del total de las muestras tomadas, demostrando la presencia de *Prevotella intermedia* en la población evaluada con enfermedad periodontal.

La determinación del LPS de *Porphyromonas gingivalis* con la técnica de ELISA ligado a polimixina aplicada a 57 muestras, 50 muestras de pacientes con enfermedad periodontal y 7 muestras de pacientes aparentemente sanos sin lesiones; arrojó 3 muestras positivas para el LPS de *Porphyromonas gingivalis*, clasificadas dentro de las 50 muestras con lesión periodontal. Representando el 5% del total de las muestras tomadas demostrando la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en la población evaluada con enfermedad periodontal.

Cabe mencionar que las lesiones en dientes y encías observadas en la enfermedad periodontal son ocasionadas por la respuesta inmune del huésped ante la presencia de los LPS de *Prevotella intermedia* o *Porphyromonas gingivalis*, que a su vez sensibilizan al epitelio expuesto en el surco gingival para otros LPS de algunas otras bacterias asociadas a enfermedad periodontal presentes en boca, logrando intensificar el daño en el epitelio gingival. Por esta razón no siempre las lesiones periodontales son indicativas de la presencia actual de *Prevotella intermedia* o *Porphyromonas gingivalis*.

13.CONCLUSIONES

Se logro la obtención, purificación y cuantificación del LPS bacteriano de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, permitiendo la elaboración de antígeno “O” para la inmunización y obtención de anticuerpo específico IgM anti-LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, así como, determinación del título de anticuerpo en suero y después en anticuerpo purificado.

Se consiguió la IgM anti-LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* para la elaboración de los conjugados, que probaron total funcionalidad, encontrándose el título del conjugado anti-LPS ideal para *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*.

Se logro evidenciar la respuesta específica para *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* en la técnica de ELISA ligado a polimixina en las muestras de la población en estudio con enfermedad periodontal.

Se logro la estandarización de ELISA polimixina para la identificación del LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* en muestras tomadas de bolsas periodontales.

14. ANEXOS

14.1 Pacientes con lesión periodontal

COLOCACIÓN ASIGNADA	EDAD	SEXO		ÍNDICE PERIODONTAL COMUNITARIO				
		<i>M</i>	<i>F</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	65		X			X		
2	29	X						X
2'	29	X						X
3	52		X					X
4	66	X						X
5	63	X					X	
6	47		X					X
7	30		X		X			
8	49		X					X
9	52		X				X	
10	34		X					X
11	55	X						X
12	40	X						X
13	43		X					X
14	48	X						X
15	47		X					X
16	33		X					X
17	55	X					X	
18	55		X					X
19	57		X					X
20	32	X						X
21	37	X						X
22	66		X				X	
23	29		X					X
24	28	X					X	
25	24		X				X	
26	44	X						X
27	29	X						X
28	46		X					X
29	65	X						X
30	39		X					X
31	36		X				X	
32	29		X					X
33	70	X						X
34	47		X				X	
35	51		X					X
36	74		X				X	
37	47		X					X
38	47		X					X
39	73		X					X
40	40		X				X	
41	42	X						X
42	58		X				X	
43	41		X					X
44	40		X					X
45	42		X				X	
46	28		X		X			
47	40		X					X
48	36		X					X
49	30		X					X
50	20		X		X			X

Cuadro 31. Lista de pacientes con diagnóstico de lesión periodontal.

Pacientes sin lesión periodontal

COLOCACIÓN ASIGNADA	EDAD	SEXO		ÍNDICE PERIODONTAL COMUNITARIO				
		<i>M</i>	<i>F</i>	*VER ANEXO				
				<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
A	56		X					
B	72	X						
C	50		X					
D	56		X					
E	47		X					
F	35		X					

Cuadro 32. Lista de pacientes sin diagnóstico periodontal.

* ÍNDICE PERIODONTAL COMUNITARIO

COMMUNITY PERIODONTAL INDEX FOR TREATMENT NEEDS (.Ainamo et al. 1982; CPI OMS 1997)

0 = Sin sangrado después de sondear

1 = Sangrado después de sondear

2 = Cálculo supra o subgingival, o restauraciones con márgenes deficientes
profundidad de sondeo menor de 4mm.

3 = Profundidad de sondeo de 4 – 5.5 mm

4 = Profundidad de sondeo de más de 6mm

14.2. Preparación de soluciones de trabajo

Solución madre de hemina:

Hemina 100 mg.

NaOH 1N 2 mL.

Agua destilada 100 mL.

Esterilizar a 121°C/ 15 lb /in³ por 15 minutos.

Concentración final de la solución 1 mg / mL “o” 1000 µg /mL de hemina

Solución madre de menadiona.

Menadiona o vitamina K 50 mg.

Alcohol etílico del 96° 50 mL.

Esterilizar por filtración para su uso. Conservar protegido de la luz en refrigeración.

Concentración final de la solución 1 mg / mL “o” 1000 µg /mL de menadiona.

Preparación de la solución acuosa de fenol al 90%

Pesar

Fenol.....9 g

Agua destilada.....1 mL

Disolver en un vaso de precipitado los 9 g de fenol con el mL de agua agitando con mucho cuidado. Usar guantes y tener precaución al momento de utilizar la solución.

Preparación de la solución acuosa de fenol al 80%

Pesar

Fenol.....4 g

Agua destilada1 mL

Disolver en un vaso de precipitado los 4 g de fenol con el mL de agua agitando con mucho cuidado. Usar guantes y tener precaución al momento de utilizar la solución.

Solución salina fisiológica SSF

Pesar

Cloruro de sodio NaCl.....8.5 g

Agua destilada1000 mL

Preparación de buffer

Buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8

Pesar

Fosfato bibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....3.58 g

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4).....1.38 g

Agua destilada.....100 mL

Buffer de carbonato-bicarbonato 1M pH 9.5

Pesar

Carbonato de sodio (Na_2CO_3).....10.59 g

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3).....8.4 g

Agua destilada.....100 mL

Buffer salina fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio NaCl.....	8.0 g
Cloruro de potasio KCl.....	0.2 g
Fosfato bibásico dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).....	2.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	0.2 g
Agua destilada.....	1000 mL

Buffer de salina fosfatos / NaCL 0.85 % para Elisa

Pesar

Cloruro de sodio NaCl.....	8.5 g
Cloruro de potasio KCl.....	0.2 g
Fosfato bibásico dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).....	2.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	0.2 g
Agua destilada	1000 mL

Buffer de salina fosfatos / NaCl 0.85% / Tween 20 0.05% para ELISA.

Pesar

Cloruro de sodio NaCl.....	8.5 g
Cloruro de potasio KCl.....	0.2 g
Fosfato bibásico dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).....	2.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	0.2 g
Tween 20.....	0.5 mL
Agua destilada	1000 mL.

Sustrato de peróxidasa de rábano

Pesar

Solución A

Fosfato bibásico dodecahidratado de sodio (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).....	1.41 g
Agua destilada	50 mL

Solución B

Ácido cítrico.....	1.050 g
Agua destilada	50 mL

Solución de trabajo C

Tomar

24.3 mL de la solución A

25.7 mL de la solución B

Mezclar las cantidades arriba indicadas para obtener un volumen de 50 ml de solución de trabajo.

Preparación del sustrato de peroxidasa

Pesar

O-Fenilendiamina.....20 mg (proteger de la luz)

Peróxido de hidrogeno al 30%.....20 µL

Solución de trabajo C.....50 mL

Disolver en la solución de trabajo C los 20 mg de O-Fenilendiamina y agregar los 20 µL de Peróxido de hidrogeno al 30%. (realizar esta solución al momento de ser utilizada).

Bloqueador para ELISA

Pesar

Leche descremada en polvo (5%).....5 g

Albúmina de huevo (1%).....1 g

Agua destilada100 mL

Disolver todo en 100 mL PBS ELISA.

Violeta cristal

Cristal violeta.....1.0 g

Agua destilada.....100 mL

Disolver en la mitad del volumen, agregar poco a poco el agua hasta completar 100 mL y lograr disolver todos los cristales, transferir en una botella limpia etiquetada, reservar hasta su uso.

Yodo de Gram

Yoduro de potasio (KI).....1 g

Yodo (I₂).....0.5 g

Agua destilada.....100 mL

Disolver 1 g de yoduro de potasio en 70 mL de agua destilada. Agregar 0.5 g de yodo y complétese con agua hasta 100 mL. Agítese hasta que el yodo se disuelva, reservar en una botella limpia etiquetada.

Alcohol –Acetona

Alcohol del 96°.....50 mL

Acetona.....50 mL

Juntar el alcohol y la acetona en un frasco limpio y etiquetar. Reservarse hasta su uso.

Recordara que a mayor cantidad de alcohol retarda la perdida de coloración normal, y que a mayor cantidad de acetona adelanta la perdida de coloración.

Safranina

Safranina.....0.5 g

Agua destilada100 mL

Disolver en la mitad del volumen, agregar poco a poco el agua hasta completar 100mL y lograr disolver todos los cristales, transferir en una botella limpia etiquetada, reservar hasta su uso.

14.3. Preparación de la escala de McFarland

Preparar soluciones de cloruro de bario y ácido sulfúrico al 1% (p/v), y colocar los volúmenes indicados en la siguiente tabla:

# de tubo	BaCl ₂ al 1% (mL)	H ₂ SO ₄ al 1% (mL)	# de bacterias / mL
1	0.1	9.9	3.0 X 10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0 X 10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0 X 10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2 X 10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5 X 10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8 X 10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1 X 10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4 X 10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7 X 10 ⁹
10	1	9	3.0X 10 ⁹

14.4. Cálculos

Cálculos del Formaldehído para la elaboración del Ag O de *Prevotella intermedia*.

Preparar 1 mL de Ag (antígeno) con una concentración final de 0.3% de formaldehído.

1mL.....0.003 g.....para estar al 0.3%

Pureza del formaldehido 37%

Hay 0.37 g de formaldehido.....1 mL

0.003 g.....X X=0.0081 mL o 81 µL

Cálculos del glutaraldehido para la elaboración del conjugado.

Preparar 200 µL de buffer de fosfato 0.1M pH 6.8 que contenga 1.25% de glutaraldehido.

1 ml.....0.0125 g para estar al 1.25%

1000 µL.....0.0125 g para estar al 1.25%

200 µL.....X X=0.0025 g de glutaraldehido.

Solución acuosa de glutaraldehido al 25%

1ml de solución acuosa.....hay 0.25 g de glutaraldehido

Hay 0.25 g de glutaraldehido.....1000 µL

0.0025 g de glutaraldehido.....X X= 10 µL

15. REFERENCIAS

1. Mueller PH. Periodontología. 1^a ed. México: Editorial el manual moderno; 2005
2. Rose RN, Milgrom F, Van Oss JC. Principios de Inmunología. México: Editorial Continental S. A de C. V; 1983: 78-83.
3. Roa MN. Respuesta inmune innata y tolerancia oral frente a periodontopatógenos. (tesis licenciatura). Bogota, Colombia: Pontificia universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Especialización de Laboratorio en Inmunología Clínica; 2005.
4. Margni AR. Inmunología e inmunoquímica. fundamentos. 5^a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1996: 91-95, 362-364.
5. Goldsby AR, Kindt JT, Osborne AB, Kuby J. Inmunología. 5a ed. México: Mc GrawHill; 2004: 95-97, 268-270.
1. Travería S, Vicario M, Violant D, Vives T, Santos A. Importancia del control de placa en las manifestaciones gingivales del embarazo, A propósito de un caso. Rev Oper Dent Endod 2007; 5: 80
6. Bermúdez V, Leal E, Bermúdez F. Enfermedad periodontal como factor de riesgo para la Aterosclerosis. ISSN 0798-0264. AVFT 2003; 22 (2): 153-162.
7. Koneman WE, Allen D, Stephen. MD, Janda .MW. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas. 5^a ed. España: Editorial Médica panamericana; 2001: 724, 725, 728-736
8. Sydney FM, Baron JE. Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico. 7a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1991:488-494

9. Mc Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 2^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1993: 228.
10. Cabrera YM. Estudio Microbiológico de la bacteria Prevotella. Intermedia en el surco gingival de gestantes con diferentes grados de placa bacteriana-hospital nacional docente Madre-Niño San Bartolomé. (Tesis licenciatura). Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor De San Marcos Fundada en 1551, facultad de Odontología; 2004.
11. Tanner M The impact of 16S rRNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. Journal of Periodontology 2000 1994;5: 26-51, 78-111.
12. Gutiérrez HO. Porphyromona gingivalis y su relación con la enfermedad periodontal. (Tesis licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Odontología; 2006.
13. Garjardo RM. Actividad biocida de un propolis chileno frente a Porphyromona gingivalis estudio in vitro. (Tesis licenciatura). Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de odontología; 2006.
14. Lehninger LA.. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2^a edición. Barcelona, España: Ediciones Omega. S. A; 1995: 161-185.
15. Lequin MR. Enzyme immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked immunosorbent Assay. Clinical Chemistry 2005;51(12):2415-2418
16. Boudet F, Thèze J, Zouali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides Journal of Immunological Methods 1991;142:73-82.
17. Wsldom GB. Enzyme immunoassay. Rev Clinical Chemistry 1976;22:1243-1255

18. Katzung BG. Farmacología básica y clínica. 4ª ed. México DF: El manual moderno S.A. de C. V; 1991;555:582- 583.
19. Blais BW, Leggate J, Bosley J, Martinez-Perez A. Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of *Escherichia coli* O157 by a novel polymixin-based ELISA. *Lett Appl Microbiol* 2004; 39:516-522.
20. Blais BW, Bosley J, Martinez PA, Popela M. Polymixin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Escherichia coli* O111 and O26. *Journal of microbiological methods* 2006;65:468-475
21. Campbell DH, Garbey JS, Cremer NE, Sussdorf DH. *Methods in immunology*, 2a edition. New York 1970.
22. Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int Immunol* 2004; 16:1431-1437.
23. Hudson L, Hay FC. *Practical Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1980.