



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Implementación de la técnica ELISA-polimixina para detectar LPS de**  
***Actinobacillus actinomycetemcomitans* en una infección en ratones CD1**

**et/et.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**MÉNDEZ GONZÁLEZ BRISA**

**DIRECTOR: DR RUBÉN MARROQUÍN SEGURA.**

**ASESOR: M.C. MAURILIO FLORES PIMENTEL.**

**MÉXICO, D.F., MAYO 2011**



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**

En memoria de mi amado padre, que aunque no pudo ver hecho realidad este, nuestro sueño, tu recuerdo y tu ejemplo es que me impulso a seguir adelante.

A mi hermosa hija Anel, a quien indirectamente sacrificué, y cuya presencia me motivó a superarme y lograr este objetivo.

A mi amado esposo Javier que me apoyó en todo momento, y me alentó cuando más cansada me sentía; su esfuerzo queda igualmente plasmado en este trabajo.

A mi querida madre, por estar presente en todo momento, nunca perdiendo la fe en que llegaría este momento; su apoyo y paciencia fueron esenciales para llegar a cumplir esta meta.

A mis hermanos Ulises, Ivan e Irán por ser mis amigos y consejeros, por acompañarme en cada momento de esta etapa.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis Dr. Rubén Marroquín Segura, por su incansable paciencia. Gracias!

A mi asesor de tesis M.C. Maurilio Flores Pimentel por los consejos y su incomparable dirección.

A la Mtra. Yolanda Flores Cabrera y Dr. José Luis A. Mora, por su disposición y apoyo cuando lo necesité.



---

## INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Marco Teórico	4
Morfología y estructura dentaria	4
Cavidad bucal	6
Placa dental	7
Caries dental	9
Enfermedad periodontal	10
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	13
Taxonomía	13
Importancia clínica	13
Factores de virulencia	14
Características de cultivo	15
Sensibilidad a antimicrobianos	16
Bacterias Gram negativas	18
Síndrome de Sjögren	20
Caracterización del ratón CD1 et/et	24
Inmunoensayo enzimático (ELISA)	25
Planteamiento del problema	30
Objetivos	31
Hipótesis	32
Diseño experimental	33

---

Diagrama de flujo	34
Material y Método	35
Resultados	47
Discusión de resultados	57
Conclusiones	60
Anexo	61
Referencias bibliográficas	65

---

## RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue implementar la técnica de ELISA ligada a polimixina B para la detección de lipopolisacáridos (LPS) de la bacteria *Actinobacillus actinomycescomitans* en una infección provocada a 30 ratones CD1 de las cepas et/et (mutante), et/+ (heterocigotos) y +/+ (progenitor). Inicialmente se sembró masivamente *Actinobacillus actinomycescomitans* ATCC 43718 en diferentes cultivos, de la biomasa obtenida, se extrajeron los LPS por el método de Galanos-Westphal. Previo a la inducción de la infección en los ratones, se administró penicilina a concentración de 4000 U/mL, diluida en los bebederos de agua durante 3 días, con el objetivo de deprimir la biota bacteriana. La infección bacteriana se indujo administrando diariamente durante 5 días 0.25 mL de cultivo (aprox  $2.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias UFC/mL) a través de una sonda gástrica y se mantuvieron con dieta 2050 rica en carbohidratos durante 11 semanas. Posteriormente se inmunizó un conejo Nueva Zelanda Blanco con el antígeno O de *Actinobacillus actinomycescomitans* para la obtención de anticuerpos anti LPS de esta bacteria, con este anticuerpo se preparó un conjugado con peroxidasa de rábano picante. Empleando la técnica de ELISA – polimixina B se cuantificaron los LPS de *Actinobacillus actinomycescomitans* presentes en las muestras de lavados gingivales en dichos ratones, al mismo tiempo se pudo evaluar cualitativamente el índice gingival con una tinción de eritrocina al 1%.



---

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es el segundo trastorno bucal en importancia que, junto con la caries, constituye la amenaza principal a la salud bucal. Las enfermedades periodontales constituyen junto con la caries dental, la causa más importante de pérdida dentaria. Como resultado de varias décadas de intensa investigación ha sido posible la identificación de los agentes etiológicos microbianos relacionada con las diferentes enfermedades periodontales, en general las principales bacterias relacionadas son microorganismos Gram negativos, facultativos, capnófilos o anaerobios como *Actinobacillus actinomycescomitans*.<sup>(1)</sup>

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por un infiltrado linfocítico de las glándulas exocrinas que afecta especialmente a las glándulas salivales y lagrimales, provocando la aparición de la xerostomía a nivel bucal y de la queratoconjuntivitis seca a nivel de los ojos.

En los pacientes con SS, la disminución de la secreción salival resulta en severas molestias bucales, según estudios se observaron que estos pacientes presentaban valores elevados para los índices de placa y un nivel de riesgo 2.2 veces mayor de padecer enfermedad periodontal que los controles sanos, también se reportaron valores más elevados en pacientes con SS cuando se evaluaron diferentes índices periodontales, así como niveles de anticuerpos contra *Actinobacillus actinomycescomitans* (Aa) significativamente más elevados<sup>(2)</sup>.

Se utilizaron ratones desnudos (et/et) los cuales desarrollan una exocrinopatía inflamatoria que semeja el SS, además sus glándulas lagrimales y submaxilares muestran menor tamaño que las glándulas de los ratones +/-<sup>(3)</sup>

Considerando que en México no se cuenta con una técnica rápida y eficaz para la detección de *A. actinomycescomitans* se propone el presente trabajo el cual

---

tiene como objetivo estandarizar una técnica precisa para la identificación de dicha bacteria. La identificación de *A. actinomycetemcomitans* se hace provocando infección a ratones et/et, et/+ y +/+ y determinando el daño en el periodonto así como la presencia de antígenos en lavados gingivales, utilizando la prueba de ELISA ligado a polimixina B

---

## MARCO TEÓRICO

### Morfología y estructura dentaria

Aunque los dientes varían considerablemente de forma y de tamaño, su estructura histológica es básicamente similar.

Estructura morfológica (fig. 1).

Corona: Es la parte del diente libre o visible en la cavidad oral. La capa de diente que lo recubre es el esmalte, y podemos observar en boca la parte funcional del órgano dentario. Esta porción del diente se encuentra expuesta al medio bucal en forma permanente.

Cuello: También llamado zona cervical, es la unión de la corona con la raíz y se sitúa en la encía marginal.

Raíz: Es la parte que no se puede ver ya que está incrustada en el alvéolo dentario, dentro del hueso, y se encuentra recubierta por el cemento. Sirve de anclaje. Los dientes normalmente tienen entre una y tres raíces, dependiendo de si son incisivos (una raíz), caninos (1), premolares (1 o 2) o molares (dos o tres, en casos excepcionales más de tres).

Pulpa dental: Está constituida por un tejido suave que contiene vasos sanguíneos que conducen la sangre hacia el diente y por fibras nerviosas que otorgan sensibilidad al diente. Dichos nervios atraviesan la raíz (del diente) por medio de finos canales. Su célula principal son los odontoblastos (son células tanto de la pulpa como de la dentina), éstos fabrican dentina y son los que mantienen la vitalidad de la misma.

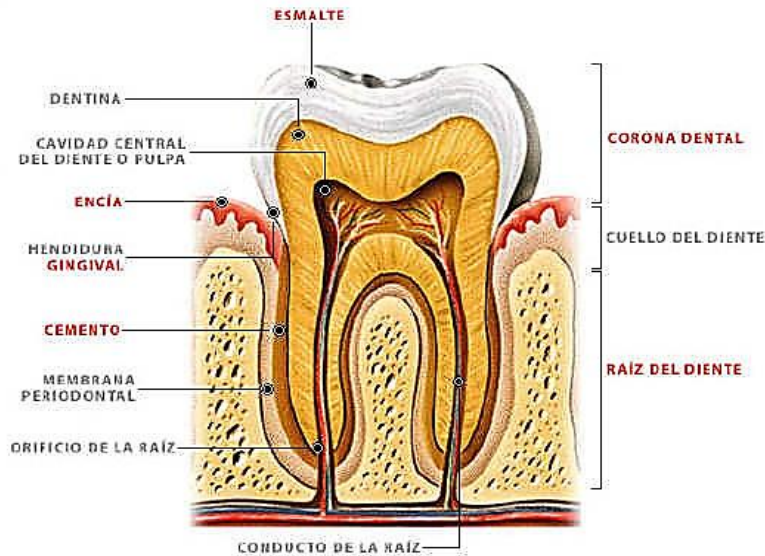


Figura 1. Estructura dental: cualquier elemento dentario consta de una corona y una raíz, y la unión entre ambos es el cuello del diente<sup>(4)</sup>.

**Esmalte dental:** Es una cubierta de mucha dureza, compuesto por hidroxiapatita, considerándose éste el mineral más duro del cuerpo humano. Junto con el cemento dental recubre la dentina. El esmalte es translúcido, brillante e insensible al dolor. El esmalte no puede regenerarse, por eso la caries es una enfermedad crónica, en cambio sí puede remineralizarse con flúor. Con el flúor se forman cristales de fluorhidroxiapatita que es mucho más resistente que la hidroxiapatita al ataque de la caries dental.

**Dentina:** Tejido calcificado, menos duro que el esmalte y más duro que los huesos. Constituye la mayor parte del diente. Proporciona elasticidad y capacidad para proteger a la dentina subyacente de golpes y fracturas.

**Cemento dental:** Es una capa dura, opaca y amarillenta que recubre la dentina y que se une al esmalte en el cuello del diente. Es la estructura protectora de la raíz dentaria<sup>(4)</sup>.

El periodonto está constituido por la:

**Encía:** Es la parte de la mucosa bucal que rodea el cuello de los dientes y cubre el hueso alveolar.

---

Membrana periodontal: Es una estructura de tejido conjuntivo que rodea la raíz y la une al hueso alveolar. Entre sus funciones están la inserción del diente al hueso alveolar y la resistencia al impacto de los golpes. También posee propiedades mecano receptoras siendo capaz de transmitir las fuerzas ejercidas sobre el diente a los nervios adyacentes.

Hueso alveolar: Es la parte del hueso maxilar donde se alojan los dientes. (5)

### **Cavidad bucal**

La microbiota normal contiene organismos capaces de resistir la eliminación mecánica, al adherirse a superficies como las encías y los dientes, los que no se pueden adherir se eliminan por la limpieza mecánica de los contenidos de la cavidad bucal hacia el estómago, donde son destruidos por el ácido clorhídrico. La descamación continua de las células epiteliales elimina también microorganismos, aquellos capaces de colonizar la boca encuentran un ambiente muy cómodo debido a la disponibilidad de agua y nutrientes, pH y temperatura adecuados, y otros muchos factores(6).

#### Biota normal en cavidad bucal

Del elevado número de microorganismos que se encuentran en la cavidad bucal, sólo se pueden considerar verdaderos patógenos dentales algunas bacterias, las cuales son responsables de las enfermedades bucales más comunes en el ser humano: la caries dental y enfermedad periodontal.

El diente humano posee mecanismos naturales de defensa contra la colonización bacteriana que complementan el papel protector de la saliva. La superficie dura del esmalte absorbe de forma selectiva glucoproteínas ácidas (mucinas) de la saliva, formando una capa membranosa llamada película adquirida del esmalte. Esta película o revestimiento orgánico, contiene muchos grupos sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y carboxilo ( $-\text{COO}^-$ ) que confieren a la superficie del diente una carga neta negativa. Debido a que la mayoría de las bacterias también tienen una carga neta negativa, existe una repulsión natural entre la superficie dental y las bacterias de la cavidad

---

bucal. Desgraciadamente, este mecanismo natural de defensa se rompe cuando tiene lugar la formación de placa dental.

La formación de **placa dental** comienza con la colonización inicial de la película por *Streptococcus gordonii*, *S. oralis* y *S. mitis*, estas bacterias se adhieren de forma selectiva a la película por interacciones específicas iónicas, hidrófobas y de tipo lectina; una vez colonizada la superficie del diente, se produce la unión posterior de otras bacterias por diversas reacciones de coagregación. La coagregación es el resultado del reconocimiento entre células por bacterias diferentes genéticamente, muchas de estas interacciones son mediadas por una lectina de una bacteria que interactúa con un receptor de carbohidrato complementario presente en la otra bacteria, en esta fase, las especies más importantes son *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* y *S. gordinii*. Después de que estas especies colonizan la película, se crea un microambiente que permite que se establezcan *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus* sobre la superficie dental, uniéndose a estos colonos iniciales (fig 2).

Estos estreptococos producen enzimas extracelulares (glucosiltransferasas) que polimerizan la fracción glucosa de la sacarosa en un grupo heterogéneo de polímeros de glucano y otros polisacáridos extracelulares hidrosolubles e insolubles en agua, la fructosa es el otro monómero de la sacarosa, que se puede emplear en la fermentación. Los glucanos son polisacáridos de cadena ramificada compuestos de unidades de glucosa que se mantiene unidas por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) y  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3) actúan como cemento para ligar las bacterias entre sí, formando un ecosistema sobre la placa, una vez establecida la placa, se crea un bajo potencial de óxido reducción sobre la superficie del diente, esto lleva al crecimiento de bacterias anaerobias estrictas (*Bacteroides melaninogenicus*, *B. oralis* y *Veillonella alcalescens*), especialmente entre dientes contiguos y en los surcos gingivodentales.

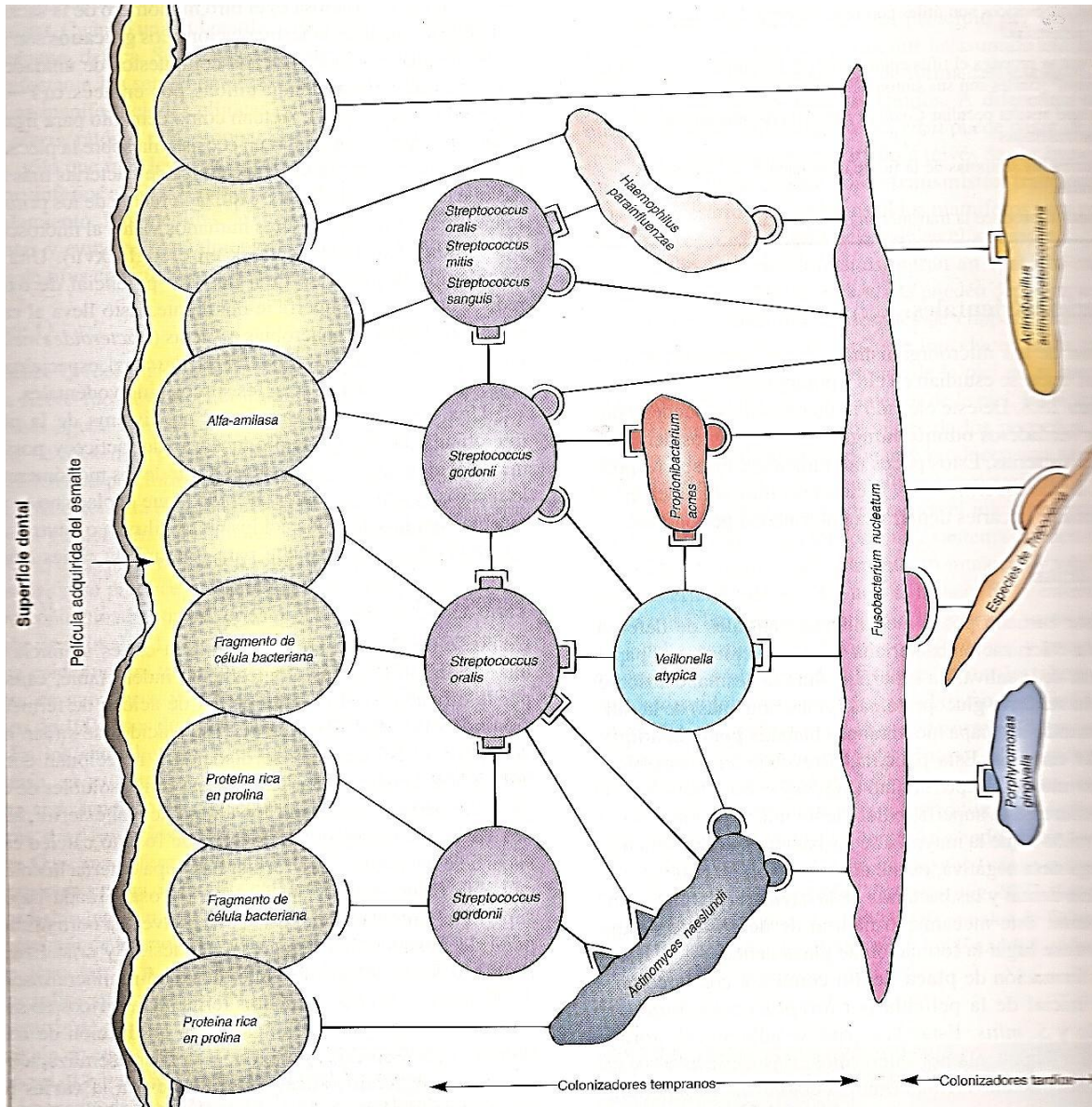


Figura 2. Formación de la placa sobre un diente recién limpio. Representación esquemática de la relación temporal propuesta entre la acumulación de bacterias y la coagregación multigenérica durante la formación de la placa dental sobre la película adquirida del esmalte. Los colonizadores tempranos de la superficie del diente se agregan entre sí, y los colonizadores tardíos de la superficie del diente se agregan entre sí. Después de que la superficie dental está cubierta por los primeros colonos, cada bacteria añadida se convierte en una nueva superficie de reconocimiento para las bacterias no unidas<sup>(7)</sup>.

Una vez que se desarrolla el ecosistema de la placa microbiana, las bacterias producen ácido láctico y posiblemente ácido acético y fórmico a partir de los monómeros de la sacarosa y otros azúcares. Debido a que la placa no es permeable para la saliva, los ácidos no se diluyen o neutralizan, y desmineralizan el esmalte para producir la caries dental (fig 3).

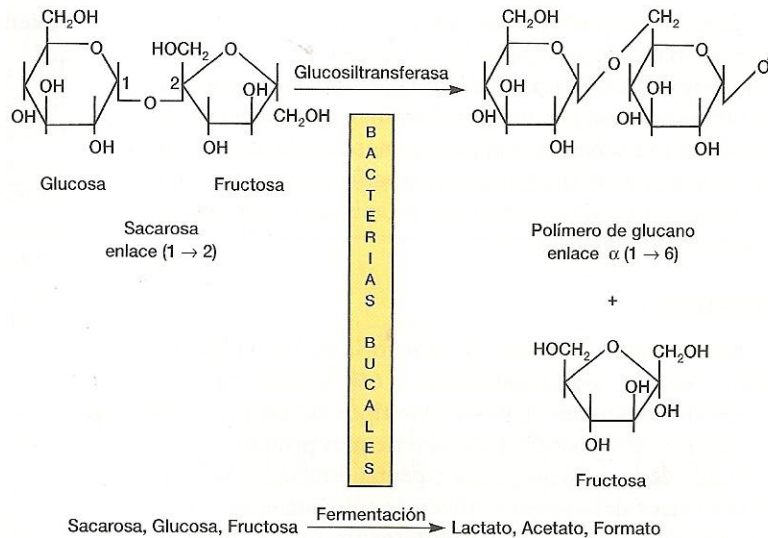


Figura 3. La enzima glucosiltransferasa o dextranosacarasa (producida por las bacterias bucales) hace que se ensamblen las unidades de glucosa de la sacarosa en glucanos, quedando libre la fructosa. Las moléculas de sacarosa, glucosa y fructosa se metabolizan por las bacterias bucales para producir lactato y otros ácidos. El lactato pH ácido es responsable de la caries dental<sup>(7)</sup>.

**La caries dental** se inicia por una lesión química, histológicamente indetectable, causada por la difusión en el esmalte dental de ácidos de fermentación disociados, una vez que estos ácidos se sitúan bajo la superficie del esmalte, se disocian y reaccionan con la hidroxiapatita del esmalte para formar iones solubles de calcio y de fosfato. Al difundir los iones hacia el exterior, algunos vuelven a precipitar como sales de fosfato cálcico en la superficie del diente, para formar una capa externa histológicamente firme que reviste la zona porosa situada bajo la superficie. Entre las comidas, el pH vuelve a la normalidad y parte del fosfato cálcico regresa a la lesión y cristaliza, el resultado es un ciclo de desmineralización-remineralización. Cuando se comen alimentos fermentables ricos en sacarosa durante periodos prolongados, la producción de ácido supera el proceso de reparación, y la desmineralización es mayor que la remineralización, esto lleva a la caries (del



---

Latin pudrición) dental. Una vez que se ha abierto brecha en el esmalte, las bacterias pueden invadir la dentina, y la pulpa dental y provocar su muerte<sup>(7)</sup>

La **Enfermedad periodontal** alude a un grupo diverso de enfermedades que afectan al periodonto, el cual es una estructura de sostén de un diente y comprende el cemento, la membrana periodontal, los huesos de la mandíbula y las encías; la encía es el tejido, cubierto de mucosa, que rodea los cuellos (raíces) de los dientes y reviste las mandíbulas. La enfermedad se inicia por la formación de placa subgingival, la placa que se forma en el borde gingivodental y que se extiende hacia abajo al interior del tejido gingival. Datos recientes muestran que las principales especies de esta placa son: *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromona gingivalis*, que son responsables de la degradación del tejido a través de la protección de diversas proteasas. El resultado es una reacción inflamatoria inicial que se conoce como periodontitis, que se debe a la respuesta inmunitaria del huésped frente tanto a las bacterias de la placa como a la destrucción tisular, esto lleva a tumefacción de tejido y a la formación de bolsas periodontales, las bacterias colonizan estas bolsas y causan más inflamación, lo que produce la formación del absceso periodontal, la destrucción ósea o periodontosis, la inflamación de las encías o gingivitis, y la necrosis del tejido en general; si no se trata, el diente puede caer de su alveolo (fig 4)<sup>(8)</sup>.



Figura 4. Evolución de la enfermedad periodontal<sup>(8)</sup>

---

**Periodontitis juvenil:** Diversas formas de periodontitis se caracterizan por pérdida rápida y grave de inserción en sujetos durante o antes de la pubertad. La periodontitis juvenil, también llamada periodontitis juvenil localizada (PJJ) aparece en torno de la pubertad, se observa con más frecuencia en las mujeres que en varones y, de modo característico, afecta a los incisivos y molares permanentes. La microbiota relacionada con la periodontitis está compuesta de modo predominante por bacilos anaerobios y capnófilos Gram negativo. Los ensayos microbiológicos indican que casi todos los sitios PJJ albergan *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que conforma hasta 90% de la microbiota total cultivable, por lo que se acepta a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* es el agente etiológico primario en la mayor parte, sino es que en todos los casos de PJJ.(fig. 5)<sub>(8)</sub> (cuadro 1)

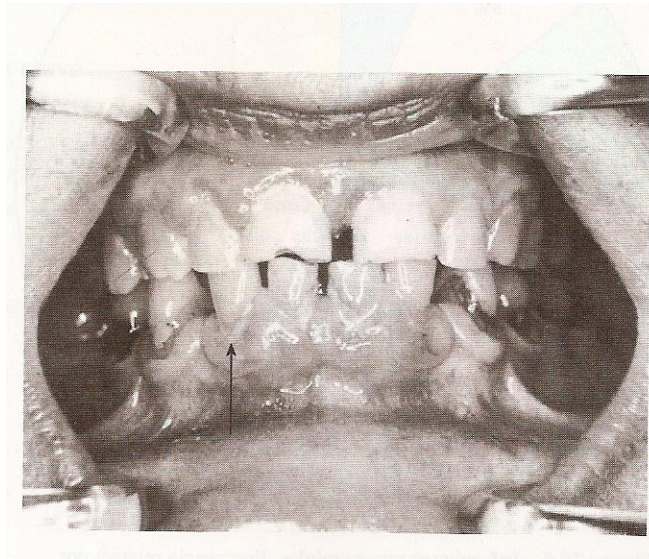


Figura 5 .Periodontitis juvenil: Obsérvese la placa sobre los dientes (flecha), especialmente sobre los bordes gingivales, y la encía inflamada<sub>(9)</sub>.

Cuadro 1. Microorganismos asociados a diferentes formas de gingivitis y periodontitis<sup>(10)</sup>

	GI	PA	PRP	PJL	PJG	PPJ	PPBL	PR
<i>P.gingivalis</i>	-	+++	+++	-	+++	++	++	+
<i>P.intermedia</i>	++	+++	+++	+	+++	++	++	+++
<i>B.forsythus</i>	-	+++	++	-	++	+	-	++
<i>L.buccalis</i>	+	++	+	-	+	+	+	-
<i>Fusobacterium</i> spp	+++	++	+	-	+	++	++	+++
<i>Selenomonas</i> spp	-	++	+	-	+	+	+	-
<i>C.periodontii</i>	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>C.rectus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Veillonella</i> spp	++	+	+	-	+	+	+	-
<i>P.magnus</i>	-	+	+	-	+	+	+	-
<i>P.micros</i>	+	++	++	-	+	++	+	+
<i>T.denticola</i>	+	++	+++	-	+	++	+	+
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	-	++	++	+++	++	++	++	++
<i>E.corrodens</i>	-	+	+	-	+	+	++	+
<i>Capnocytophaga</i> spp	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Campylobacter</i> spp	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Streptococcus</i> spp	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomyces</i> spp	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacterias/Pseudomonas</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus</i> spp	++	+	-	-	-	-	-	+
<i>Haemophilus</i> spp	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	+	-	-	-	-	-	+

GI Gingivitis inespecífica, PA Periodontitis del adulto, PRP Periodontitis rápida progresiva, PJL Periodontitis juvenil, PJG Periodontitis postjuvenil, PPBL Periodontitis prepuberal.

---

### **Características generales de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*:**

**Taxonomía:** Este microorganismo comparte numerosas características de cultivo y bioquímicas con el género *Haemophilus*. *A. actinomycetemcomitans* forma parte de la flora normal de la cavidad bucal sobre todo en los repliegues gingivales y supragingivales, esta especie puede dividirse en cinco serotipos designados con las letras a, b, c, d y e según las reacciones con anticuerpos monoclonales tipo-específicos. Estudios de estos serotipos con sondas genéticas de rRNA demostraron una heterogeneidad genómica significativa, incluso entre cepas que pertenecen a un mismo serotipo.

**Importancia clínica.-***A. actinomycetemcomitans* es un cocobacilo Gram negativo pequeño asociado con infecciones actinomicóticas, endocarditis, bacteremia, infección de las heridas e infecciones dentales. Este microorganismo, a menudo se aisló junto con especies de *Actinomyces* en abscesos actinomicóticos, el nombre del microorganismo deriva del aislamiento “concomitante” con estas especies. Las investigaciones en el terreno de la microbiología dentaria determinaron que *A. actinomycetemcomitans* desempeña un papel etiológico importante en la enfermedad periodóntica, este fenómeno se correlaciona con la presencia habitual del microorganismo en la placa dentaria, los pliegues periodónticos y los surcos gingivales. Esta bacteria se asocia específicamente con una entidad clínica bien definida, denominada periodontitis juvenil localizada (PJJ); esta enfermedad afecta niños y adultos jóvenes (entre 11 y 20 años de edad) y se caracteriza por la degeneración y la destrucción rápida del hueso alveolar que sustenta los primeros molares e incisivos permanentes. Durante el desarrollo de este trastorno se observa un mínimo grado de acumulación de placa y una inflamación gingival escasa o nula. Varios estudios confirmaron que *A. actinomycetemcomitans* puede estar específicamente relacionado con esta enfermedad, estudios inmunológicos también revelaron que los pacientes con PJJ presentan títulos elevados de anticuerpos contra antígenos de *A. actinomycetemcomitans* en la saliva, el líquido de los surcos gingivales y el suero. La mayoría de los pacientes con PJJ generan anticuerpos contra una proteína de

---

29 kDa presente en la membrana externa de *A. actinomycetemcomitans* que muestra una homología considerable con las proteínas de membrana externa entéricas, asimismo hay evidencias que indican que *A. actinomycetemcomitans* puede estar involucrado en algunas formas de enfermedad periodóntica del adulto.

**Factores de virulencia.**- Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* producen diversos factores de virulencia in vitro que son: una potente leucotoxina, un factor inhibidor de la quimiotaxis de los neutrófilos, un factor inhibidor de los fibroblastos, una toxina inductora de la resorción ósea, una colagenasa, fosfatasa alcalina y una endotoxina lipopolisacárida.

\*La leucotoxina posee la capacidad de destruir neutrófilos, monocitos y linfocitos T al inducir lesiones de membrana y el clivaje y la fragmentación del DNA cromosómico, posiblemente mediante la activación de nucleasas endógenas. La producción de leucotoxina en la región supragingival puede provocar una inmunosupresión localizada esencial para el desarrollo de las lesiones periodónticas de la PJI.

\*La endotoxina de *A. actinomycetemcomitans* puede desencadenar la resorción ósea, activar el complemento inducir la liberación lisosómica desde los leucocitos polimorfonucleares (PMN). La quimiotaxis de los PMN está muy reducida en pacientes con PJI y en los pacientes que no padecen la enfermedad, lo que sugiere una predisposición genética al desarrollo de PJI.

\**A. actinomycetemcomitans* también produce enzimas capaces de degradar las inmunoglobulinas G, M y A, lo que impide su opsonización por los anticuerpos.

\*Asimismo, algunas cepas de *A. actinomycetemcomitans* producen componentes asociados con células y extracelulares capaces de fijar la región Fc de la moléculas de inmunoglobulina. La presencia de estos componentes en el líquido de los surcos gingivales puede inducir la agregación de inmunoglobulinas e impedir la opsonización de las bacterias.

---

\*Por último este microorganismo también produce fimbrias que iniciarían la adherencia de las bacterias a las células orofaríngeas.

La posibilidad de que estos factores de virulencia desempeñen un papel en la inducción de enfermedad clínica es sugerida por el desarrollo gradual de opsoninas séricas y gingivales y anticuerpos neutralizantes dirigidos contra algunos de estos componentes antigénicos. La instalación de una respuesta inmune podría desempeñar un papel en la contención del proceso periodóntico propiamente dicho, si no se administra tratamiento antimicrobiano, la incapacidad de producir anticuerpos contra el microorganismos o sus productos podría explicar, en parte, el hecho de que algunos pacientes con PJI, padezcan una enfermedad periodóntica más severa y generalizada durante la adultez.

**Características de cultivo e identificación.-** *A. actinomycetemcomitans* desarrolla lentamente en agar chocolate y agar sangre, se pueden visualizar colonias después de 48 a 72 horas. El desarrollo de este microorganismo tiene lugar en ambos medios con agar y las colonias son no hemolíticas, las colonias de *A. actinomycetemcomitans* son pequeñas, lisas, translúcidas y poseen bordes ligeramente irregulares. Los aislamientos clínicos frescos se adhieren al agar y su emulsificación es difícil, la incubación prolongada (de 5 a 7 días) determina el desarrollo de un área densa central que adopta el aspecto de una estrella de 4 o 6 puntas, después de subcultivos repetidos, la superficie de las colonias se torna menos conspicua y las colonias pierden adherencia. La tinción con la técnica de Gram revela cocobacilos gramnegativo pálidos, después de subcultivos repetidos, se pueden observar células más alargadas en los extendidos coloreados.

Las características que permiten identificar *A. actinomycetemcomitans* son la ausencia del desarrollo en agar Mac Conkey y otros medios entéricos con agar y las reacciones positivas para la producción de catalasa y la producción de nitrato, este microorganismo es oxidasa negativo, no produce indol y no requiere factores X o V para su desarrollo, las reacciones para lisina descarboxilasa y la ornitina descarboxilasa son negativas. La mayoría de las cepas de *A.*

---

*actinomycescomitans* fermentan significativamente la glucosa, la fructosa y la manosa. La producción de ácido a partir de maltosa, es manitol y la xilosa es variable; *A. actinomycescomitans* puede diferenciarse de *H. aphrophilus* por la producción de catalasa, la negatividad para ONPG y la ausencia de producción a partir de la lactosa, la sacarosa o la trealosa (cuadro 2). Si bien la tipificación y la caracterización de las cepas de *A. actinomycescomitans* puede lograrse mediante estudios serológicos, también se utilizaron otros métodos tradicionales basados en técnicas moleculares, como la tipificación con el antibiograma, la biotipificación basada en la fermentación de manosa, el manitol y la xilosa; la electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio de proteínas de la membrana externa; el análisis de restricción con endonucleasa del DNA cromosómico total, el polimorfismo de los fragmentos de restricción y la tipificación de ribosomas.

**Sensibilidad a los antimicrobianos.**- Además del desbridamiento subgingival, el legrado y el tratamiento odontológico, el tratamiento antimicrobiano no dirigido contra las bacterias asociadas con la PJI parece esencial para erradicar *A. actinomycescomitans* de las anfractuosidades periodónticas profundas. Estudios *in vitro* indican que todos los serotipos de *A. actinomycescomitans* son sensibles a la tetraciclina, la doxiciclina, el cefactor, la cefuroxima, la ceftriaxona, la combinación trimetoprima-sulfametoxazol, la rifampicina y la ciprofloxacina, se comunicaron resultados variables con penicilina, ampicilina, eritromicina, azitromicina, claritromicina y aminoglucósidos; la azitromicina parece ejercer una mayor actividad que otros macrólidos, incluida la eritromicina contra *A. actinomycescomitans*. Los distintos serotipos de *A. actinomycescomitans* también presentan ligeras diferencias en lo que respecta a la sensibilidad a los antibióticos, la tetraciclina y sus congéneres históricamente han sido los fármacos de elección para tratar infecciones periodónticas por *A. actinomycescomitans*, sin embargo se han reportado casos de resistencia a la tetraciclina, debido a la adquisición de un determinante tetB asociado con un plásmido, por parte del *A. actinomycescomitans*<sup>(11)</sup>.

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para *A. actinomycetemcomitans*<sub>(12,13)</sub>.

Prueba	Reacción	Prueba	Reacción
Catalasa	+	Fermentación Ácida de D-glucosa	+
Oxidasa	+	D-fructosa	+
Fosfatasa	+	D-manosa	+
Ureasa	-	Anoditol	-
Indol	-	L-arabinosa	-
Gelatinasa	-	Lactosa	-
Rojo de metilo	-	Maltosa	+
Lisina descarboxilasa	-	Glicerol	-
Ornitinadescarboxilasa	-	Inositol	-
Arginina dihidrolasa	-	Inulina	-

**Generalidades de *A. actinomycetemcomitans*.**

\* Microscópicas: *A. actinomycetemcomitans* son cocos Gram negativo que miden  $0.7\pm 0.1 \times 1.0\pm 0.4 \mu\text{m}$ , se agrupan en pares o solos, son inmóviles, poseen una microcápsula<sub>(11)</sub>.



---

\* Morfología colonial: Crecen en condiciones de anaerobiosis y sus colonias en agar son pequeñas que miden <0.5 mm de diámetro después de las primeras 24 horas y crecen a 2-3 mm después de 48 horas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37° C<sub>(12,13)</sub>

### **Características de bacterias Gram negativas.**

Todas las bacterias Gram negativas localizadas en el surco gingival están dotadas de endotoxinas las cuales poseen una serie de actividades biológicas directas e indirectas por medio de la inflamación, las más importantes a nivel periodontal son las siguientes:

- Produce de forma indirecta neutropenia al activar células, que liberan mediadores, los cuales estimulan moléculas de adherencia leucocitaria y endoteliales.
- Agrega las plaquetas.
- Activa el factor XII (o factor de Hageman) del sistema de coagulación, determinando una coagulación intravascular. Su activación es un factor importante en el proceso de la inflamación.
- Activa el complemento por la vía alternativa.
- Origina el fenómeno de Schwartzman localizado, consecuencia de dos o más exposiciones a la endotoxina, y que determina necrosis tisular.
- Tiene efecto citotóxico sobre los fibroblastos.
- Inhibe el crecimiento de los fibroblastos.
- Induce la reabsorción ósea, por acción colagenasa, y sobre los osteoclastos del hueso alveolar.
- Determina la liberación de procólagenasas, prostaglandinas.<sup>(14)</sup>

---

## Envoltura celular Gram negativa

Las capas que rodean a la célula bacteriana se conocen en su conjunto con el nombre de envoltura celular. Existen diferencias entre las bacterias Gram positivas y las Gram negativas tanto en su estructura como en su organización. La envoltura Gram negativa es muy compleja. La membrana citoplasmática (llamada membrana interna) está rodeada por una capa de peptidoglicano y junto a ella se encuentra la membrana externa. El espacio entre ambas membranas se denomina espacio periplásmico, de adentro hacia afuera estaría formado por lípido A (endotoxina), core, antígeno O (formado por hexosas)(fig. 6).

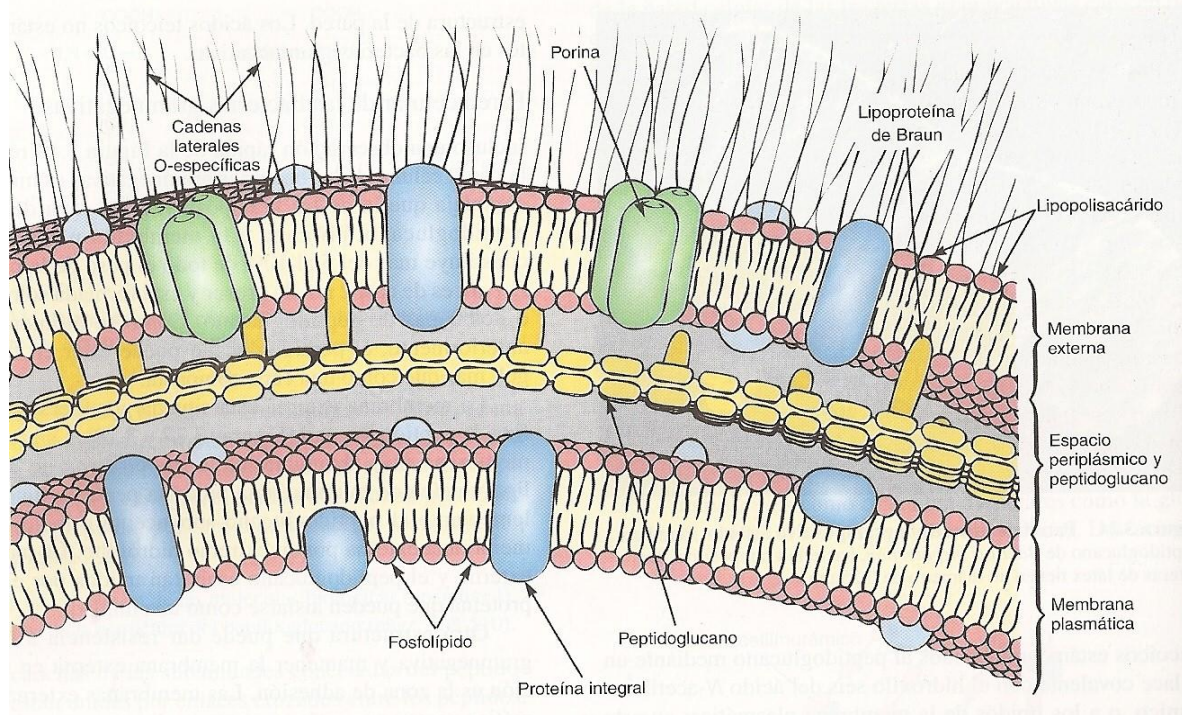


Figura 6. Envoltura Gram negativa<sup>(7)</sup>

Los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gramnegativas, cuando son extremadamente tóxicos, se denominan endotoxinas, muchas de ellas se liberan sólo cuando las células son lisadas.

Los lipopolisacáridos son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que se sitúan desde la cara interna de la membrana externa bacteriana de Gram negativo

---

hacia fuera. Forman colectivamente, en torno al protocito, una capa protectora hidrófila que no puede ser atravesada por moléculas lipófilas<sup>(11)</sup>.

### **Síndrome de Sjögren (SS):**

El SS es una exocrinopatía autoinmune inflamatoria crónica, caracterizada por un infiltrado linfocítico de las glándulas exocrinas, que afecta especialmente a las glándulas salivales y lagrimales. Este síndrome se puede presentar de dos formas, una primaria y otra secundaria. En la forma primaria se observan afectadas las glándulas salivales y lagrimales provocando la aparición de la xerostomía a nivel bucal y de la queratoconjuntivitis seca a nivel de los ojos. En la forma secundaria además de estos síntomas de sequedad, se observan enfermedades asociadas a trastornos en los tejidos colágenos tales como; artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis sistémica progresiva 1,2<sup>(2)</sup>.

### **Manifestaciones glandulares**

\*Sequedad ocular o queratoconjuntivitis seca. La principal causa de esta deficiencia es la atrofia y fibrosis del tejido lagrimal como resultado de un proceso de infiltración destructiva ocasionada por células mononucleares. Los síntomas más frecuentes del paciente son la irritación y sequedad ocular, acompañada de sensación de cuerpo extraño y escozor. En ocasiones se presenta con visión borrosa momentánea y dolor.

\*Sequedad oral o xerostomía. Histológicamente existe un infiltrado linfocítico en las glándulas salivales. La mucosa bucal es seca y eritematosa, la lengua presenta fisuras y úlceras. A menudo hay caries dentales graves. La mitad de los pacientes tienen crecimiento intermitente de la glándula parótida con fluctuaciones rápidas de su tamaño, debido a infiltración celular y obstrucción de los conductos. Este aumento de tamaño, que por lo general es asintomático y puede resolverse espontáneamente, tiene origen inmunológico. Las glándulas más afectadas son las parótidas y las menos, las sublinguales. Existe un signo característico llamado el “signo de la galleta seca”, que describe la dificultad que tiene el paciente al

---

intentar comer alimentos secos a falta de lubricación suficiente. Desarrollan poliuria y nicturia porque el sujeto ingiere cantidades mayores de agua en un esfuerzo por aliviar sus síntomas. La glositis y queilitis angular son manifestaciones de candidiasis bucal en el SS.

### **Manifestaciones extraglandulares**

\*Sequedad dérmica o xerodermia. La xerodermia con o sin prurito, suele ser un signo frecuente en pacientes con SS. Puede haber infecciones secundarias y un tercio de los pacientes refieren fenómeno de Reynaud no evolutivo con carcinoma ocasional. Otras manifestaciones clínicas posibles son la alopecia, fotoalergias, urticaria difusa, que predomina en extremidades inferiores y puede acompañarse de lesiones petequiales, semejando la vasculitis urticariforme y eritemas diversos (multiformes, anulares, etc.) que se parecen a los observados en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y dificultan el diagnóstico.

### **Manifestaciones pleuropulmonares.**

\*La xerotraquea, infecciones recurrentes o la enfermedad obstructiva crónica son las alteraciones de las vías aéreas. Los pacientes con SS primario no refieren mayor sintomatología a nivel respiratorio. La resequedad afecta la mucosa nasal, lo que conduce a epistaxis recurrente, anosmia, tos y disfonía. Otras manifestaciones excepcionales son la vasculitis pulmonar, hipertensión arterial pulmonar, pleuropatía con o sin derrame, pseudolinfoma endobronquial, amiloidosis, etc.

### **Manifestaciones gastrointestinales.**

\*El esófago puede presentar disfagias con atrofia de mucosas y dismotilidad. Hay queilitis angular y se pierde la capacidad de reconocer y degustar los alimentos con base en su sabor y olor. Las formas graves ocasionan al paciente la imposibilidad de comer y de hablar o dolor al hacerlo. Pueden presentarse ulceraciones a nivel de las mucosas, estomatitis infecciosas, gastritis atróficas y en intestino y páncreas, malabsorción o pancreatitis agudas o crónicas. A nivel

---

hepático se pueden encontrar hepatitis autoinmunes, cirrosis biliar primaria (CBP) y fibrosis portal.

### **Manifestaciones articulares y musculares.**

\*La artralgia o artritis, tiene una alta repercusión en los pacientes con SS primario y unida a las mialgias, afectan un 75% del total de pacientes enfermos. La artralgia consiste en una artritis poliarticular, con mayor frecuencia en rodillas.

### **Manifestaciones genito-urinarias.**

\*Un bajo porcentaje de pacientes presenta sequedad y prurito vaginal, acompañado de colpitis, dispareunia y polaquiuria. A nivel renal, un 10% de pacientes con SS tienen manifestaciones nefrológicas, seguido de elevación en el pH de la orina, hipopotasemia o hipercloremia, que caracterizan a la acidosis tubular distal. Estas manifestaciones se encuentran relacionadas con infiltraciones linfocitarias intersticiales del riñón que conducen a la atrofia tubular, fibrosis y, por supuesto, insuficiencia renal.

### **Manifestaciones Neurológicas.**

\*Las manifestaciones de esos pacientes se caracterizan por déficit motor o sensitivo. Presentan encefalopatía aguda y subaguda, meningitis asépticas (con frecuencia recurrentes), demencia y alteraciones cognoscitivas (fallos de memoria y demencia multiinfarto), y alteraciones psiquiátricas. Las hemorragias subaracnoideas e intracerebrales son frecuentes en los pacientes que cursan con vasculitis y anticuerpos anti-Ro y anti-La. El líquido cefalorraquídeo suele tener proteínas normales o ligeramente elevadas, aumento de las IgG con pleocitosis mononuclear. En estos pacientes es frecuente ver el factor reumatoide, anticuerpos Anti Ro/La, y anticuerpos a fosfolípidos y crioglobulinas<sup>(15,16,17,18)</sup>

---

## Patogenia inmunitaria

El síndrome de Sjögren se caracteriza por la existencia de un proceso inflamatorio constituido principalmente por linfocitos T CD4 activados que destruyen progresivamente las glándulas exocrinas, con pérdida del parénquima glandular y la consiguiente disminución de la función de la glándula, también pueden hallarse linfocitos B activados. Los pacientes con SS desarrollan anticuerpos característicos, que incluyen anti-Ro/SSA y anti-La/SSB, estos autoanticuerpos están fuertemente asociados a las formas severas del SS.

La etiología del SS es desconocida, pero todo proceso autoinmune requiere de la coincidencia de al menos cuatro factores: la predisposición genética, factores inductores (microorganismos, fármacos o radiaciones), factores hormonales y los factores psiconeuroinmunológicos como el estrés. Entre los mecanismos implicados en la respuesta inmune alterada de estos pacientes se han propuesto tres líneas principales: anomalías en la regulación linfocitaria periférica y en la selección del repertorio de células T, alteraciones en la proliferación de células B y, finalmente, la expresión de autoantígenos.

Los mecanismos inmunes mediados por células posiblemente desempeñan una función central en la inflamación que lleva al daño tisular en el SS. Las células T CD4 predominan en los infiltrados, tales células son tipo TH1 activadas con base en la presencia de interleucina 2 (IL-2) e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y la ausencia de interleucina 4 (IL-4). Las células epiteliales de las glándulas salivales de los pacientes con SS expresan moléculas HLA clase II (Antígeno Leucocitario Humano, término que se utiliza como sinónimo para referirse a las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad o MHC humano) y moléculas B7 (proteínas coestimuladoras de las células T cooperadoras, lo cual sugiere que su función pudiera ser presentar antígenos a las células T CD4; no obstante, se desconoce la especificidad antigénica de las células T intralesionales. Se dispone de evidencia que sugiere la implicación inmunopatogénica de anomalías de las células B y células plasmáticas, aun cuando estas células son menos abundantes que las células T, también se encuentran en los infiltrados glandulares.

---

Aún no se sabe si la presencia de anticuerpos anti-Ro y anti-La contribuye a la inflamación específica de órgano (glándulas salivales y lagrimales únicamente) en el SS y, en caso de ser así, cómo es que logran hacerlo (3,16,19,20).

La actividad normal de las glándulas salivales es importante para el mantenimiento de la salud bucal. Una de sus funciones está vinculada a la formación, maduración y metabolismo de la placa dental, así como también a la neutralización de los ácidos producidos por las bacterias y el control de la actividad bacteriana.

En los pacientes con SS, la disminución de la secreción salival resulta en severas molestias bucales que interfieren con las prácticas normales de higiene bucal, en consecuencia ocurre una rápida acumulación de placa dental donde los microorganismos acidúricos se encuentran elevados significativamente, provocando un aumento en el índice de caries, pero en cuanto a la enfermedad periodontal existe poca información disponible sobre la relación entre SS y enfermedad periodontal y algunos de ellos relacionan la disminución del flujo salival con la enfermedad periodontal.

Según estudios se observaron que los pacientes con SS presentaban valores elevados para los índices de placa, profundidad de sondaje y pérdida de inserción y un nivel de riesgo 2.2 veces mayor de padecer enfermedad periodontal que los controles sanos, también se reportaron valores más elevados en pacientes con SS cuando se evaluaron diferentes índices periodontales, así como niveles de anticuerpos contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) y *Porphyromonas gingivalis* (Pg) significativamente más elevados. (2)

### **Caracterización del ratón hipotímico CD1 et/et.**

El ratón desnudo et/et fue observado en 1985 en una colonia cerrada no consanguínea de ratones albinos de la cepa CD1 en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México. La alopecia es el resultado de un gen recesivo autosómico simple, el símbolo "et" se ha adoptado para referir la forma mutante. Los ratones et/et son considerados hipotímicos debido a que se encontró que los machos de esta cepa presentan un

---

timo rudimentario que tiene aproximadamente la mitad del peso que presentan los animales eutímicos (+/+); mientras que las hembras et/et presentan una estructura parecida a un ganglio linfático en lugar de timo, y el peso de esta estructura es más bajo que el peso del timo de las hembras eutímicas +/+. Este ratón mutante tiene las siguientes características: desnudo, fertilidad baja, mortalidad alta, vida corta, hipotímico y es común que desarrollen espontáneamente todo el cuadro clínico de una uveoretinitis espontánea (3).

## **INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)**

El inmunoensayo enzimático es una técnica en la cual uno de los reactantes, el anticuerpo o el antígeno, se fija a un soporte sólido antes de su interacción con el reactante complementario. Debido a esta característica de la técnica, esta se describe como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

La técnica es muy versátil y por eso hay diversas variantes de la misma dentro de las cuales las más comunes son el ELISA directo, indirecto, en sándwich y competitivo. En los ELISA directo e indirecto, el antígeno se adsorbe sobre la fase sólida (placas de un plástico especial de 96 pozos o módulos de 8 o 16 pozos); en el ELISA en sándwich las placas “se sensibilizan” con anticuerpos dirigidos contra el antígeno problema. El ELISA directo comúnmente se utiliza para cuantificar antígenos conocidos; el indirecto, para buscar y cuantificar anticuerpos contra antígenos conocidos, el ELISA en sándwich o de captura se utiliza para la búsqueda y cuantificación de antígenos.

Las soluciones para dilución de los reactantes y lavado de los pozos son variadas, la más utilizada es el regulador de fosfatos 0.01 M en solución salina 0.15 M a pH 7.4 (PBS). Algunos recomiendan adicionar Tween 20 al 0.01-0.05% a la solución de trabajo (PBST); otros lo evitan, sobre todo cuando los antígenos son de naturaleza lipídica. Un paso que no se debe obviar en las técnicas de ELISA es el bloqueo de los pozos con soluciones de proteína ajenas al sistema Ag-Ac en estudio. Los bloqueadores más utilizados son albúmina (bovina, humana o de



---

huevo, según el ensayo), gelatina caseína y leche descremada. El bloqueador satura los sitios no ocupados por el reactante inmunológico usado para forrar la superficie de los pozos y evita la adsorción inespecífica de reactantes en los pasos subsecuentes. Los anticuerpos de detección son anticuerpos dirigidos contra alguno de los reactantes (antígeno o anticuerpo problema), acoplado a enzimas.

Las enzimas de mayor uso son la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa, pero no son las únicas. Para el revelado del sistema se utiliza el substrato de la enzima; a veces se requiere del uso simultáneo de un cromógeno (como en el caso de la peroxidasa donde, además de peróxido de hidrógeno se utiliza orto-fenilendiamina o algún otro cromógeno), en otras ocasiones el cromógeno forma parte del substrato como en el caso de la fosfatasa alcalina (p-nitrofenil fosfato) y de la  $\beta$ -galactosidasa (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido). El cromógeno necesario para que el producto resultante tenga algún color. El color se registra en un colorímetro a la longitud de onda ( $\lambda$ ) de máxima absorción del producto coloreado<sup>(21)</sup>.

Cuadro 3. Pasos Generales de la técnica de ELISA<sub>(21)</sub>.

Pasos	ELISA directo	ELISA indirecto	ELISA en sándwich
Forramiento de los pozos con:	Antígeno	Antígeno	Anticuerpo <sup>(5)</sup>
Lavado con regulador fisiológico <sup>(1)</sup> : 3 veces (3x)		3x	3x
Bloqueo <sup>(2)</sup> :	+	+	+
Incubación con:	Ac-enzima <sup>(3)</sup>	Suero problema	Antígeno problema
Lavado con regulador fisiológico:	4x	3x	3x
Incubación con:	-	Ac-enzima <sup>(4)</sup>	Ac-enzima <sup>(5)</sup>
Lavado con regulador fisiológico	-	4x	4x
Adición de sustrato			
(+ Cromógeno) <sup>(6)</sup> :	+	+	+
Detención de la reacción <sup>(7)</sup>	+	+	+
Lectura a la $\lambda$ apropiada <sup>(8)</sup> :	+	+	+

(1) Solución salina (pH 6), solución salina-fosfatos (pH7.4), solución salina-boratos (pH 8.4), etc. Algunos adicionan Tween 20 del 0.01 al 0.05% a la solución de lavado, otros no lo hacen.

(2) Solución de albúmina, caseína, gelatina o leche descremada al 2-3% en el regulador fisiológico.

(3) Anticuerpo contra el antígeno, acoplado a una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, etc.)

(4) Anticuerpo contra la inmunoglobulinas de la especie problema (suero problema), acoplado a una enzima.

(5) Anticuerpos contra el antígeno problema, el primer anticuerpo (de captura) usualmente es monoclonal, el segundo anticuerpo (de detección), acoplado a una enzima, casi siempre es policlonal.

(6) El sustrato y el cromógeno (cuando este es necesario) dependen de la enzima.

(7) La reacción se detiene con diferentes reactivos, dependiendo del cromógeno.

(8) La longitud de onda ( $\lambda$ ) de la lectura depende del color del producto de la reacción enzima-sustrato-cromógeno.

---

ELISA.- Los enzimoimmunoanálisis (ELISA) se basan en dos fenómenos biológicos importantes:

1. La elevada especificidad de los anticuerpos (Ac);
2. La alta actividad de algunas enzimas usadas en esta tipo de ensayos, lo que permite la amplificación de la señal generada por la muestra.

Independientemente de los esquemas experimentales empleados, los ELISA comprenden dos etapas generales:

1. La reacción de un inmunorreactante con un antígeno (Ag) o anticuerpo(Ac)
2. La detección de ese inmunorreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático.

La sencillez de los ELISA, sumada a la potencialidad de los anticuerpos monoclonales (AcMo), hace que día a día se vayan imponiendo sobre métodos tales como aquellos basados en la utilización de un trazador radiactivo (radioinmunoanálisis RIA), un trazador emisor de luz (quimioluminiscencia) o un trazador fluorescente (fluorografía). La gran ventaja del ELISA sobre los otros métodos reside en que no requiere equipo demasiado sofisticado para su implementación en el laboratorio. Además los reactivos empleados son de una vida media muy elevada (en el caso del RIA, un trazador radiactivo marcado con yodo tiene una vida media de 60 días, mientras que un conjugado enzimático usado en ELISA suele conservarse en buen estado durante años) y no se corre el riesgo de contaminación producida por el manipuleo de isótopos radiactivos.

Clasificación de los enzimoimmunoanálisis:

- a) Homogéneos
- b) Heterogéneos

---

Los primeros se realizan exclusivamente en fase líquida, mientras que en los segundos se emplea un soporte sólido para inmovilizar a uno de los inmunoreactantes.

Los heterogéneos pueden clasificarse en dos tipos:

1. Enzimoanálisis de actividad o no competitivos.
2. Enzimoanálisis de modulación de actividad<sup>(22)</sup>.

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La periodontitis es causada por diferentes microorganismos la cual se inicia por la inflamación del periodonto y finalmente en perdida dental. Esta enfermedad es de mayor prevalencia en personas que padecen el síndrome de Sjögren<sup>(2)</sup>. Actualmente en México no se cuenta con técnicas rápidas y eficaces para la determinación de *A. actinomycetemcomitans* que como es sabido es uno de los principales microorganismos causantes de la periodontitis. El ratón et/et con exocrinopatía espontánea que semeja el síndrome de Sjögren, es un buen modelo para el estudio de la infección con este microorganismo y por lo tanto nos permitiría la estandarización de una técnica sensible y eficaz para la detección de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

---

## OBJETIVOS

- Estandarizar la técnica de ELISA ligado a polimixina para la detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras de lavados gingivales en ratones et/et.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener y purificar LPS bacteriano de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- Obtener antígeno "O" e inmunizar un conejo Nueva Zelanda.
- Elaborar conjugados anti LPS-peroxidasa de rábano picante.
- Determinar el título del conjugado anti LPS por ELISA ligado a polimixina.

---

## HIPÓTESIS

La susceptibilidad del ratón et/et será mayor a la infección con *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que los ratones et/+ y +/+, debido a que el ratón et/et presenta la exocrinopatía espontánea y la estandarización de la técnica se podrá realizar debido a que en los ratones infectados, se detectará la presencia de LPS específico.

---

## DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

### **Tipo de estudio:**

Experimental.

Prolectivo.

Longitudinal.

**Población en estudio:** 30 ratones de la cepa CD1: 10 +/+ (progenitores), 10 et/+ (heterocigotos) y 10 et/et (mutantes) proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Los ratones usados en este estudio fueron alimentados con alimentos para roedores LabChow 5001 Agribrands purina (México) y recibieron agua *ad libitum*. El cuidado y manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a la guía de uso y cuidado de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999)

**Criterios de inclusión:** Ratones de la cepa CD1: +/+, et/+ y et/et de aproximadamente 25 semanas de edad, con un peso promedio de 30 gramos que no presenten ningún padecimiento.

**Criterios de exclusión:** Ratones de la cepa CD1: +/+, et/+ y et/et que no se encuentren entre la edad y peso requerido.

**Criterios de eliminación:** Ratones que mueran en el proceso de la investigación.

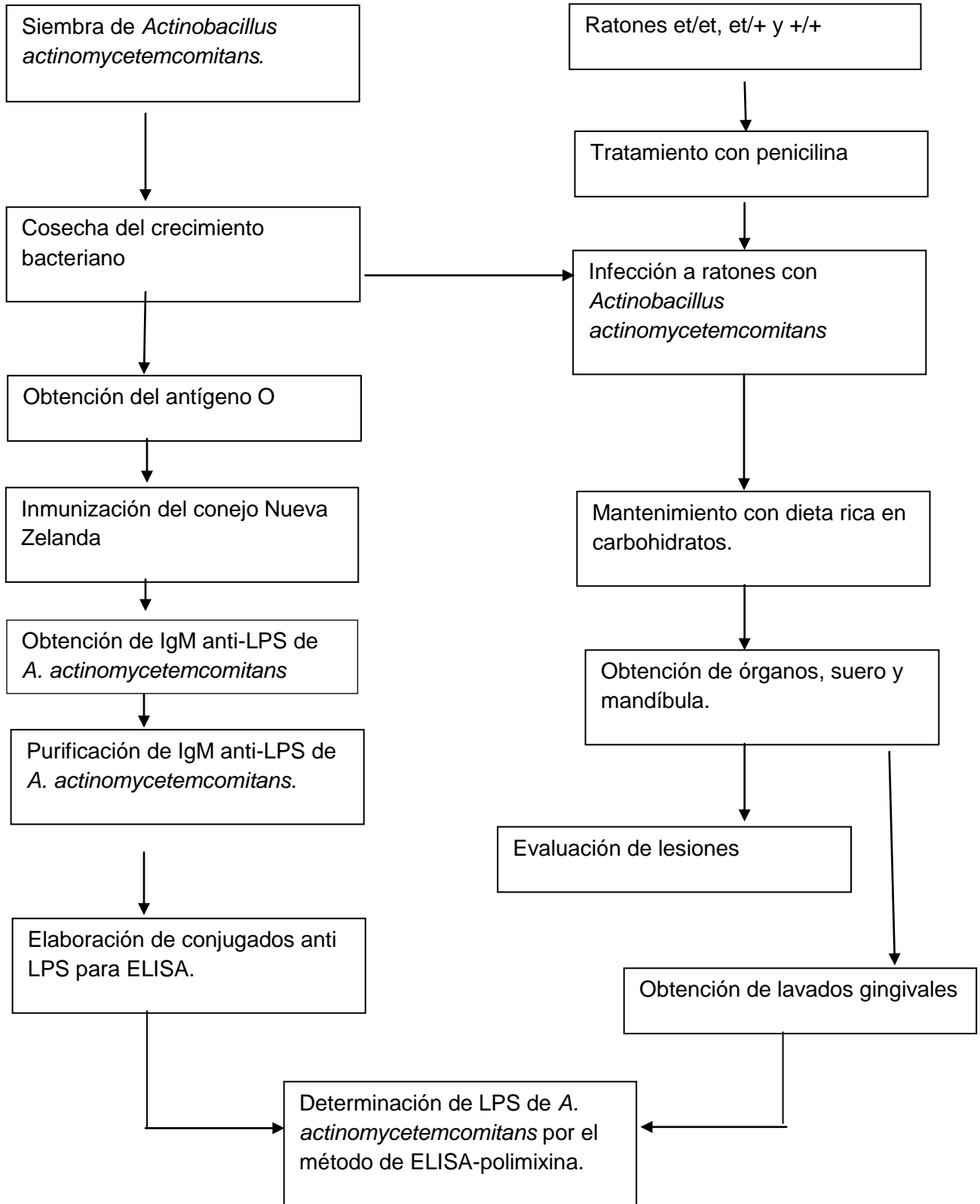
**Variable dependiente:** Exocrinopatía espontánea de los ratones et/et y edad.

**Variable independiente:** Sexo de los ratones.



---

## DIAGRAMA DE FLUJO



---

## MATERIAL Y METODOS

### Material Biológico

- Cepa de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 tipo AB
- Sangre desfibrinada

### Equipo

- Balanza granataria, OHAUS
- Balanza analítica, OHAUS
- Olla de presión 21 L, Presto
- Sistema anaerobio BBL Gas Pack
- Centrífuga, Damon IEC Disión
- Incubadora, ShelLab
- Refrigerador, Whirpool
- Microscopio, ZEISS
- Vortex modelo K, scientific industries Inc
- Espectrofotómetro UV/Visible, Jenway 6305
- Lector de ELISA, Awareness Technology Inc

### Instrumental

- Algodón
- Asa bacteriológica
- Cajas Petri estériles de 100 x 15 cm
- Cronómetro
- Filtro analítico estéril, Nalgene
- Filtro estéril de 0.2  $\mu\text{m}$
- Gasas
- Jeringas estériles desechables de 1 mL
- Masking tape
- Mechero Fisher y manguera para gas 1.5 m
- Membrana de celulosa de 21 x 33 mm 12000 Daltons
- Papel aluminio, alupack
- Papel estraza

- 
- Parafilm M de 4 pulgadas
  - Pinza de tres dedos con nuez
  - Pipeta semiautomática de 5  $\mu\text{L}$  a 40  $\mu\text{L}$ , 40  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  a 1000  $\mu\text{L}$
  - Placa de microtitulación para ELISA de alta unión Nunc Dinamarca.
  - Portaobjetos, Corning
  - Soporte Universal
  - Material de vidrio
  - Columna de vidrio de 1 x 50

### Reactivos

- Acetona J.T. Baker
- Ácido cítrico, Hycel de México, S.A de C.V.
- Ácido sulfúrico, J.T. Baker
- Agua destilada
- Azul brillante, Sigma Chemical Co
- Bicarbonato de Sodio, J.T Baker
- Carbonato de Sodio, J.T Baker
- Cloruro de Sodio
- Colato de Sodio Sigma Ch, Co.
- Cristal Violeta, SIGMA
- Dextrán azul
- Eritrocina
- Etanol,, J.T Baker
- Éter de petróleo, J. T Baker
- O-Fenilendiamina Sigma Ch Co.
- Fenol, J.T Baker
- Formaldehido, J.T Baker
- Fosfato de sodio dibásico
- Glutaraldehido, SIGMA Chemical
- Hemina, SIGMA
- Lisina, Sigma Chemical
- Lugol, Hycel de México
- Ortofenilendiamina,
- Oxalato de amonio
- Penicilina
- Peroxidasa de rábano, Sigma Chemical
- Polimixina
- Resarsulina
- Safranina "O" SIGMA
- SEPHADEX G-200

- 
- Solución acuosa de cloruro de sodio al 85%, Hycel de México
  - Solución Ringers
  - Sacarosa
  - Sulfato de polimixina
  - Timerozal, SIGMA
  - Tween 20
  - Vitamina K, SIGMA
  - Yodo
  - Yoduro de potasio

### **Medios de cultivo**

- BHI agar, DIBICO S.A. de C.V.
- Caldo Tioglicolato, Diagnóstico Merck
- Extracto de levadura, Bioxon
- Soya tripticaseina agar, DIBICO S.A. de C.V.
- Tioglicolato agar, Bioxón.

---

## MÉTODO

### **Cultivo de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* tipo AB ATCC 43748:**

1. Preparación de 500 mL de medio de cultivo en caja de Petri.

Formula:

- Agar soya tripticaseína, DIBICO 50%
- Agar BHI, DIBICO 50%
- Extracto de levadura, Bioxon 0.5%
- Hemina 5 µg/mL
- Menadiona (vit. K) 1 µg/mL
- Sangre desfibrinada de cordero 5%

1.1. Pesar 10 g de agar soya tripticaseína, 7.3 g de agar BHI y 2.5 g de extracto de levadura

1.2. Disolver en 500 mL de agua destilada y esterilizar a 121° C /15 lb /in<sup>3</sup> durante 15 minutos.

1.3. Dejar enfriar hasta una temperatura de 50° C.

1.4. Adicionar en condiciones estériles 10 mL de sangre de carnero (5%) aséptica y desfibrinada.

1.5. Adicionar en condiciones estériles 5 mL de la solución madre de hemina y 0.5 mL de la solución de menadiona

1.6. Mezclar y vaciar, a 10 cajas de Petri estériles, esperar a que solidifiquen.

1.7. Realizar a una de las cajas una siembra estriada de la cepa ATCC 43748 de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

1.8. A las 9 restantes se siembran masivamente en las cajas de Petri e incubar a 36° C en condiciones de anaerobiosis (utilizando una cámara de anaerobiosis con anaerocult A de Merck) durante 24-72 horas.

---

1.9. Se seleccionó una colonia aislada para leer morfología colonial y hacer tinción de Gram.

1.10. A cada caja de Petri sembrada se agregan 5 mL de solución salina estéril, resuspendiendo los microorganismos y recolectando los 5 mL de biomasa en un tubo estéril y libre de pirógenos.

## 2. Preparación de caldo BHI-hemina-menadiona en tubos de ensaye.

Fórmula:

- Caldo BHI
- Extracto de levadura 0.5%
- Hemina 5µg/mL
- Menadiona 1µg/mL

2.1. Se pesan 7.4 g de caldo BHI y 10 g de extracto de levadura.

2.2. Se disuelven en 200 mL de agua destilada.

2.3. Se dosifican 15 mL a 10 tubos de ensaye

2.4. Se tapan y se esterilizan a 121° C /25lb /in<sup>3</sup> durante 15 minutos.

2.5. Dejar enfriar y adicionar en condiciones de esterilidad 0.15 mL de la solución de hemina y 0.015 mL de menadiona a cada tubo.

2.6. Sembrar con *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 43748

2.7. Incubar a 36° C en condiciones de anaerobiosis (utilizando una cámara de anaerobiosis con Anaerocult A de Merck) durante 24-72 horas.

## 3. Preparación de caldo tioglicolato-hemina-menadiona

Fórmula:

- Caldo Tioglicolato
- Suero de conejo 2%
- Hemina 5 µg/mL
- Menadiona 1 µg/mL

- 
- 3.1. Se pesan 5.9 g de caldo tioglicolato.
  - 3.2. Se disuelven en 200 mL de agua destilada y se distribuyen en 10 tubos de 18X150 con tapa de vaquelita (15 mL cada uno).
  - 3.3. Se esteriliza a 121° C /25lb /in<sup>3</sup> durante 15 minutos
  - 3.4. Se deja enfriar a 50° C.
  - 3.5. Se agrega de forma aséptica 400µL de suero de conejo por tubo.
  - 3.6. Adicionar en condiciones de esterilidad 0.15 mL de la solución de hemina y 0.015 mL de menadiona por tubo.
  - 3.7. Sembrar con *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
  - 3.8. Incubar a 36° C en condiciones de anaerobiosis (utilizando una cámara de anaerobiosis con anaerocult A de Merck) durante 24-72 horas.

**Preparación del antígeno O de *Actinobacillusactinomycetemcomitans* (LPS)Westphal y Galanos<sup>(23)</sup>.**

1. Se cosecha el crecimiento obtenido agregando 2 mL de solución salina 0.85% estéril y agitando vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea. Este paso se repite.
2. Se colectaron los lavados en una botella que se calibró con otra para ser centrifugada a 2094.54 g (6000 rpm) durante 1 hora.
3. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 100 mL de solución salina al 0.85% así hasta completar cinco lavados.
4. Se resuspendió el botón con un mL de solución salina al 0.85% estéril.
5. En dos tubos se colocaron 3 mL de solución salina y se agregó gota a gota la suspensión de bacterias hasta igualar al tubo 1 del nefelómetro de McFarland (concentración aprox de 2.5X10<sup>8</sup> UFC).
6. Se pusieron los tubos a ebullición por dos horas, se dejaron enfriar y se refrigeraron.
7. Estas soluciones se utilizaron para la inmunización.

---

## GENERACIÓN DEL SUERO ANTI-LPS EN CONEJO Y PURIFICACIÓN DE IgM<sub>(24)</sub>

### Inmunización de conejo Nueva Zelanda.

Se inmunizó un conejo Nueva Zelanda blanco cuyo peso fue de 2,800 g con antígeno O (LPS) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* igualado al tubo 1 del nefelómetro de McFarlan por vía intravenosa, siguiendo los siguientes tiempos:

Cuadro 4. Protocolo de inmunización

Día	Volumen (mL)
0	0.25
3	0.25
7	0.30
10	0.30
16	Sangrar

Obtención de suero de conejo inmunizado.

1. Se anestesió al conejo utilizando éter en un algodón.
2. Se rasuró en la zona del pecho y se sanitizó con alcohol-yodo al 2%.
3. Se obtuvo sangre por punción cardíaca con una jeringa de 20 mL (toda la sangre posible).
4. Se incubó a 37°C durante 1 hora para retraer coágulo.
5. Se separó el suero a través de centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos.
6. Se agregó timerozal al 0.1% (0.01 g por cada 100 mL de suero).
7. La mitad se refrigeró y la otra mitad se congeló a -20°C



---

## Purificación de IGM. anti-LPS<sub>(24)</sub>

1. Montaje de columna SEPHADEX.
  - 1.1 Se pesaron 17g de peso seco de SEPHADEX G-200 en un litro de agua destilada, se mantuvo en ebullición durante cinco horas, esto provee suficiente gel para una columna de 100 cm por 2.5 cm de diámetro.
  - 1.2 Se dejó enfriar el gel a temperatura ambiente y se desgasificó con una bomba de vacío.
  - 1.3 Se colocó la columna en posición vertical sobre un soporte universal y sujetada con una pinza de tres dedos, se agregó amortiguador de fosfatos (PBS) hasta la mitad de la columna y después se adicionó con agitación el SEPHADEX hasta llenar la columna, se abrió la válvula y poco a poco se fue dejando ir el PBS y simultáneamente agregando más SEPHADEX hasta tener llena la columna con éste.
  - 1.4 Se llenó la columna con amortiguador y no permitiendo que se seque el gel. Se colocó un depósito de amortiguador y se mantuvo un sistema cerrado entre la columna y el depósito de tal manera que cuando salió un volumen de la columna fuera el mismo volumen que entró del depósito, se mantuvo el mismo nivel en la columna.
  - 1.5 Se dejó que sedimentar toda la noche.
  - 1.6 Se calculó el volumen vacío de la columna usando dextrán azul al 1%. Por arriba de la columna se agregó 1 mL de dextrán azul al 1% y se esperó hasta la obtención del colorante en la parte de abajo, el volumen recolectado durante ese tiempo fue el volumen vacío.
2. Se dejó pasar 4 mL de suero de conejo obtenido anteriormente (anti LPS) a la columna y se dejó eluir con solución salina amortiguadora de fosfatos a 0.1 M a pH 6.8 (PBS).
3. Después de que salió el volumen vacío, se obtuvo en el colector de fracciones muestras de 3 mL en tubos de ensayo.
4. Se realizaron las lecturas de las fracciones a 280 nm.

- 
5. La fracción donde se encontró el primer pico de lectura del espectrofotómetro a 280 nm es la que contuvo IalGM.
  6. Se cuantificó la fracción y se ajustó a 5 mg/mL de anticuerpo con solución salina estéril; si la concentración es menor, proceder a concentrar en tubos de amicon.

## **ELABORACIÓN DEL CONJUGADO**

Realización del acoplamiento del conjugado.

1. Se disolvieron 10 mg de peroxidasa de rábano picante en 0.2 mL de solución amortiguadora de salina de fosfato (PBS) 0.1 M a un pH de 6.8, que contiene 1.25% de glutaraldehído.
2. Se dejó reposar 18 horas a temperatura ambiente.
3. Se eliminó el glutaraldehído en cromatografía con sephadex G 25 o por diálisis, se estabiliza con solución salina al 0.85%
4. Se concentró a 1 mL usando tubos de amicon de Milipore (ultrafree-CL) y adicionar un mL de IgM a 5 mg/mL en solución salina y 0.1 mL de amortiguador de bicarbonato de sodio – carbonato de sodio 1 M a un pH de 9.5.
5. Se agitó suavemente y se dejó a temperatura ambiente de 4°C durante 24 horas. Se adicionaron 0.1 mL de lisina al 0.2 M en PBS.
6. Se dejó a temperatura ambiente por dos horas y se dializó contra PBS a 4°C por 2 días, utilizando una membrana G12 000.
7. El conjugado se separó de la peroxidasa libre por diálisis contra agua destilada, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos.
8. El conjugado precipitó y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en un mL de PBS adicionando timerozal o formalina hasta una concentración de 0.01% como conservador.
9. Se conservó en refrigeración hasta su uso.

---

## **INFECCIÓN A RATONES CD1 et/et, et/+ y +/+(25).**

1. Se pesaron los ratones provenientes del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y se marcaron.
2. En un litro de agua se adicionaron 5 ampolletas de penicilina procaína de 800 000 U para obtener una concentración final de 4000 U/mL.
3. Se dosificó el agua-penicilina en 3 bebederos y se pusieron uno en cada jaula para deprimir la flora microbiana de los ratones durante 3 días
4. Se infectó cada ratón con 0.1 mL de los LPS a una concentración aprox. de  $2.5 \times 10^8$  UFC diariamente durante 5 días a través de una sonda gástrica.
5. Se mantuvieron durante 11 semanas con la dieta 2050 rica en carbohidratos, esto es 56% sucrosa y 28% extracto de maíz.

## **OBTENCIÓN DE SUERO DE RATÓN**

1. Se anestesia a cada ratón en una cámara de éter.
2. Con un bisturí se hace una incisión en la axila y se recolecta la sangre en un tubo Eppendorf.
3. Separar el suero y guardarlo en congelación ( $-20^{\circ} \text{C}$ ) hasta su uso.

## **OBTENCIÓN DE LAVADOS GINGIVALES**

1. Utilizando una jeringa de 1mL estéril, con solución salina estéril, se depositó a presión sobre el tejido gingival, recolectando esta misma solución y volviendo a realizar el lavado (este procedimiento se repite 3 veces).
2. El último lavado se colectó con la misma jeringa y se depositó en un tubo de 13 X 75 libre de pirógenos.
3. Se congeló a  $-20^{\circ} \text{C}$  hasta su uso.

## **OBTENCIÓN DE ÓRGANOS**

1. Se pesó cada uno de los ratones y con la ayuda de un bisturí y pinzas de disección se obtuvieron bazo, hígado y riñón; tomando el peso y características de los mismos, se conservaron en formalina al 10%.

- 
2. A partir de los valores del peso final de los animales y el valor del peso de los órganos se obtuvo el índice renal, hepático y esplénico usando la siguiente fórmula:

$$IO = \left[ \frac{Po}{PT} \right] \times 100$$

Donde:

IO = índice de órganos (hepático esplénico o renal según corresponda).

Po = peso del hígado bazo y riñón de cada uno de los ratones.

PT = peso total de los ratones antes del sacrificio.

### **OBSERVACIÓN DE DAÑO EN EL PERIODONTO.**

- Una vez obtenido el suero y los órganos de los ratones, se degollaron.
- Cada una de las cabezas se sumergen en una solución de eritrosina al 1% (100g de eritrosina en 1 litro de agua destilada) durante 1 minuto.
- Observar con la ayuda del equipo de microscopia portátil (DINOlay).

### **OBSERVACIÓN DE LESIONES EN HUESO<sub>(26)</sub>.**

- Envolver cada una de las cabezas en papel.
- Esterilizar a 121° C durante 15 minutos a 15 lb de presión, descarnar completamente.
- Colocarlas en un recipiente con KOH al 1% durante 48 horas.
- Lavar los cráneos al chorro de agua para eliminar por completo el KOH sin que los huesos se dañen.
- Observar con la ayuda del equipo de microscopia portátil (DINOlay).

### **REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA – POLIMIXINA B<sub>(27)</sub>**

1. Se disuelven 50 µg/mL de Sulfato de polimixina B para el pegado de la polimixina en solución amortiguadora (de fosfatos 0.01M con 0.85% de cloruro de sodio) y se colocan 100 µL en cada pozo de una placa de ELISA de alta adherencia Costar, se deja a 37°C durante 16 horas, se lavan 4

---

veces los pozos con PBS-tween al 0.05% y se le colocan 100  $\mu$ L de la muestra biológica tratada\* en cada pozo. Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se le adiciona 100  $\mu$ L del sustrato con cromógeno (o-fenilendiamina), se incuba a 37°C por 30 minutos y se leen las placas en un lector de ELISA AwarenessTechnology INC, a 450nm.

2. Se colocan muestras negativas y con la siguiente fórmula se calcula el corte (cut off).  $\text{Corte} = \text{Media de los valores negativos} + 2 \text{ desviaciones estándar de la media}$ . 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.

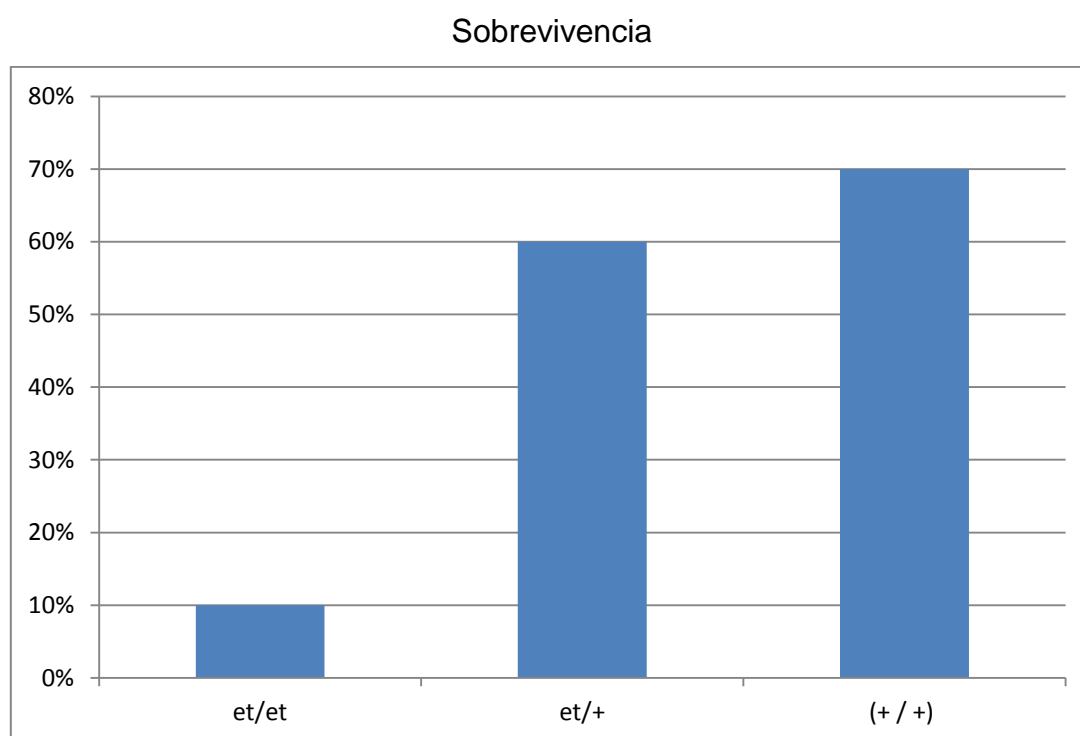
\*Tratamiento de la muestra: Se agrega a 100 $\mu$ L de la muestra, más 125 $\mu$ L de PBS y otros 25  $\mu$ L de colato de sodio al 5%, se calientan durante 12 minutos a ebullición, posteriormente se enfría y se centrifuga a 3500 rpm por 5 minutos y se toman 100  $\mu$ L, para realizar el ensayo de ELISA.

---

---

## RESULTADOS

1. Susceptibilidad.- Los ratones et/et mostraron una alta susceptibilidad a la bacteria (10% de sobrevivencia al final del ensayo), los ratones portadores del gen et mostraron 60%, y los ratones +/+ del 90% como se muestra en la siguiente gráfica.



Gráfica 1. Porcentaje de sobrevivida después de 11 semanas, con un inculo en cavidad oral de  $2.5 \times 10^8$  bacterias/mL.

---

## 2. Observación de lesiones de dientes y encías

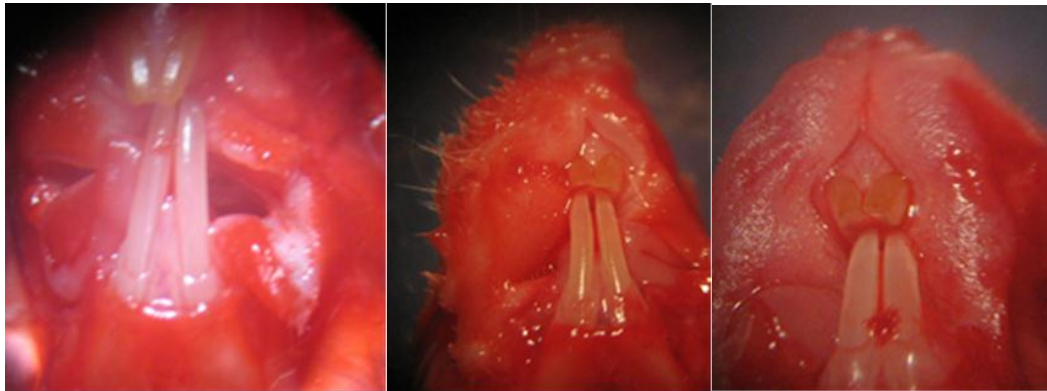


Figura 7. Ratón +/+

Ratón et/+

Ratón et/et

Observación de lesiones en encías y dientes con tinción de eritrosina al1%.- Se observaron lesiones en dientes, retracción de encías y caries, siendo mayor en las portadoras del gen et/+ (fig. 7)

---

3. Observación de lesiones en hueso.



Figura 8. Resorción en el ápice de los dientes, que afecta a las dos terceras partes de la longitud total de la raíz, pérdida del hueso interalveolar con márgenes incongruentes. Maxilar inferior de la mandíbula del ratón CD1 +/+



Figura 9. Resorción en el ápice de los dientes que afecta a las dos terceras partes de la longitud total de la raíz, pérdida del hueso interalveolar con márgenes incongruentes. Maxilar inferior de la mandíbula del ratón CD1 et/+





Figura 10. Resorción moderada en el ápice de los dientes, que afecta la tercera parte de la longitud total de la raíz, no existe pérdida del hueso interalveolar, los márgenes son incongruentes sobre un diente sin afectar el hueso del diente contiguo. Mandíbula del ratón CD1 et/et.

4. Contraste de Hipótesis para las medias de Índices de órganos.- Se realizó un contraste de hipótesis acerca de la diferencia de medias, tomando las medias de los índices renal, hepático y esplénico (cuadro 5). Descartándose la cepa de ratones et/et debido al bajo porcentaje de sobrevivencia.

Cuadro 5. Medias de los índices renal, hepático y esplénico de las cepas de ratones et/+ y +/+.

Cepa	et/+	+/+
Índice renal	1.1957	1.0796
Índice hepático	5.4128	5.6832
Índice esplénico	0.5148	0.5355

---

En la hipótesis nula (Ho) se propuso la igualdad de medias, con varianzas poblacionales desconocidas (se comprobó con una prueba de Fisher).

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_a: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

Usando la distribución t de Student, Ho se rechaza si:  $-2.201 \leq t_{\text{calculada}} \leq 2.201$

Haciendo los cálculos correspondientes se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 6. t calculada de las medias de índice de órganos.

	Riñón	Hígado	Bazo
t calculada	1.12557	- 1.4406	-1.0456
Ho	No se rechaza	No se rechaza	No se rechaza

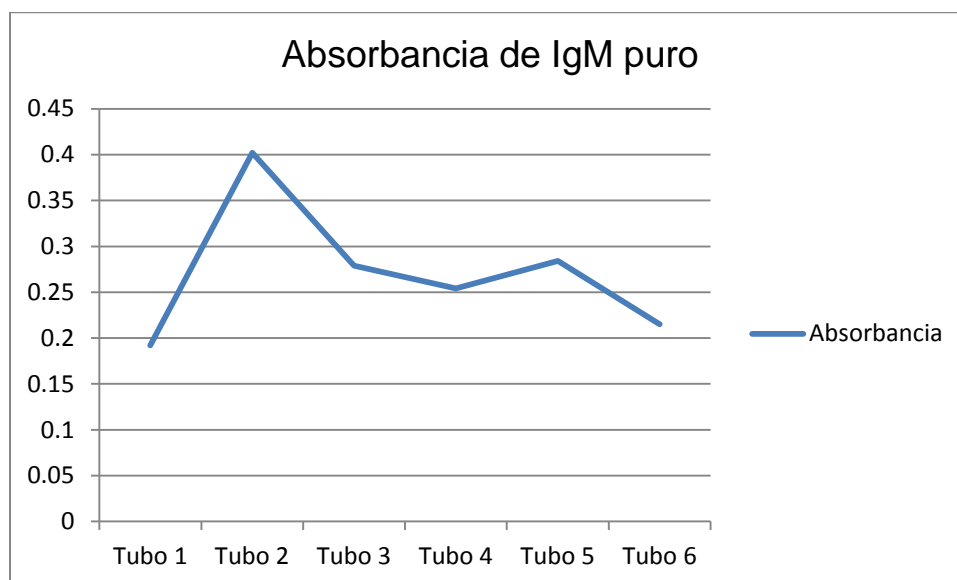
Ninguna Ho se rechazó por lo que se concluye que no existe diferencia significativa entre las medias de los índices de órganos de los ratones et/+ y +/+. No se incluyó a los ratones et/et debido a que solo el 10% sobrevivió.

5. De la biomasa obtenida de *A. actinomycetemcomitans* se obtuvo el antígeno O, este antígeno se utilizó para la inmunización de un conejo Nueva Zelanda y una vez obtenido el suero se purifica la IgM anti LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Para la purificación de IgM se colocaron 4 mL de suero anti LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en la columna G200 y se corrió con PBS. Vol vacío = 14 mL

6. Se hizo lectura en espectrofotómetro Jenway 6305 UV/Vis a 280 nm. Dando las siguientes lecturas:

Cuadro 7. Absorbancias de las fracciones de IgM puro.

Tubo	Absorbancia
1 (blanco)	0.192
2	0.402
3	0.279
4	0.254
5	0.284
6	0.215



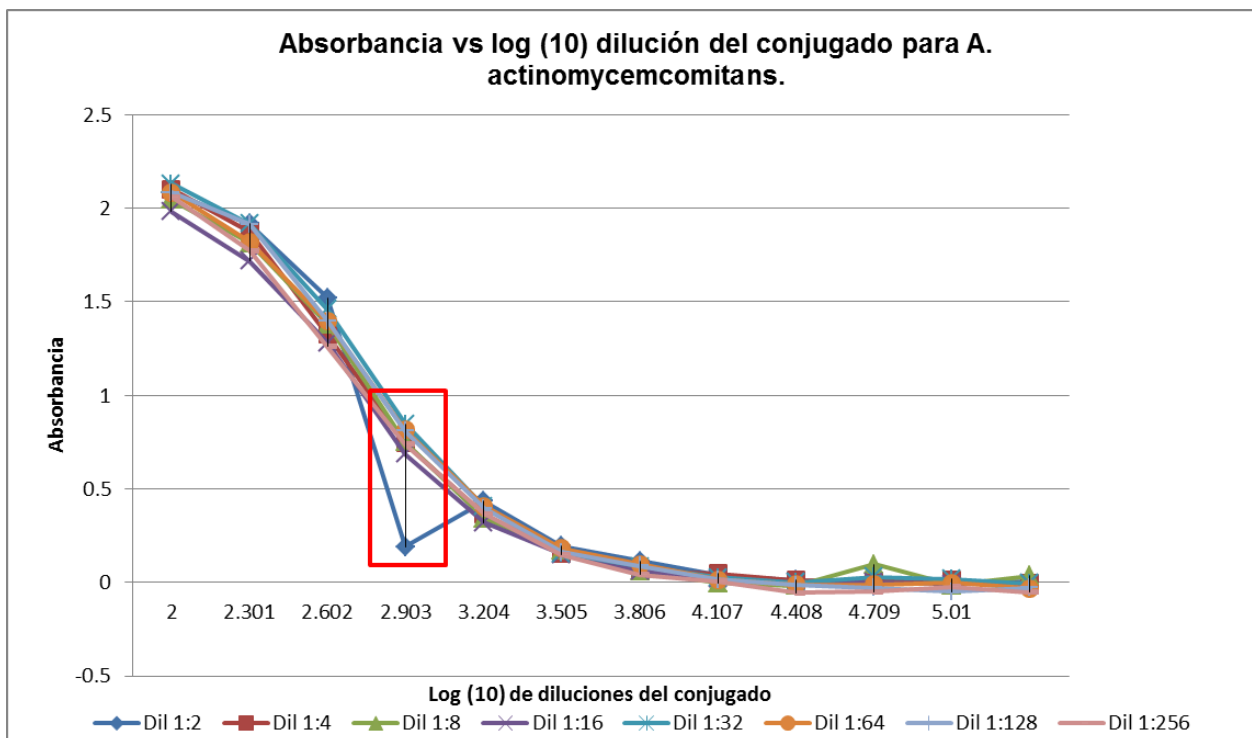
Grafica 2. Absorbancias de las fracciones obtenidas en la purificación de IgM a 280 nm.

7. Elaboración de conjugado.- Para la elaboración del conjugado se eligió la fracción con mayor contenido de IgM en este caso la fracción 1 (tubo 2) con una absorbancia de 0.402 (marcado en rojo en el cuadro 7).

8. Se realizó la titulación del conjugado. Siendo la dilución óptima de 1:800. La disposición de la placa de ELISA para la determinación del título del conjugado en tablero de ajedrez, vertical y nombradas con letras las diluciones de LPS, en horizontal y marcadas en café el logaritmo de las diluciones del conjugado anti-LPS obtenido (cuadro 8) y se grafican (grafica 3).

Cuadro 8. Placa de ELISA para el título del conjugado

Log (10) Dilución del conjugado														
		2	2.3	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0	--	
Dilución LPS	8	A	2.084	1.916	1.521	0.912	0.433	0.193	0.114	0.038	0.013	-0.002	0.001	-0.005
	16	B	2.102	1.872	1.324	0.744	0.364	0.157	0.066	0.048	0.013	0.009	0.012	-0.005
	32	C	2.047	1.815	1.382	0.75	0.345	0.172	0.058	-0.001	-0.016	0.098	-0.01	0.037
	64	D	1.983	1.719	1.28	0.685	0.321	0.151	0.062	0.018	0.000	-0.002	-0.007	-0.005
	128	E	2.13	1.918	1.461	0.848	0.405	0.155	0.086	0.027	0.001	-0.03	0.018	-0.004
	256	F	2.084	1.82	1.395	0.814	0.409	0.181	0.098	0.016	-0.011	-0.01	-0.002	-0.031
	512	G	2.084	1.914	1.399	0.811	0.397	0.163	0.088	0.014	-0.015	-0.03	-0.049	-0.028
	--	H	2.062	1.775	1.26	0.738	0.368	0.147	0.042	0.006	-0.054	-0.049	-0.024	-0.053



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

9. Utilizando la dilución 1:800 se realiza la determinación de LPS en una placa de ELISA obteniéndose los siguientes resultados.

Cuadro 9. Disposición de las muestras en la placa de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	PBS	1:4	1:8	1:16	1:32	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
C	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Muestras de ratones 1-14 (1 ratón et/et, 2-7 ratones et/+ y 8-14 ratones +/+)

Controles positivos pozos con LPS a diluciones de 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32

Controles negativos pozos con PBS.

Cuadro 10. Resultados de ELISA-polimixina B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.115	0.131	0.115	0.086	0.165	0.07	0.108	0.108	0.233	0.14	0.09	0.09
B	0.11	0.082	0.135	1.376	1.296	1.363	1.39	0.14	0.15	0.06	0.122	0.12
C	0.13	0.089	0.20	0.077	0.079	0.049	0.057	0.051	0.072	0.068	0.103	0.09

### 9.1 Determinación del valor de corte en la placa de ELISA.

9.1.1. Determinar la media y desviación estándar de las absorbancias de los 18 controles negativos (PBS)

0.135	0.14	0.15	0.06	0.122	0.12
0.13	0.089	<b>0.202</b>	0.077	0.079	0.049
0.057	0.051	0.072	0.068	0.103	0.09

#### Estadística descriptiva

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación STD
<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i>	18	0.049	0.202	0.10133	0.03350

Corte = Media + 2 Desviaciones estándar.

$$\text{Corte} = 0.10133 + (2 \times 0.03350) = \mathbf{0.16833}$$

9.1.2. Los datos mayores al valor de corte (rojo) se descartan y se recalcula el valor de corte.

#### Estadística descriptiva

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación STD
<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i>	17	0.049	0.154	0.095411	0.03707

---

Corte = Media + 2 Desviaciones estándar.

$$\text{Corte} = 0.095411 + (2 \times 0.03707) = \mathbf{0.169551}$$

Todos los valores mayores a 0.16955 son POSITIVOS (color rojo)

Cuadro 11. Valores positivos para en la placa de ELISA-polimixina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.115	0.131	0.115	0.086	0.165	0.07	0.108	0.108	<b>0.233</b>	0.14	0.09	0.09
B	0.11	0.082	0.135	1.376	1.296	1.363	1.39	0.14	0.15	0.06	0.122	0.12
C	0.13	0.089	0.20	0.077	0.079	0.049	0.057	0.051	0.072	0.068	0.103	0.09

---

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La respuesta de los ratones hipotímicos et/et a la infección con *A. actinomycetemcomitans* nos indica que tienen problemas para manejar la infección, ya que dicho manejo es dependiente de linfocitos T. La alta susceptibilidad presentada por el ratón et/et a la infección de *A. actinomycetemcomitans* es debido a la elevada concentración de corticosteroides en sangre, comparado con el ratón eutímico CD1 y como es sabido estos corticosteroides tienen un efecto inmunosupresor en las células T. Sin embargo el aumento o disminución en la producción de linfocinas, dependerá del estado de activación del linfocito T, por ello, durante una primo-inmunización la expansión clonal de ambos linfocitos CD4 (Th1 y Th2) se ve reducida, pero su efecto en las células de memoria es menor debido a que estas células son 100 veces menos sensibles a la acción de los corticosteroides<sup>(28)</sup>.

Se observaron lesiones en dientes y retracción de encías con presencia de resorción ósea y caries, siendo mayor en las portadoras del gen et. Esto sugiere que, en la periodontitis la carga genética juega un papel importante. En los ratones et/et la xerostomía no favorece al daño periodontal, pero si favorece el incremento de organismos generadores de caries, situación similar a la que presentan los pacientes con síndrome Sjögren, de igual forma favorece la formación de la placa lo que conlleva alteraciones en la configuración normal de la encía y permite la entrada de un mayor número de bacterias generando gingivitis.

Se realizó un contraste de hipótesis acerca de la diferencia de medias de los índices de órganos (bazo, hígado y riñones), entre los ratones progenitores +/+ y los portadores et/+, no encontrando diferencia entre estas.



---

Utilizar la cepa ATCC nos asegura la identidad de la bacteria, pero al tratarse de una bacteria exigente se prepararon medios de cultivo especiales para la recuperación de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, obteniendo un mejor desarrollo en caldo BHI-hemina-menadiona, obteniendo suficiente biomasa para la obtención de LPS, así como para la infección de los ratones

Al realizar la determinación del título del conjugado específico de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* obtenemos una gráfica en la que se observa cómo se comportan el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y el conjugado a diferentes concentraciones. Las absorbancias más altas se obtuvieron con diluciones del LPS de 1:8 y 1:16 que corresponden a una concentración de 2.2531 µg/mL a 4.5063 µg/mL, respectivamente, por lo tanto, podemos decir que lo ideal es utilizar el LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dentro de este rango. En el caso del conjugado específico para LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se eligió la dilución que da un término medio de reacción con las diferentes concentraciones de LPS, dicha dilución fue de 1:800, y al utilizarla podemos asegurar que dicho conjugado no únicamente reaccionará con concentraciones altas o bajas de LPS, sino que tendrá un mayor rango de reacción. 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 gráficas absorbancia vs logaritmo de la dilución del conjugado generadas (gráfica 3): a) Identificando la respuesta con el mayor valor de absorbancia, a condición de que la absorbancia no rebasara el valor de 1, evitando así errores espectrofotométricos; b) posteriormente seleccionar las concentraciones de conjugado y LPS con la respuesta media y /o más alta, asegurando la respuesta en diversas concentraciones.

La técnica de ELISA es un procedimiento sensible y específico, ya que está basado en reacciones antígeno-anticuerpo, y el que dicha reacción quede

---

adherida a una superficie sólida de la que pueden eliminarse todos los analitos que no reaccionan por medio de lavados sucesivos, permite que el tamaño de la muestra a analizar sea mínimo, estas características hacen que sea uno de los métodos más utilizados. El reciente descubrimiento de que la polimixina presenta una alta afinidad por los LPS, ha permitido desarrollar una técnica de ELISA-polimixina para la detección de bacterias Gram negativas, las cuales presentan esta sustancia en su membrana celular y representan uno de sus factores de virulencia, haciéndolas bacterias altamente resistentes y agresivas. Un ejemplo es *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, uno de los principales agentes causales de la periodontitis, enfermedad con un alto índice de morbilidad en el mundo. Al utilizar polimixina B en la placa de ELISA se asegura la recuperación del LPS presente en la muestra, y al obtener un anticuerpo específico contra el LPS que deseamos identificar aseguramos la especificidad de la reacción. Además el LPS es altamente resistente a condiciones ambientales adversas, su naturaleza de carbohidrato permite que resista altas temperaturas, lo que hace que su recuperación no tenga que realizarse bajo condiciones especiales. Dado que *A. actinomycetemcomitans* no es parte de la biota, al identificar el LPS, se establece la existencia de un proceso infeccioso, aunque esto no establece la etapa de la enfermedad periodontal, para que ocurra el daño tisular y la resorción ósea característicos de la periodontitis en etapa establecida o avanzada, es necesario que intervengan múltiples factores además de la existencia del agente patógeno. En muchos casos interviene: la asociación con otras bacterias, la cantidad de placa bacteriana, un estado nutricional u hormonal alterado, así como una inadecuada o excesiva respuesta inmune por parte del huésped. Esta situación se comprueba al no encontrar asociación entre la presencia del LPS de *A. actinomycetemcomitans* con el daño observado en el hueso alveolar. Por ejemplo, en los ratones  $+/+$  y  $et/+$  donde el sistema inmune puede controlar y eliminar la infección por *A. actinomycetemcomitans*, la existencia de linfocitos sensibilizados, los cuales pueden ser estimulados por antígenos de la placa, son los que llevan a cabo el proceso de hipersensibilidad.

---

## CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar un método estandarizado de ELISA ligado a Polimixina para la detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* de muestras de lavado gingival o de suero de ratones CD1 et/et, et/+ y +/+
- Se consiguió la IgM anti-LPS de *A. actinomycetemcomitans* para la elaboración de los conjugados, que probaron total funcionalidad, encontrándose el título del conjugado ideal para *A. actinomycetemcomitans*. Se determinó que la dilución del conjugado más adecuada para trabajar este sistema es de 1:800.
- Encontramos que la técnica de ELISA polimixina es útil en la detección de LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* utilizando una muestra obtenida de lavado dental de ratones et/et, et/+ y +/+.
- Toda la técnica y sus procedimientos son factibles de realizar en cualquier laboratorio de investigación o docente.

Se propone realizar un estudio con animales que reciban un 10% de la dosis administrada para evitar mortalidad y poder observar lesiones en éstos.

---

---

## ANEXOS

### ANEXO I. Preparación de soluciones

#### Solución de hemina:

Hemina	50 mg.
NaOH 1N	1 mL.
Agua destilada	100 mL.

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

#### Solución de menadiona.

Menadiona o vitamina K	100 mg.
Alcohol etílico del 96°	20 mL.

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

#### Solución acuosa de fenol al 90%

Fenol	9 g
Agua destilada	1 mL

Disolver en un vaso de precipitado agitando con mucho cuidado. Utilizar guantes durante todo el proceso.

#### Buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8

Fosfato dibásicododecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	3.58g
Fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	1.38g

Agua destilada 100mL

---

---

**Buffer de carbonato-bicarbonato 1M pH 9.5**

Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	10.59 g
Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	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 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.9 g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2 g
Agua destilada	1000 mL

**Buffer de salina fosfatos / NaCl 0.85% para ELISA.**

Cloruro de sodio NaCl	8.5g
Cloruro de potasio KCl	0.2g
Fosfato bibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.9g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2g
Agua destilada	1000mL

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

Cloruro de sodio NaCl	8.5g
Cloruro de potasio KCl	0.2g
Fosfato bibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.9g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2g
Tween 20	0.5mL
Agua destilada	1000mL.

**Bloqueador para ELISA**

Leche descremada en polvo	5 g
Albúmina de huevo	1 g
Agua destilada	100 mL

---

## Amortiguador de Sustrato

### Solución A

Fosfato bibásico dodecahidratado de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 1.4196 g

Agua destilada 50mL

### Solución B

Ácido cítrico 1.0507 g

Agua destilada 50mL

### Solución de trabajo C

Mezclar

25.7 mL de la solución A

24.3mL de la solución B

### Sustrato - Cromógeno

Solución de trabajo C 100 mL

O-Fenilendiamina 40 mg (proteger de la luz)

Peroxido de hidrogeno al 30% 40  $\mu\text{L}$

Agregar en el orden anotado. Utilizar inmediatamente después de preparada.

## ANEXO II. Escala de McFarland

Tubo	$\text{BaCl}_2$ al 1% (mL)	$\text{H}_2\text{SO}_4$ al 1% (mL)	Bacterias/mL
1	0.1	9.9	$3.0 \times 10^8$
2	0.2	9.8	$6.0 \times 10^8$
3	0.3	9.7	$9.0 \times 10^8$
4	0.4	9.6	$1.2 \times 10^9$
5	0.5	9.5	$1.5 \times 10^9$
6	0.6	9.4	$1.8 \times 10^9$
7	0.7	9.3	$2.1 \times 10^9$
8	0.8	9.2	$2.4 \times 10^9$
9	0.9	9.1	$2.7 \times 10^9$
10	1.0	9.0	$3.0 \times 10^9$

---

## **ANEXO III**

### **Preparación de croquetas para dieta 2050 rica en carbohidratos.**

1. Se pesaron 300 g de azúcar estandarizada y 150 g de fécula de maíz (maizena)
2. Se disuelven con suficiente agua hasta formar una pasta.
3. Sobre una charola metálica se glasean las croquetas para ratón.
4. Secar en estufa a 100° C durante 1 hora.
5. Dejar enfriar.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Navarro A, González A, Bascones. Transmisión intrafamiliar de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. España: Universidad Complutense de Madrid. 2000.
2. Escalona LA, Rivera H. Evaluación inicial de índices periodontales en pacientes diagnosticados con Síndrome de Sjögren. Acta Odontológica Venezolana. V 42 n.1 Caracas ene 2004
3. Marroquin-Segura R. Exocrinopatía mostrada en el ratón hipotímico CD1 et/et que semeja al Síndrome de Sjögren. México (DF) México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Autónoma de México,2002.
4. Gomez ME, Campos MA, Histología y Embriología Bucodental. Editorial Médica Panamericana. España; 2001. pp 5-7.
5. McPhee, Cowley G. Fundamentos de parodoncia. México: Editorial Limusa; 1989. p 17-22
6. Francisco F. Enfermedad periodontal y microorganismos periodontopatógenos. ODOUS Científica. Venezuela,
7. Prescott LM, Harley JP, Klein DA, Microbiología. 4a ed. Madrid: Edit Mc Graw-Hill Interamericana; 2000. pp 837-839
8. Rateistchak KH, Herbert FW. Atlas de Periodoncia. 2ª edición. Editorial Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. España 1991. pp 55.
9. Carranza FA, Newman MG. Periodontología clínica. 8ª edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México; 1998 pp 101
10. LiebanaJU. Microbiología Oral. Mac Graw-Hill. México, 1997, p 448-491, 644-652.
11. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico. 5a ed. Madrid: MedicaPanamericana; 1999, p 429-434, 631-633, 671, 724, 725, 734, 736.



- 
12. Mc Faddin Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 2ª ed. Buenos Aires: Editorial MedicaPanamericana: 1993. p 230
  13. James T. Staley. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. 2a ed. Editorial Board. Volumen II Parte B, p 866-885.
  14. Efecto de bacterias Gram negativas periodontopáticas sobre indicadores bioquímicos clínicos de colesterolemia. Facultad de odontología, Universidad de Buenos Aires (on line) 2009 (citado en 22 jun 2009). Disponible en: URL: [http://www.rec.uba.ar/pc\\_98\\_00/htm/ao06.htm](http://www.rec.uba.ar/pc_98_00/htm/ao06.htm)
  15. Andreoli T, Carpenter C, Griggs R, Loscano J. Cecil medicina interna. 5a ed. Barcelona: Elsevier; 2003: p.704-706.
  16. Harrison T. Principios de medicina interna. 15ª ed. México: MacGraw-Hill interamericana; 2001: p.2277-2279.
  17. Farreras P, Rozman C, Cardellach F, Serrano S, Ribera JM. Medicina interna. 14ª ed. Madrid: Elsevier; 2000: p.1272-1273.
  18. Bardáles R. Manejo odontológico integral del paciente con síndrome de Sjögren. La carta odontológica 2001; 5(16):27-30.
  19. Stites D, Terr A, Parslow T. Inmunología básica y clínica. 9a ed. México: El Manual moderno; 2000: p.28-36, 170-3, 178-80, 184-6, 214- 24, 244-47, 447-51, 501-3, 509, 562-64, 651-54.
  20. Marroquín R, Martínez CF, García MM, Calvillo R, Mora JL, Flores M. Autoanticuerpos anti-Ro/ssa, anti-La/ssb y anticuerpos antifosfolípidos, en suero de ratones mutantes et/et que muestra exocrinopatía. Vet. Mex 2007; 38(3): 347-357.
  21. Rojas EO. Inmunología. 2ª edición. Editorial Medica Panamericana. México 2004. Pp 164-166.
  22. Ricardo Anibal Margni. Inmunología e inmunoquímica. 5ª ed. Argentina: Edit Panamericana; 1996.
  23. Campbell DH, Garbey JS, Cremer NE, Sussdor DH. Methods in immunology, 2ª ed. New York: Ed. WA Benjamin, 1970.

- 
24. Hudson L, Hay FC. Practical Immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980.
  25. Shigeru K, Tadaaki M, Yoshiko I. The effect of Ofloxacin on Experimental periodontitis in Hamsters Infected with Actinomycesviscosus ATCC 15987. Rohto Pharmaceutical
  26. Jordan H. and Keyes P.: Aerobic gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. Arch Oral Biol 9: 401, 1964.
  27. Blais BW, Bosley J, Martínez Pérez A, Popela M. Polymixin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Escherichia coli 0111 and 026. Journal of microbiological methods 2006;65:468-475.
  28. Marroquín Segura R. Estudios Inmunológicos en ratones hipotímicos CD1 et/et que desarrollan oftalmopatía espontánea. (tesis doctoral). 1996. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México.