



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Susceptibilidad del ratón CD1 et/et que presenta una exocrinopatía espontánea a *Prevotella intermedia*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGICO**

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

**MUÑIZ VAZQUEZ MARIANA**



**Director: Dr. Rubén Marroquín Segura**

**Asesor: MC. Maurilio Flores Pimentel**

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	4
2.1 Enfermedad periodontal .....	4
2.2 Enfermedades gingivales asociadas a la placa.....	4
2.3 La placa subgingival.....	5
2.4 La periodontitis.....	6
2.5 Patogenia inmunitaria .....	7
2.6 <i>Prevotella intermedia</i> .....	8
2.6.1. Características.....	8
2.6.2 Nutrición.....	9
2.6.3 Medios de cultivo .....	9
2.6.4 Factores de virulencia.....	10
2.6.5 Patogenia .....	10
2.7 Síndrome de Sjögren .....	10
2.7.1 Antecedentes.....	10
2.7.2 Generalidades .....	11
2.7.3 Etiopatogenia.....	11
2.7.3.1 Factores externos .....	11
2.7.3.2 Factores internos.....	12
2.7.4 Respuesta inmune alterada .....	13
2.7.5 Manifestaciones clínicas.....	14
2.8 Modelo animal.....	14
2.8.1 Antecedentes.....	14
2.8.2 Características.....	15
2.8.3 Modelo experimental .....	15
2.9 ELISA Polimixina .....	15
2.10 Ceruloplasmina.....	16
2.11 Nitritos.....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 General .....	18
4.2 Específicos.....	18
5. HIPÓTESIS.....	19
6. DISEÑO METODOLÓGICO .....	20
6.1 Población en estudio.....	20
6.2 Criterios de inclusión.....	20
6.3 Criterios de exclusión .....	20
6.4 Tipo de estudio .....	20
6.5 Variables involucradas en el estudio .....	20

6.5.1 Variable dependiente .....	20
6.5.2 Variables independientes .....	20
6.6. Análisis estadístico .....	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
7.1. Equipo .....	21
7.2 Material .....	21
7.3 Material biológico .....	21
7.4 Métodos .....	22
7.4.1. Aislamiento de <i>P. intermedia</i> .....	22
7.4.2 Siembra de <i>P. intermedia</i> . .....	22
7.4.3 Aislamiento de <i>P. intermedia</i> .....	23
7.4.3.1 Morfología colonial. ....	23
7.4.3.2 Tinción de gram.....	23
7.4.4 Tratamiento .....	23
7.4.4.1 Preparación del alimento .....	23
7.4.5. Sacrificio de los animales .....	24
7.4.6. Obtención de muestras.....	24
7.4.7 Ceruloplasmina.....	24
7.4.8 Evaluación del índice de los órganos.....	25
7.4.9. Análisis de Nitritos (método de Griess).....	25
7.4.10 Determinación por ELISA Polimixina .....	25
7.4.11 Evaluación de la pérdida del hueso alveolar.....	26
8. RESULTADOS .....	28
8.1 Mortalidad .....	28
8.2 ELISA polimixina .....	28
8.3 Evaluación de la pérdida de hueso alveolar .....	30
8.4 Índices de los órganos .....	30
8.6 Nitritos.....	31
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	32
10. CONCLUSIONES.....	33
11. BILIOGRAFIA .....	34
12. ANEXOS.....	36

# 1. INTRODUCCIÓN

El ratón mutante CD1 *et/et* presenta una característica genética en la cual hay hipotímia, por lo que su respuesta inmune se ve alterada, presenta una exocrinopatía parecida al síndrome de Sjögren, en la cual se suele expresar una disminución en la producción de saliva y de lágrimas, por estas características es más susceptible a sufrir ciertas enfermedades con respecto a los ratones eutímicos CD *+/+*, lo que ha permitido que sean utilizados para estudiar la participación de la respuesta inmune durante el proceso de algunas enfermedades.

La periodontitis es una enfermedad que afecta a una gran parte de la población, y constituye una de las principales causas de la pérdida de dientes en la población adulta, la respuesta inmune en esta enfermedad se puede ver alterada por diferentes factores genéticos o ambientales y derivar en una rápida destrucción a nivel periodontal; diversos trabajos de investigación demuestran que los defectos en los polimorfonucleares determinan una progresión severa y rápida de formas tempranas de destrucción periodontal, uno de los agentes relacionados con la periodontitis es *Prevotella intermedia*, está bacteria que se encuentra presente en algunas enfermedades como la gingivitis en el embarazo y la pubertad. Se ha demostrado la existencia de una correlación entre la presencia de *P. intermedia* y la inflamación periodontal.

Por lo tanto en este trabajo, se aisló *P. intermedia* y se inoculó en tres cepas diferentes de ratones: CD1+, *et/+* y *+/+*, para ocasionarles periodontitis, después de tres meses los ratones fueron sacrificados. Se utilizaron muestras de saliva para medir diferentes analitos presentes en la inflamación; como son los nitritos y la ceruloplasmina. También se extrajeron sus órganos para observar el daño a nivel de hígado, bazo y riñones, sus mandíbulas fueron limpiadas y se evaluó el índice de daño generado a nivel de hueso alveolar. Se determinó la presencia de *P. intermedia* en la saliva como agente causal de la enfermedad periodontal por medio del método de Elisa Polimixina.

Se observó que el nivel de daño ocasionado por *P. intermedia* en la cepa CD1+ fue moderado a nivel del hueso alveolar. La bacteria genera una hipersensibilidad de carácter agudo, su respuesta inmune va ocasionando la necrosis de algunos órganos como el bazo y el riñón, lo cual ocasiona la muerte de los ratones en un tiempo más corto. La cepa *et/+* presenta una hipersensibilidad de carácter crónico, esta cepa presenta las concentraciones más altas de ceruloplasmina y nitritos, es la cepa que más daño presenta a nivel de hueso alveolar, también se observó que se presenta necrosis a nivel renal. La cepa *et/et* presenta una respuesta inflamatoria leve que va necrosando el bazo, presenta una respuesta de carácter crónico que afecta muy poco al organismo.

El presente trabajo demuestra que existe una hipersensibilidad ocasionada por la presencia de la bacteria, que afecta el sostén del diente y también genera un daño en diferentes órganos.

## 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.1 Enfermedad periodontal

La boca es la vía de entrada para diversos antígenos, incluyendo numerosos microorganismos, hacia el aparato respiratorio y digestivo, estos microorganismos por lo general no causan enfermedad y se eliminan con la deglución de la saliva hacia el tubo digestivo. La barrera mucosa, la descamación continua de la mucosa bucal, el cepillado de dientes y otras formas de limpieza oral protegen la boca de forma mecánica.

Las enfermedades bucales más comunes son la caries, la gingivitis y la periodontitis, estas se deben al desequilibrio entre los microorganismos bucales y la respuesta del hospedero. Este desequilibrio puede ser resultado de la hipersensibilidad, deficiencia inmunitaria o daño tisular directo.

La inflamación de los tejidos de sostén del diente se produce dependiendo de la gravedad; puede afectar solo la encía (gingivitis) o los ligamentos periodontales y hueso alveolar que rodean y apoyan al diente (periodontitis). La periodontitis puede incluir efectos citolíticos y proteolíticos directos de la placa dentobacteriana y las consecuencias patológicas indirectas de la respuesta inmunitaria del hospedador a la presencia continua de microorganismos de dicha placa. La placa dentobacteriana consta de una masa de bacterias que se adhieren a la superficie de los dientes. En la gingivitis la placa genera inflamación del tejido gingival sin afectar el ligamento periodontal ni el hueso. En la periodontitis se pierden las inserciones entre la encía y los dientes afectados, se forma placa bacteriana subgingival sobre las superficies radiculares y se manifiesta en la valoración clínica por pérdida de hueso. La eliminación de placa por lo general detiene el proceso inflamatorio<sup>1</sup>.

La microflora de la placa dentobacteriana es compleja, y comprende diferentes cepas de bacterias que incluyen bacilos, cocos grampositivos y bacilos gramnegativos, así como formas filamentosas. En general, la hendidura gingival sana contiene solo unos cuantos estreptococos grampositivos y bacterias anaerobias facultativas del género *Actinomyces*. Conforme se desarrolla gingivitis, se encuentran muchos microorganismos gramnegativos, incluyendo *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y bacterias del género *Haemophilus*, también se observan muchos bacilos móviles y espiroquetas

### 2.2 Enfermedades gingivales asociadas a la placa

La microbiota de la placa dentobacteriana es compleja pueden aislarse más de 40 especies bacterianas diferentes. Comprende en términos generales un 50% de anaerobios facultativos (con claro predominio de estreptococos orales y *Actinomyces* spp.), anaerobios estrictos representando hasta el 45% (en los inicios especialmente *Veillonella* spp.) y treponemas hasta un 5%; estos dos últimos grupos alcanzarían estas cifras y mostrarían gran diversidad a medida que la placa se va engrosando, localizándose en las zonas de más bajo potencial de óxido-reducción, y en las que se producen en el tránsito del medio supragingival al subgingival<sup>2</sup>.

Puede decirse que las bacterias habituales a nivel de la zona gingival del diente, con claro predominio de estreptococos orales de hasta un 82%, se encuentran en equilibrio con los tejidos de la encía. Cuando éste se rompe surgen las enfermedades gingivales ligadas a placa. Todas ellas tienen en común la presencia de una placa inespecífica a nivel de la porción gingival del diente que, junto al sarro, desencadenan el proceso inflamatorio, sin participación, en principio, del resto de la mucosa oral ni afectación de los demás tejidos periodontales<sup>3</sup>. De acuerdo con estas causas puede establecerse la siguiente clasificación<sup>4</sup>:

- gingivitis etiológicamente relacionadas con la placa y cálculo ante la falta de higiene.
- gingivitis en las que a la placa y cálculo se unen alteraciones anatómicas dentales como el apiñamiento dental
- enfermedades gingivales asociadas a placa con modificaciones de la respuesta del hospedero.
- enfermedades gingivales asociadas a placa y con factores desconocidos, en estos casos sólo cabe calificarlas como idiopáticas.

### 2.3 La placa subgingival

Esta localizada a nivel del espacio virtual del surco gingival escasamente colonizado en estado de salud periodontal; sin embargo, la cantidad y diversidad de microorganismos aumentan en presencia de enfermedad, desarrollando a este nivel una biopelícula y después transformándose en una bolsa que lleva a la destrucción del hueso alveolar. Esta biopelícula se caracteriza por adoptar una estructura diferente a las de localización supragingival que sólo se adhieren a la superficie dental. El desarrollo de la placa subgingival se lleva a cabo según el clásico esquema de colonización, sucesión y asociaciones microbianas debido a Socransky y cols<sup>5</sup> que después se modificó por Socransky y Haffajee<sup>2</sup>.

Grupo	Bacterias
1	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Treponema denticola</i> ,
2	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. micros</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>F. viencentil</i> , <i>F. polymorphum</i> , <i>F. periodonticum</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>C. gracillis</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>C. showae</i> , <i>E. nodatum</i> .
3	<i>Eikenella corrodens</i> , <i>C. gingivalis</i> , <i>C. consisus</i> , <i>C. sputigena</i> , <i>C. ochracea</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
4	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>Streptococcus sp</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. intermedius</i>
5	<i>Actinomyces ssp</i>
6	<i>Veillonella parvula</i> , <i>Actinomyces odontolyticus</i>

Los primeros colonizadores del surco, procedentes por contigüidad de la biopelícula del margen gingival (grupos 6, 5 y 4), seguirán los colonizadores secundarios (grupo 3) que actuarán de puente con los terciarios (grupo 2) a los que se unirán los cuaternarios (grupo 1). Tanto el grupo 2 como el 1 se volverán predominantes en las fases tardías. Entre los microorganismos de los grupos 6, 5 y 4, que conforman una auténtica biopelícula, predomina la adhesión al diente y entre los de los grupos 3, 2 y 1 la coagregación y adhesión al epitelio.

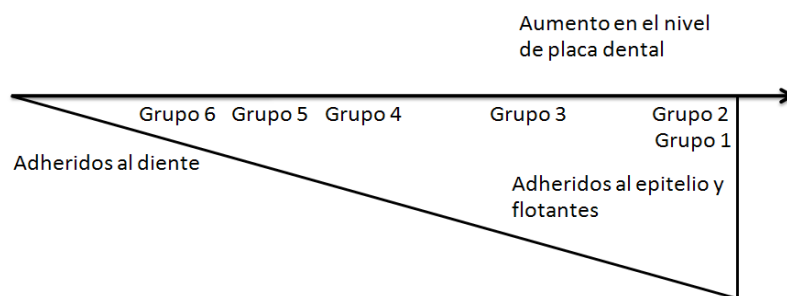


Figura 1. Desarrollo de la colonización en placa subgingival. Conforme avanza el nivel de placa periodontal, diferentes grupos de bacterias colonizan el periodonto, de acuerdo a los criterios de Socransky y col.<sup>5</sup>

## 2.4 La periodontitis

Las periodontitis son procesos que comprometen todas las estructuras del periodonto. Se tratan de procesos destructivos con pérdida de hueso y ligamento periodontal. Cuando se desarrolla una periodontitis se produce un desequilibrio entre los microorganismos y los mecanismos de defensa del hospedero.

Tipos de Periodontitis	Características
Periodontitis del adulto	La periodontitis del adulto no suele ser clínicamente significativa antes de los 35 años de edad. Su evolución habitualmente es lenta y no tiene predilección por ningún sexo. La función de los linfocitos y neutrófilos aparentemente es normal. Los microorganismos especialmente implicados son <i>Porphyromona gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> y <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> .
Periodontitis agresiva localizada	Es una enfermedad que afecta solo a ciertos dientes (incisivos y premolares) y 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 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> es a menudo el organismo subgingival predominante. Aunque otros microorganismos como <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Prevotella intermedia</i> también se encuentran sobresalientes.
Periodontitis rápidamente progresiva	Esta enfermedad, que afecta a los individuos entre 20 y 35 años, se caracteriza por presentar una evolución rápida con pérdida del tejido conectivo y hueso alveolar. Una elevada proporción de pacientes presenta una depresión de la quimiotaxis de los neutrófilos. Se ha postulado una influencia genética de esta enfermedad. Las bacterias prevalentes en sitios activos de enfermedad son: <i>Porphyromona gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Treponema denticola</i> , y <i>Bacteroides forsythus</i> .
Periodontitis refractaria	La expresión periodontitis refractaria se refiere a las lesiones periodontales refractarias al tratamiento periodontal convencional. Las especies aisladas en los sitios activos son: <i>Porphyromona gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus miforsythus</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , y <i>Eikenella corrodens</i> <sup>6</sup> .

## 2.5 Patogenia inmunitaria

Existe un delicado equilibrio entre los microorganismos de la placa dentobacteriana y la respuesta del hospedador. En individuos sanos las respuestas inmunitarias proporcionan una defensa específica bien regulada contra la infiltración de sustancias de la placa. Se piensa que el mecanismo de destrucción de los tejidos relacionado con la enfermedad periodontal incluye efectos directos de la placa dentobacteriana, daño inducido por polimorfonucleares, daño mediado por el complemento iniciado por anticuerpos y por la vía alterna y daño mediado por células.

La gingivitis tal vez es el resultado de una respuesta exagerada a la placa dentobacteriana. Los individuos con gingivitis leve tienen, además de infiltración continua con polimorfonucleares, un influjo gingival de pocos linfocitos T. Sin embargo aquellos con gingivitis prolongada y con periodontitis graves tienen influjo compuesto sobre todo de linfocitos B y células plasmáticas, con la resultante producción de anticuerpos IgG. Cabe mencionar que en la enfermedad periodontal grave es en extremo baja por la proporción de IgG2, en tanto que son normales las concentraciones séricas de otras subclases de inmunoglobulina IgG. Se desconoce la proporción de subclases de anticuerpos de IgG3, IgG1 o IgG4 con actividad de anticuerpos específica para los antígenos de placa en los tejidos gingivales. Esta respuesta poco común de las subclases locales de IgG puede indicar un grado de activación no específico de los linfocitos B que llegan al área inflamada, tal vez causada por diversos mecanismos que afectan a mitógenos bacterianos y proteinasas. Las bacterias también activan la vía alterna del complemento. Asociada con la gingivitis se encuentra la producción de un exudado conocido como líquido de la hendidura, el cual fluye alrededor del diente y se pone en contacto con la placa dentobacteriana. Este exudado, al igual que en el suero, contiene componentes funcionales del complemento en concentraciones bajas de anticuerpos específicos contra diversos antígenos de placa.

El inicio del flujo del líquido de la hendidura es una etapa importante en la progresión de la enfermedad periodontal. El complemento del líquido de la hendidura se activa con rapidez por una combinación de efectos. Estos incluyen la activación de la vía clásica por anticuerpos IgM e IgG dirigidos contra antígenos de la placa subgingival, activación de la vía alterna del complemento por endotoxinas y peptidoglucano de los microorganismos gramnegativos y grampositivos, respectivamente, así como la activación de componentes del complemento por el hospedador y por enzimas proteolíticas bacterianas. La activación del complemento produce primero la liberación de C3a y C5a, los cuales causan edema adicional e incrementan el flujo del líquido de la hendidura y más tarde la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares. Otros microorganismos producen de forma directa factores quimiotácticos. Se considera que la liberación de enzimas proteolíticas con actividad similar a la de la colagenasa y la tripsina, por parte de las células del hospedador, daña al tejido y causa la activación de componentes adicionales del complemento y liberación subsiguiente de prostanglandina "E" *in vitro*, la prostanglandina "E" ocasiona resorción ósea a través de sus efectos sobre los osteoclastos.

La inmunidad mediada por células también desempeña una función en la progresión de la enfermedad periodontal. En algunos estudios, los individuos con enfermedad periodontal por lo general muestran una mayor reactividad de los linfocitos T de sangre periférica a los antígenos de la placa. En la gingivitis y en la periodontitis graves, la



respuesta por células T contra la placa es ostensiblemente pequeña. La destrucción ósea en la enfermedad periodontal puede estar medida por linfocinas, incluyendo factor activador de los osteoclastos al igual que hormona paratiroidea y prostanglandinas<sup>1</sup>. (Figura 2)

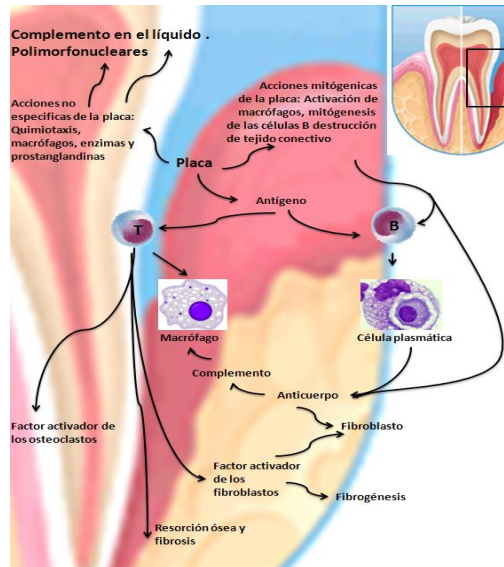


Figura 2. Patogénesis de la enfermedad periodontal.<sup>1</sup>

La periodontitis del adulto es de evolución lenta y no tiene predilección por ningún sexo. La función de los linfocitos y neutrófilos aparentemente es normal. Los microorganismos especialmente implicados son *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

## 2.6 *Prevotella intermedia*

### 2.6.1. Características

*P. intermedia* es una bacteria de pigmentación negra, gramnegativa, bacilo o bacilo corto, extremos redondeados, inmóvil, anaerobios estrictos, hábitat surco gingival. (Figura 3).<sup>6</sup>

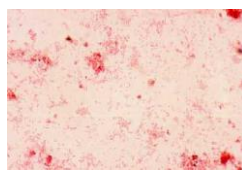


Figura 3. Bacilos gramnegativos de *P. intermedia*.

Su morfología colonial macroscópica se caracteriza por colonias negras-cafés, o pardas, son redondas, convexas, brillantes y lisas (Figura 4), en ocasiones alfa hemolíticas, crecen en condiciones de anaerobiosis estricta (85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, "o" 90% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>), a una temperatura de 36° C, el crecimiento es de 4 a 7 días<sup>7,8</sup>.



Figura 4. Morfología colonial de *P. intermedia*

**Tabla1. Características de *P. intermedia***

Prueba	Característica	Prueba	Característica
Indol	Positivo	Lipasa	Positiva
Catalasa	Positivo	$\beta$ -glucosamidasas	Negativa
Glucosa	Positivo	Tripsina	Negativa
Lactosa	Negativa	Kimotripsina	Negativa
Ureasa	Negativa	Bilis	Sensible
Hidrólisis de la esculina	Negativa	Vancomicina	Resistente
Hidrólisis de la gelatina	Negativa	Colistina	Resistente
Reducción de nitratos	Negativa	Kanamicina	Resistente
Metronidazol	Sensible	Bacitracina	Sensible

### 2.6.2 Nutrición

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

Posee una exigencia de hierro para desarrollarse, cuando existe una deficiencia de hierro en el sistema de poros de la bacteria (Sideroporos, los cuales se encargan de quelar 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 hospedero 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 ferroso y hierro inorgánico no nitrogenado<sup>6</sup>.

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.

### 2.6.3 Medios de cultivo

Requiere de ambientes con sustratos abundantes de nitrógeno (péptidos y aminoácidos),<sup>7,9,10</sup> y baja tensión de oxígeno

Se suele cultivar en:

- Agar brucella base suplementado 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-cisteína, hemina, menadiona en anaerobiosis.
- Agar soya tripticasa con 5% de sangre de cordero desfibrinada en anaerobiosis y extracto de levadura.

#### 2.6.4 Factores de virulencia

Posee una capsula polisacárida, que confiere protección contra la fagocitosis y la destrucción de los polimorfos nucleares, así mismo posee una gran variedad de enzimas que sirven como factores de virulencia como la lecitinasa, colagenasa, heparinasa, hialuronidasa, gelatinasa, fibrinolisisina, enzimas proteolíticas como lecitinasa, lipasa, condroitin-sulfatasa, desoxirribonucleasa, fosfatasa, neuroamidasa, elastasas, así como enzimas protectoras de oxígeno como la superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa<sup>7,9,10,12</sup>

#### 2.6.5 Patogenia

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 con los lipopolisacáridos<sup>9,13,14</sup>.

*P. intermedia* es uno de los agentes causales de gingivitis en el embarazo y la pubertad, en la gingivitis ulceronecrotizante y en algunas formas críticas de periodontitis. Se ha demostrado la existencia de una correlación entre la presencia de *P. intermedia*, con la inflamación periodontal.

Los niveles crecientes de estradiol y progesteronas durante el embarazo y en las mujeres que toman anticonceptivos orales estimulan el crecimiento de *P. intermedia*, ya que es capaz de sustituir la vitamina K por estradiol y progesterona como factor de crecimiento esencial<sup>6</sup>.

### 2.7 Síndrome de Sjögren

#### 2.7.1 Antecedentes

Los antecedentes del síndrome de Sjögren (SS) se remontan hasta 1982 cuando Johann Von Mikulicz Radecki describió a un paciente con crecimiento bilateral de las glándulas salivales y lagrimales<sup>15</sup>. El examen con microscopia demostró la existencia de atrofia del parénquima acinar infiltrado difuso por linfocitos, con el tiempo fueron identificados nuevos casos con crecimiento de las glándulas salivales debido a infiltrados por células linfoides, que se denominaron como “Enfermedad de Mikulicz”; la mayoría de estos casos se asociaron con patologías que en la actualidad se identifican como tuberculosis, sarcoidosis, linfoma e infecciones por piógenos que pueden afectar los conductos salivales; otros se vincularon con alteraciones autoinmunes como la presencia de hiperglobulinemia o de anticuerpos; con el transcurso del tiempo el término “Enfermedad de Mikulicz” resulto ser difuso y carente de significado diagnóstico y terapéutico.<sup>16</sup>

Es hasta 1933 cuando Herick Sjögren describió la asociación de queraconjuntivitis sicca, sequedad de la boca (xerostomía) y Artritis Reumatoide (AR); considerando esta asociación de síntomas (síntomas sicca) como SS<sup>17</sup>. Morgan y Castleman en 1953 demostraron que el tipo de infiltrado encontrado en el SS y el descrito en la “Enfermedad de Mikulicz” eran similares<sup>18</sup>.

Bloch y colaboradores propusieron dividir al SS en primario y secundario<sup>15</sup>, el SS secundario incluye a los pacientes con síntomas sicca asociados con una enfermedad en particular (AR, Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Esclerodermia o Dematomiositis), mientras que el SS primario (SSp) no muestra asociación con ninguna otra enfermedad, su sustrato fisiopatológico implica la infiltración linfocitaria crónica de las glándulas salivales y lagrimales mediada por mecanismos relacionados con la autoinmunidad; con frecuencia el SSp puede tener manifestaciones extraglandulares no específicas como neumonitis, nefritis intersticial y tiroiditis<sup>19</sup>.

### 2.7.2 Generalidades

El SSp es una enfermedad autoinmune con sustrato inmunopatológico caracterizado por aumento en la actividad de la inmunidad celular y humoral, que determina el depósito de complejos inmunes a nivel multisistémico<sup>20</sup>. Es una enfermedad inflamatoria crónica de patogenia inmunológica, cuya característica clínica fundamental es la sequedad ocular y orofaríngea (síndrome seco); esta se produce por la destrucción progresiva las glándulas salivales y lagrimales por un infiltrado linfoplasmocitario. La enfermedad como proceso sistémico, puede afectar también el resto del sistema exocrino y a diversos órganos extraglandulares, lo que lleva a algunos autores a distinguir una forma glandular y otra extraglandular; clínicamente el SS se clasifica en primario cuando se presenta de forma aislada y secundario cuando se asocia con enfermedades autoinmunes como la AR, LES, la Poliomiocitis y la Esclerodermia<sup>21</sup>.

### 2.7.3 Etiopatogenia

La etiología del SS es desconocida, pero en los últimos años la información de que se dispone ha aumentado en forma notable y permite aventurar algunas hipótesis; actualmente se piensa que el SS es consecuencia de: la interacción de algún factor ambiental con factores constitucionales, determinados genéticamente; esto provoca una respuesta inmune alterada que se perpetúa por diversos mecanismos, y que produce los fenómenos autoinmunes del SS, con la consiguiente destrucción del tejido afectado.

#### 2.7.3.1 Factores externos

Se considera que el factor ambiental etiológico más importante son los virus; en algunos casos, la enfermedad comienza coincidiendo con una infección vírica aguda y en otros con la reactivación de un proceso vírico latente; se ha implicado al virus del Epstein-Barr, Citomegalovirus, Herpes virus humano tipo 6, virus C de la hepatitis y a los retrovirus en la patogenia del SS, pero los datos disponibles no son concluyentes.<sup>13</sup> En varios pacientes con SS se han detectado partículas retrovíricas de tipo A (que tienen importante parecido con las partículas del virus de la inmunodeficiencia humana VIH)<sup>15</sup> y, en algunos estudios, aproximadamente el 30% de estos enfermos tienen anticuerpos contra la glucoproteína p24 de la cápside vírica del VIH, mientras que la población en

general esto ocurre solo en el 1-4 %; se ha conservado también la presencia del gen tax del HTLV1 en glándulas salivales menores de pacientes con SS, en ratones transgénicos portadores de este gen presentan una exocrinopatía autoinmune que se asemeja al SS<sup>18</sup>; además, se ha descrito un proceso similar al SS en la infección por HTLV-1 y en la del HIV; últimamente se está llamando la atención sobre la aparición del síndrome seco en pacientes con virus C de la hepatitis y en diversos trabajos se ha propuesto de manifiesto que la inflamación crónica por este agente puede dar lugar a alteraciones de la gammagrafía salival y en la biopsia de la glándula salival menos indistinguibles de las que se producen en el SS.<sup>16</sup>

### 2.7.3.2 Factores internos

Los factores constitutivos más relevantes son las hormonas y el complejo mayor de histocompatibilidad; la mayor prevalencia del SS en mujeres sugiere que algún factor hormonal desempeña un papel patogénico; las hormonas sexuales son capaces de regular diversas funciones inmunes, de forma general se puede sugerir que los andrógenos son inmunosupresores naturales mientras que los estrógenos son inmunoestimulantes; a partir de ello, el SS no parece mejorar en la menopausia, y la terapia hormonal sustitutiva no produce exacerbaciones de la enfermedad<sup>21</sup>. Todo ello sugiere que el predominio en la mujer no se explica únicamente por los niveles de estrógenos; se ha descrito la asociación del SS primario con los antígenos B8, DR2, DR3, DR5, DQ1, DQ2 y DRw53 del sistema HLA, mientras que el SS secundario se ha asociado al DR4 (en el contexto de AR); en diversos estudios se ha comprobado la expresión del antígenos del grupo HLA-D, tanto en el acino como en el epitelio de las glándulas salivales.

Para algunos autores en la patogénesis del SS parece ser relevante la existencia de errores en la selección tímica de clones de células T potencialmente autocorrectivas; otro aspecto potencialmente implicado en la patogenia del SS es el relacionado con el control periférico de los linfocitos T autocorrectivos; existe evidencia de que células T autocorrectivas pueden progresar hacia la anergia o apoptosis al reconocer en ciertas circunstancias a los antígenos propios en la superficie celular.

En los lugares de infiltración glandular y tisular en general se produce acumulación de linfocitos, la mayoría son linfocitos T CD4<sup>+</sup> entre 45-50% y en menor cantidad linfocitos T CD8<sup>+</sup> en un 10-20%. Los linfocitos T secretan diversas citocinas que regulan y mantienen la respuesta inmune, estas moléculas modulan la activación y proliferación de otras poblaciones linfocitarias, así como la expresión de antígenos de clase II del sistema HLA en las células parenquimatosas del órgano afectado. Algunos trabajos sugieren que el interferón  $\alpha$  (INF-  $\alpha$ ) es una citocina relevante en la patogénesis del SS. Se ha encontrado tanto en conductos excretores, como en el infiltrado linfocitario y en los vasos sanguíneos de biopsias de glándula salival de pacientes con SS, existiendo una fuerte correlación con la expresión de DR y la distribución del infiltrado linfocitario; todos estos datos apoyan la hipótesis de que el INF-  $\alpha$ , segregado por los linfocitos que infiltran el tejido glandular se une a receptores de las células epiteliales y de esto resulta un aumento de la expresión de antígenos de clase II del sistema HLA con la consiguiente facilitación de la interacción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. También se encuentra elevada la producción de interleucina-2 (IL2) en las muestras de secreción salival, mientras que en la sangre periférica esta disminuida. El factor transformador del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), según estudios recientes, puede tener

cierto efecto protector contra la aparición del SS en animales sanos; en seres humanos se ha encontrado una correlación inversa entre la presencia del TGF- $\beta$  y del grado de afectación de las glándulas salivales. En general, el estudio de las interleucinas en los pacientes con SS pone de manifiesto el aumento de la producción de INF-  $\alpha$  e IL-2 y disminución del TGF- $\beta$ , interleucina-3, interleucina-4 e interleucina-5; este perfil es característico de las denominadas repuestas “Th1” lo que apoya la hipótesis de que en el tejido inflamado se está produciendo presentación de antígenos y como consecuencia de ellos se provoca una respuesta específica de células T.

La hiperactividad inmunitaria en los tejidos lesionados, suele acompañarse sin embargo de linfopenia en el 50% de los casos en una marcada reducción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y un aumento relativo de células B; aproximadamente el 10-20% del infiltrado glandular son linfocitos B, fundamentalmente en forma de células plasmáticas que producen IgA e IgG. Esto parece ser consecuencia de que las células B maduran rápidamente hacia plasmáticas, probablemente por la interacción con linfocitos T en las áreas de inflamación; la activación de los linfocitos B es una característica típica del SS recientemente se ha considerado que esta activación policlonal de los linfocitos B es una consecuencia inespecífica de la alteración de la regulación del funcionamiento linfocitario, pero actualmente esta idea está siendo sustituida por la hipótesis de que dicha activación está dirigida por determinados antígenos. Se ha postulado que la activación de linfocitos B empieza siendo policlonal y localizada en los tejidos glandulares, posteriormente pasa a ser oligoclonal-monoclonal apareciendo enfermedad sistémica, y finalmente es preferentemente monoclonal, apareciendo transformación maligna.

#### 2.7.4 Respuesta inmune alterada

Entre los mecanismos implicados en la respuesta inmune 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 autoantígenos.<sup>21,22,23</sup>

Los autoanticuerpos característicos del SS son los denominados anti-Ro y anti-La (también referidos como anti-SSA y anti-SSB respectivamente; diversos hechos apoyan el posible papel patogénico del anti-Ro y anti-La, estos autoanticuerpos están asociados con las formas severa de SS y con manifestaciones clínicas más precoces. Así mismo, los pacientes con SS desarrollan con cierta frecuencia enfermedad por inmunocomplejos (vasculitis, glomerulonefritis) o crioglobulinemia. Además estas partículas proteicas (proteínas Ro y La) tienen importantes analogías en la secuencia de aminoácidos con diversas proteínas víricas, fundamentalmente de retrovirus, también implicadas en el procesamiento del ARN vírico; esto ha dado lugar a varias hipótesis patogénicas: una posibilidad es la existencia de mimetismo molecular que induzca una reactividad cruzada antigénica; otra es que algunas ribonucleoproteínas al unirse al ARN vírico, se comporten como autoantígenos. Recientemente se ha demostrado que en el SS se produce translocación de antígenos nucleares a la superficie celular, entre los que incluyen Ro y La. Esto podría proporcionar un mecanismo para la expresión de autoantígenos y contribuir a la patogénesis de la respuesta inmune que destruiría las glándulas exocrinas<sup>24</sup>.

### 2.7.5 Manifestaciones clínicas

En las manifestaciones sistémicas del SSp<sup>(25,26,27)</sup>, varios sistemas u órganos pueden ser blanco de un proceso inmunológico similar al de las glándulas salivales y lagrimales. En la siguiente tabla se resumen los tipos de compromiso más comunes asociados con el SSp.

<b>Sistema comprometido</b>	<b>Manifestaciones</b>
Músculo esquelético	Artralgias, Mialgias, Artritis, Miositis Fibromialgia.
Respiratorio	Sequedad nasal, Xerotrúquea, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad obstructiva, Pseudolinfoma, Linfoma.
Renal	Nefritis intersticial, Glomerulonefritis
Gastrointestinal	Disfunción esofágica, Gastritis crónica atrófica, Linfoma gástrico, Síndrome de mala absorción, Disfunción pancreática.
Hepatobiliar	Cambios histológicos compatibles con la cirrosis biliar primaria estadio 1, Hepatitis autoinmune.
Vascular	Vasculitis leucocitoclástica, Vasculitis visceral
Neurológico	Neuropatía periférica, Vasculitis sistema nervioso central, mielitis-esclerosis múltiple.
Hematológico	Anemia, Leucopenia, Gamapatía monoclonal, Crioglobulinemia
Linforeticular	Linfadenopatía, Esplenomegalia, Pseudolinfoma, Linfoma.

### 2.8 Modelo animal

#### 2.8.1 Antecedentes

La primera publicación relacionada con el ratón desnudo se realizó en el año de 1962 por J.H. Isaacson, B.M. Cattanach y N.A. Grist, este último envió dichos ratones y otros normales para su estudio al instituto de genética animal de Edimburgo, Escocia; en este instituto el doctor S.P. Flanagan realizó cruza y más tarde en el año 1966 reportó las siguientes características para el ratón desnudo: ausencia de pelo, baja fertilidad, inmunodeficiencia, tamaño reducido, atimia, además de un periodo de vida muy corto con presentación de un 100% de mortalidad a la edad de 25 semanas y una mortalidad infantil hasta del 45% en las dos primeras semanas de vida; demostró que los datos de segregación, que el fenómeno se deben a un solo gen autosomal recesivo que denomino nude (desnudo) y cuyo símbolo genético es “nu”, también reporto que los ratones normales son heterocigotos para el gen responsable de la ausencia de pelo.

En 1968 E.M. Pantelorius descubrió que los ratones homocigóticos recesivos para el gen nu/nu carecen de timo, mientras que los hermanos de camada homocigóticos dominantes +/+ y heterocigóticos nu/+ presentan timo normal; así mismo describió la presencia de una marcada leucopenia en los ratones atímicos (815-3380leucocitos/ $\mu$ L), mientras que sus hermanos fenotípicamente normales presentan niveles altos y otros con niveles intermedios, estos últimos fueron considerados heterocigotos nu/+.

A partir del reporte de Pantelorius se inicio una ola de investigaciones, que llevaron a la utilización del ratón desnudo para usos experimentales en diferentes disciplinas; el ratón atímico ha sido cruzado con otros ratones portadores de defectos inmunológicos aumentando el número de variantes de ratones con variaciones.

### 2.8.2 Características

En el ratón desnudo la actividad de las células B parece no estar alterada; Sprent y Miller estudiaron la circulación y el tiempo de vida media de los linfocitos torácicos y encontraron que la función de los linfocitos B fue de un 97%. La disgenia del timo produce una falta de maduración de las células T que llevan a un estado de inmunosupresión de estos animales. Con respecto a la síntesis de anticuerpos, se ha reportado en esta cepa que el contenido total de inmunoglobulinas, los niveles encontrados han sido inferiores, como en la IgA y en las subclases IgG1 e IgG2; estas observaciones hacen pensar a algunos investigadores que la relación IgM/IgG1 distingue la respuesta inmune humoral de estos ratones.

El ratón nu/nu presentan las mismas características fenotípicas del ratón et/et, solo se diferencian de que este último es hipotímico según estudios realizados, además se reporta que cuando estos ratones son nacidos y mantenidos en condiciones de libertad, el tiempo de supervivencia se incrementa y puede alcanzar hasta 2 años de edad. Algunos investigadores han determinado que en el ratón et/et existe un retardo en la aparición de la pubertad, esto no ocurre en la cepa et/+, aunque su fertilidad es semejante, los animales et/et presentan un ciclo estrógeno irregular quizá debido a su hipotímia. Según estudios realizados parece tener relación el bajo peso de las gónadas y próstata que modifica los niveles de gonadotropinas y hormonas sexuales que son descritos también en el ratón nu/un, esto denota la importancia del timo en la regulación del sistema reproductivo de estos animales.<sup>28,29,30.</sup>

### 2.8.3 Modelo experimental

El modelo animal que se utilizará en este estudio, es un ratón hipotímico alopésico derivado por una mutación espontánea de la cepa albina CD1, como un resultado de un gen recesivo autosómico simple, surgida en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM; los animales son obtenidos al aparear machos y hembras et/+. O bien machos y hembras et/et. A este ratón se le llamo CD1 et/et, el símbolo “et” se ha adoptado para referir la forma mutante y se encontró que los ratones machos de esta cepa, presentan un timo rudimentario el cual es aproximadamente la mitad del peso que representan los animales eutímicos CD1 et/+, mientras que en las hembras CD1 et/et, presentan una estructura parecida a un nódulo linfático en lugar del timo y el peso de esta estructura es más bajo que el peso del timo de las hembras eutímicas CD1 et/+. Los críos Cd1 et/et se separan de sus hermanos con pelo, de los cuales se diferencian al nacer por la ausencia de vibrisas (vibrissae), creciendo por separado, estos ratones se mantuvieron bajo condiciones convencionales de bioterio, con libre acceso de agua y alimento. Este ratón mutante tiene las siguientes características: desnudo, fertilidad baja, mortalidad alta, vida corta e hipotímico.

## 2.9 ELISA Polimixina

La técnica de 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 gramnegativas, utiliza anticuerpos específicos, traduciéndose en un procedimiento sensible y capaz de estandarizarse. Esta técnica puede utilizarse en bacterias como *P. intermedia* que son muy difíciles de aislar.

Esta técnica es una modificación del ELISA directo, en donde en lugar de utilizar un anticuerpo específico fijado al soporte (la placa de poliestireno), 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 unidos a la peroxidasa se unirán solo al LPS de interés, sin importar que otros LPS se hayan unido a la placa, una vez hechos los lavados, se adiciona el sustrato y cromógeno que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.<sup>31,32.</sup>

## 2.10 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina es una proteína plasmática, antioxidante, que participa en el metabolismo del cobre y el hierro en la célula. Esta globulina se sintetiza principalmente en el hígado, se dice que es una proteína de fase aguda.

Las funciones fisiológicas de la ceruloplasmina incluyen transporte de cobre, coagulación, angiogénesis, ayuda en el estrés oxidativo por captación de radicales superóxidos y secuestro de iones libres de cobre oxidación de lipoproteínas de baja densidad, homeostasis del hierro como ferroxidasa, catalizando la conversión de  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ .<sup>32,33</sup>

Se ha encontrado que los niveles de ceruloplasmina sérica y la actividad y cantidad de cobre se incrementan en enfermedades autoinmunes o daño celular. El transporte del cobre en los conductos biliares es interrumpido por el colapso de los conductos biliares interlobulares y por tanto el cobre se acumula en el hígado, así es probable que la actividad de la ceruloplasmina sérica aumenta para metabolizar los acúmulos de cobre en el hígado.<sup>34</sup> Sin embargo, los niveles de ceruloplasmina en suero no son significativos para el diagnóstico de padecimientos autoinmunes, pero si en el grado de cicatrización del hígado cuando este se ve dañado por factores físicos, químicos o biológicos.<sup>35</sup>

## 2.11 Nitritos

El óxido nítrico (NO) es un radical libre soluble y gaseoso, que es secretado no sólo por las células endoteliales sino también por los macrófagos y neuronas. Se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular y NADPH, por acción de la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS). En las células endoteliales y en las neuronas, la NOS está presente de forma constitutiva, y puede ser activada rápidamente por el incremento en la concentración citoplásmica de iones de calcio en presencia de calmodulina.

El NO realiza otras funciones importantes en la inflamación, reduce la agregación y adhesión plaquetaria. El NO producido por macrófagos actúa como un radical libre y es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Puede oxidar grupos sulfhidrilo de las proteínas con el consiguiente agotamiento del glutatión citosólico, y puede reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno (fuertemente oxidante) y un radical oxidrilo (intensamente reactivo)<sup>37</sup>.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La periodontitis es una enfermedad que afecta a una gran parte de la población y constituye una de las principales causas de la pérdida de dientes en la población adulta. Debido a que la respuesta inmune en esta enfermedad se puede ver trastornada por diferentes factores genéticos y ambientales, que puede derivar en una rápida destrucción a nivel periodontal; es importante conocer la patogenia durante el proceso de esta enfermedad. Con un modelo animal como el ratón CD1 que presenta una exocrinopatía parecida al síndrome de Sjögren, en la cual se suele expresar una disminución en la producción de saliva y de lágrimas, y debido a que su respuesta inmune se ve alterada por una hipotímia; se pretende comprender mejor la patogenia de la enfermedad periodontal, evaluando el grado de daño a nivel de periodonto, el proceso inflamatorio y el nivel de daño sistémico en la periodontitis ocasionada por *P. intermedia*.

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1 General

- Caracterizar la susceptibilidad del ratón CD1 et/et en la periodontitis por *Prevotella intermedia*

### 4.2 Específicos

- Identificar a *P. intermedia* del surco gingival del ratón por LPS de membrana utilizando el método de ELISA polimixina
- Observar el daño a nivel periodontal causado en la periodontitis por *P. intermedia*
- Evaluar el daño a nivel sistémico (renal, hepático y esplénico) en la periodontitis por *P. intermedia*
- Evaluar la presencia de Nitritos y Ceruloplasmina como marcadores del proceso inflamatorio en la periodontitis por *P. intermedia*

## **5. HIPÓTESIS**

El ratón CD1 et/et presenta hipotímia y su respuesta inmune es deficiente; por lo que en la enfermedad periodontal presentara menor daño a nivel periodontal y sistémico que en el ratón CD1 +/+ en el cual la respuesta inmune no se encuentra alterada.

## **6. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **6.1 Población en estudio**

Ratones de las cepas CD1 et/et, et/+ y +/+ de edades entre 4 y 6 semanas mantenidos en condiciones de bioterio, provenientes del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

### **6.2 Criterios de inclusión**

Ratones de las cepas CD1 et/et, et/+ y +/+ de edades entre 4 y 6 semanas mantenidos en condiciones de bioterio, infectados con *Prevotella intermedia* y que sobrevivan los 4 meses de tratamiento.

### **6.3 Criterios de exclusión**

Ratones de las cepas CD1 et/et, et/+ y +/+ menores de 4 semanas y mayores a 6 semanas de edad, y aquellos ratones infectados con *Prevotella intermedia* que no sobrevivan los 4 meses de tratamiento.

### **6.4 Tipo de estudio**

Experimental, Longitudinal, correlacional, prospectivo.

### **6.5 Variables involucradas en el estudio**

#### **6.5.1 Variable dependiente**

- Edad de los ratones involucrados en el estudio
- Concentración del inóculo de *Prevotella intermedia*

#### **6.5.2 Variables independientes**

- Las características genéticas de cada cepa de ratones
- La cepa de *Prevotella intermedia*

### **6.6. Análisis estadístico**

Aplicar el programa estadístico SPSS11 para Windows XP. Comparación de medias entre los diversos parámetros determinados.

Prueba de diferencias significativas de Tukey para los parámetros determinados contra las diferentes cepas, con una  $\alpha= 0.05$

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1. Equipo

Nombre	Marca
Microscopio digital	Dino-lite Am-311
Agitador rocker platform	Bellco Glass
Balanza analítica	Mettler H33AR
Balanza granataria	Ohaus
Baño maría	Lab-line
Campana de extracción	
Centrífuga	Solbat
Centrífuga clínica	Hamilton Bell
Congelador (-4°C)	Revco
Espectrofotómetro Uv visible	JENWAY 6305
Espectrofotómetro para ELISA	Dynatech MR 250
Estufa	Riossa
Incubadora	Riossa EC
Lámpara de Luz UV	Cole Palmer Ep/500/15468
Microcentrífuga	Hermle 2233M-2
Microscopio	Zeiss
Refrigerador	Philips 127 volts-VA

### 7.2 Material

Material	Proovedor
Placas de poliestireno de alta adherencia	Disposable Sterile Plates Corning 25801
Micropipeta de 5-40 µL	Finnpipette-Labsystems
Micropipeta de 10-100 µL	Labpette-Labnet
Micropipeta de 100-1000 µL	BIOHIT Proline
Pipeta automática	Finnpipette, de 20-400 microlitros
Placa para inmunodifusion	Falcon
Cajas petri	Pyrex
Jeringa de 3 mL	BD ultra-fine
Desecador	Pyrex
Pipeta graduada 2,5 mL	Pyrex
Tubos de ensaye 13 x 100mm	Pyrex
Tubos Eppendorf	Sin marca
Pisetas	Sin marca
Matraz Erlenmeyer de 250 mL	Pirex

### 7.3 Material biológico

Cepa	Número de ratones
Ratones CD1	12
Ratones CD1 et/+	12
Ratones CD1 et/et	12

## 7.4 Métodos

### 7.4.1. Aislamiento de *P. intermedia*

**Preparación de medio de cultivo** Agar Soya Trypticaseína enriquecido con Hemina y Menadiona (ASTHM) para cultivo de *P. intermedia*.

Para preparar 500 mL de medio de cultivo calculado para la obtención de 20 cajas se pesan:

Agar soya tripticaseína (AST)	20 g
Extracto de levadura	2.5 g
Agar-Agar	2.5 g
Formiato de sodio*	0.5 g
Hemina**	2.5 mL
Menadiona***	0.5 mL
Sangre de cordero desfibrinada	25 mL

\*concentración final de formiato de sodio en el medio 5%

\*\*concentración de hemina en el medio: 1µg /mL a partir de una solución madre de hemina 0.5 mg/mL

\*\*\*Concentración de menadiona en el medio 1µg /mL a partir de una solución madre de menadiona 5 mg/mL

En un matraz Erlenmeyer de 1 L disolver el AST, extracto de levadura y el formiato de sodio, agitar hasta disolver. Una vez disuelto agregar la hemina. Agregar el agua que baste para completar los 500mL. Esterilizar 120°C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

Dejar enfriar el medio hasta aproximadamente 45 °C, agregar la sangre de cordero desfibrinada utilizando una jeringa y procurando no generar burbujas ni hemolizar la sangre. Adicionar la menadiona y agitar.

Se llenan las cajas con aproximadamente 25 mL del medio, se flamean con el mechero y una vez que haya solidificado proceder a refrigerar.

#### **Preparación de solución madre de hemina**

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

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Mantener en refrigeración

#### **Preparación de solución madre de menadiona**

Vitamina K	100 mg
Alcohol etílico de 96°	20 mL

Esterilizar por filtración. Mantener en refrigeración en frasco ámbar durante 6 meses como máximo

### 7.4.2 Siembra de *P. intermedia*.

Las cepas fueron obtenidas a partir de muestras tomadas en la clínica de la FES ZARAGOZA, en pacientes que presentaban periodontitis. Las cepas se mantienen en caldo tioglicolato con tapón de aceite.

En un ambiente estéril, se toma con ayuda de una jeringa de insulina 1mL del caldo tioglicolato y mediante expulsión del líquido se resuspenden las bacterias del fondo del tubo. Se toma 1mL de la suspensión y se inocula 0.5 mL en cada caja de medio

ASTHM. Con un asa bacteriológica se distribuye el líquido en todo el medio y la caja es sellada para mantener la anaerobiosis. Las cajas son colocadas en una jarra de anaerobiosis.

Se incuba a 36 °C de 4-7 días.

#### **7.4.3 Aislamiento de *P. intermedia***

Una vez que en las cajas se registra crecimiento de las colonias, se procede a una resiembra por estría cruzada. Se incuba a 36 °C de 4-7 días.

A las colonias aisladas se procede a lectura de morfología colonial e identificación por tinción de gram.

##### **7.4.3.1 Morfología colonial.**

Colonias lisas, brillantes, convexas, circulares y con un pigmento marrón oscuro o negro tras varios días. Olor característico.

##### **7.4.3.2 Tinción de gram**

En un portaobjetos limpio y seco, se coloca una gota de agua, se toma con un asa bacteriológica una pequeña parte de la colonia, y se resuspende en la gota de agua, realizando un frotis. Se deja secar a temperatura ambiente, se le agrega cristal violeta suficiente para cubrir el frotis y se deja durante 1 minuto. Se enjuaga con agua, y se le adiciona lugol durante 1 minuto, se enjuaga con agua y se le añade alcohol-cetona durante 15 segundos, se enjuaga con agua y se le añade safranina, se deja actuar durante 1 minutos y se enjuaga nuevamente con agua. Se deja secar a temperatura ambiente y se observa a 40X, se le añade una gota de aceite de inmersión y se observa a 100X.

#### **7.4.4 Tratamiento**

Todos los ratones serán pesados, identificados según su genotipo. Los ratones se distribuirán de la siguiente manera: 12 CD1, 12 et/et y 12 et/+

Para cada ratón se debe registrar su peso corporal durante 3 días serán sometidos a un tratamiento de solución con penicilina (4000 U/mL), posteriormente serán inoculados durante 5 días seguidos con 2.5 mL en cavidad oral de una solución conteniendo la cepa de *P. intermedia* ajustada al tubo número uno de Macfarland.

Durante 15 semanas se mantendrán con una dieta rica en carbohidratos, se registrará el peso de los animales cada semana así como el número de animales muertos durante el tratamiento.

##### **7.4.4.1 Preparación del alimento**

Se mezclan 1 parte de fécula de maíz MAIZENA ® con 2 partes de azúcar, se agrega agua hasta obtener una mezcla homogénea de consistencia pastosa.

Se agrega alimento para ratones Rat chow® y se mezcla hasta obtener las croquetas con una cobertura uniforme.

Las croquetas se colocan sobre papel aluminio y se dejan secar a temperatura ambiente



#### **7.4.5. Sacrificio de los animales**

Los ratones son pesados y son sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub>.

#### **7.4.6. Obtención de muestras**

##### 7.4.6.1. Obtención de suero:

Se realiza una incisión axilar y se obtiene una muestra de sangre sobre un tubo de Eppendorf, se centrifuga a 5000 r.p.m durante 10 minutos, se separa el suero en otro tubo de Eppendorf y se almacena en refrigeración hasta su uso.

##### 7.4.6.2. Obtención de saliva:

Se toma una muestra de saliva en solución salina, se centrifuga y el precipitado se guarda hasta su posterior uso.

##### 7.4.6.3. Obtención de órganos:

Se extraen el bazo, el riñón y el hígado, se registrará el peso, y se analizarán los índices para evaluar la diferencia del daño ocasionado.

##### 7.4.6.4. Obtención de mandíbulas:

Los ratones son decapitados, se esterilizan las cabezas en una olla de presión de 21L a que alcanzará 125°C durante 15 minutos, se sacan las cabezas y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Se descarnan los cráneos, y se sumergen en una solución de KOH al 10% durante 24 horas para eliminar los residuos que puedan quedar. Se secan con papel higiénico para secar el exceso de KOH.

#### **7.4.7 Ceruloplasmina**

##### 7.4.7.1 Preparación de las placas:

Se pesa 0.3g de agarosa, en una balanza analítica, en un matraz de 250 mL y se agrega 30 mL de agua destilada, se coloca el matraz en una olla de presión de 21L a que alcanzará 125°C para disolver la agarosa, se deja enfriar y se agrega una pizca de azida de sodio. Se colocan 2 mL de agarosa con una pipeta graduada a 13 tubos de ensaye etiquetados. Se colocan a baño maría a 45°C durante 10 minutos, agregar a cada tubo 200µL de suero de conejo anticerculoplasmina y se agitan. Cada uno es vaciado en las placas de Falcon, evitando la presencia de burbujas, las placas se dejan reposar hasta su solidificación. Se realizan 4 perforaciones de 3mm en cada contenedor con agarosa y se utilizan el mismo día de su elaboración.

##### 7.4.7.2 Proceso de la muestra:

Se colocan 5 µL de suero de cada muestra problema en el orificio de los pozos de las placas, estos son identificados de acuerdo al número de cada muestra. Se coloca 5µL del estándar de Ceruloplasmina de ratón. Las placas se refrigeran durante 48 horas, se mide el halo de inhibición con una regla milimétrica.

#### 7.4.8 Evaluación del índice de los órganos

Con base al registro del peso final de los ratones antes del sacrificio, y el peso de los diferentes órganos extraídos, se calculan los índices hepático, renal y esplénico para determinar si hay alteraciones anatómicas en hígado, riñones y bazo respectivamente. La fórmula para calcular los índices es la siguiente:

$$\text{Índice de órgano} = \frac{\text{peso del órgano}}{\text{peso total del ratón}} \times 100$$

#### 7.4.9. Análisis de Nitritos (método de Griess)

En un tubo de 13 x 100 agregar 500mg de Cadmio, adicionar 2 mL de CuSO<sub>4</sub> al 5%, y agitar durante 10 minutos. Lavar con agua destilada, agitando y eliminando el precipitado, repetir el lavado 3 veces. Adicionar HCl 0.1N, realizar un lavado con NH<sub>4</sub>HCl y guardar hasta su uso.

Tomar 100 µl de suero, y adicionar 300 µl de agua (dilución 1:4), desechar 20 µl, y agregar 20 µl de ZnSO<sub>4</sub>, mezclar y centrifugar 5 minutos a 10 000 r.p.m. Retirar el NH<sub>4</sub>Cl al cadmio activado y agregar el sobrenadante de la muestra, tapar con papel Parafilm y agitar en Rocker durante 15 minutos, centrifugar a 3 500 r.p.m. durante 5 minutos, tomar 200 µl para el ensayo.

Realizar una curva patrón de acuerdo a los siguientes datos

Tubo	Estándar ( µl)	Agua destilada (µl)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Muestra	200del sobrenadante	700

Agregar a cada uno 50 µl de Sulfonamida e incubar durante 10 minutos, adicionar 50 µl de NED e incubar 30 minutos, leer a 540 nm.

#### 7.4.10 Determinación por ELISA Polimixina

Preparación de las muestras para ELISA.

Después de sacrificar a los animales, las cabezas son separadas del resto del cuerpo, se abre la boca del animal y se agregan 300ul de solución salina 0.85%, se enjuaga varias veces con esta solución la boca, esta solución es guardada hasta su posterior uso.

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 y reservar hasta su uso.

Técnica de 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 irradiación UV una hora, incubar a 37° C por una hora la placa, lavar 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05% y colocar 300 µL de bloqueador en cada uno de los pozos, incubar a 37° C durante 30 minutos, lavar 4 veces y adicionar 100 µL de cada muestra por pozo, cubrir la placa e incubar a 37° C por 30 minutos.

Lavar 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05%. Colocar 100 µL en cada pozo del conjugado (1:100), cubrir la placa e incubar a 37° C por 45 minutos.

Lavar 4 veces 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 de 15 a 30 minutos. Leer la placa en un lector de ELISA Awareness Technology INC, a 450 nm.

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<sup>16</sup>.

#### 7.4.11 Evaluación de la pérdida del hueso alveolar

Se esterilizaron las cabezas a 121° C, 15 lb de presión durante 15 minutos. Se sometieron a un proceso de descarnación, se blanquearon las mandíbulas con KOH al 40% durante 48 horas. La pérdida del hueso alveolar en el plano horizontal y vertical se evaluó dividiendo la mandíbula en cuadrante superior derecho, izquierdo, cuadrante inferior derecho e izquierdo. A cada cuadrante se le asignó un código proporcional al daño presentado en el hueso alveolar.

Códigos para el índice periodontal (IP)

Código	Significado
0	Tejido óseo normal, ausencia de resorción.
1	Resorción ósea incipiente en el reborde óseo, sin movilidad ni desalajo de dientes.
2	Resorción ósea de moderada a severa del reborde óseo, con o sin desalajo de dientes.

Una vez que se evaluaron los cuadrantes de cada individuo el cálculo del valor del IP se llevó a cabo aplicando la siguiente fórmula.

$$IP = \frac{\sum_{i=1}^n Xi}{n}$$

De donde

$\sum_{i=1}^n X_i$  = a la sumatoria de todos los valores de los hallazgos clínicos de la condición periodontal de los cuadrantes examinados, y “n” es igual a 4. De esta manera tendremos un valor de IP que corresponde a una calificación del estado general de cada individuo en cuanto a su salud periodontal.

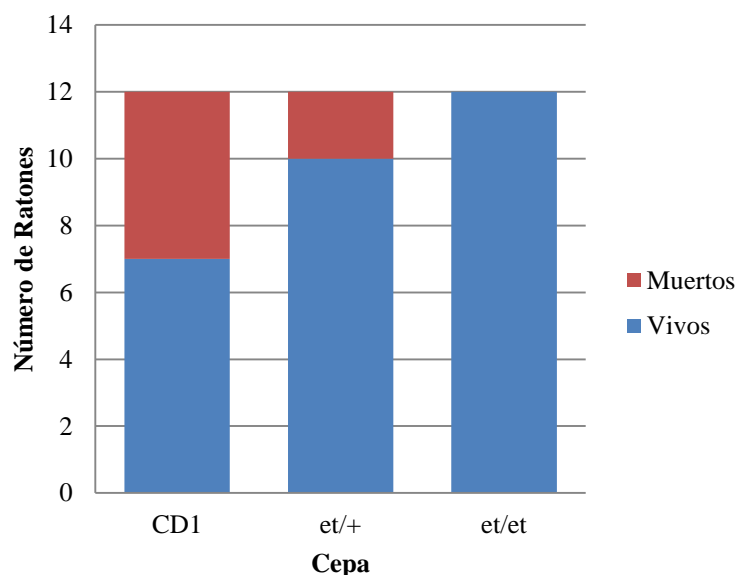
## Interpretación de la calificación del IP

<b>Calificaciones IP</b>	<b>Fase de la enfermedad</b>
<b>0 - 0.5</b>	Sin enfermedad ósea destructiva
<b>0.6 - 1.0</b>	Inicio de la enfermedad ósea destructiva, daño leve del periodonto.
<b>1.01 - 1.5</b>	Daño moderado al periodonto, resorción evidente.
<b>1.6 - 2.0</b>	Daño grave e irreversible del periodonto, pérdida de piezas dentarias.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Mortalidad

El registro de mortalidad después de los 4 meses de tratamiento, nos muestra que el mayor índice de mortalidad es para la cepa CD1; de la cual 5 de los 12 ratones murieron, para la cepa et/+ hubo 2 muertos mientras que en la cepa et/et no hubo ningún muerto (Gráfica1), hay una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre la cepa CD1 y et/et.



Gráfica1. Mortalidad obtenida por cepa de ratones infectados con *P.intermedia*

### 8.2 ELISA polimixina

Las muestras de saliva obtenidas se manejaron con la técnica de ELISA polimixina, se acomodaron siguiendo el tablero de ajedrez:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	PBS	PBS
B	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	PBS
C	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	PBS
D	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	PBS
F	X12	X13	X14	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24	PBS	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Acotación:

<b>LPS control positivo</b>
<b>Ratones tratados con <i>P. intermedia</i></b>
<b>Datos no utilizados en este experimento</b>
<b>PBS Control negativo</b>

Se calculó el valor de corte (VC), sacando la media(X) y la desviación estándar (SD) de los valores negativos (PBS), mediante la siguiente fórmula:  $VC = X + 2SD$ . Todo valor

que estuvo por arriba fue considerado positivo y lo que fue igual o menor al valor de corte es negativo. Aquellas muestras positivas cercanas al valor de corte se repitieron.

Los valores negativos utilizados para el valor de corte PBS son los siguientes: 0,22, 0,228 y 0,21.

0,035	0,153	0,123	0,11	0,121	0,179	0,056
0,183	0,147	0,171	0,09	0,029	0,136	0,063
0,141	0,066	0,181	0,14	0,069	0,074	<b>0,22</b>
0,17	0,091	<b>0,228</b>	0,066	0,103	0,058	0,095
0,154	<b>0,21</b>	0,101	0,104	0,124		

El valor de corte obtenido para la prueba de ELISA es de 0,201.

Media	Desviación estándar	Valor de corte 1	Valor menor	Valor mayor
0,12093939	0,053244682	0,227428759	0,029	0,228
Media	Desviación estándar	Valor de corte 2	Valor menor	Valor mayor
0,11759375	0,050449502	0,218492753	0,029	0,22
Media	Desviación estándar	Valor de corte 3	Valor menor	Valor mayor
0,11429032	0,047635556	0,209561435	0,029	0,21
Media	Desviación estándar	Valor de corte 4	Valor menor	Valor mayor
0,1111	0,044955419	<b>0,201010837</b>	0,029	0,183

Las muestras positivas a la infección por *Prevotella intermedia* obtenidas a partir del valor de corte fueron las siguientes:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	PBS	PBS
B	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>	<b>P10</b>	<b>P11</b>	PBS
C	<b>P12</b>	<b>P13</b>	<b>P14</b>	<b>P15</b>	<b>P16</b>	<b>P17</b>	<b>P18</b>	<b>P19</b>	<b>P20</b>	<b>P21</b>	<b>P22</b>	PBS
D	<b>P23</b>	<b>P24</b>	<b>P25</b>	<b>P26</b>	<b>P27</b>	<b>P28</b>	<b>P29</b>	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
E	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	PBS
F	X12	X13	X14	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24	PBS	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Acotación:

<b>LPS control positivo</b>
<b>Ratones tratados con <i>P. intermedia</i></b>
<b>Datos no utilizados en este experimento</b>
<b>PBS Control negativo</b>

La identificación del lipopolisacárido de *P. intermedia* por el método de ELISA polimixina mostró que la totalidad de los ratones están infectados con la bacteria.

### 8.3 Evaluación de la pérdida de hueso alveolar

Se evaluó la pérdidas de hueso alveolar en la cepas CD1, et/+ y et/et. Los resultados se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Evaluación de las cepas de acuerdo a su Índice Periodontal:

Cepa	Índice Periodontal	Fase de la enfermedad
CD1	1,03	Daño moderado al periodonto, resorción evidente.
et/+	1,10	Daño moderado al periodonto, resorción evidente.
et/et	0,64	Inicio de la enfermedad ósea destructiva, daño leve del periodonto.

El daño ocasionado por *P. intermedia* a nivel de hueso alveolar es mas severo en las cepa CD1 y et/+, mientras que las cepa et/et tiene un daño leve. Existe una diferencia significativa en el grado de daño entre la cepa et/et con respecto a las cepas CD1 y et/+.

### 8.4 Índices de los órganos

Se evaluó el índice Hepático, Esplénico y Renal en las cepas CD1., et/+, et/et. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Evaluación de los Índices Hepático, Esplénico y Renal por cepa.

Cepa	Índice Hepático	Índice Esplénico	Índice Renal
CD1	5,3329	0,3176	0,9269
et/+	5,4204	0,4920	1,1158
et/et	5,7525	0,4085	1,3321

Los índices obtenidos muestran que no hay una diferencia significativa ( $P>0.05$ ) para el índice hepático; en el índice esplénico hay una diferencia significativa ( $P<0.05$ ) para las cepas CD1 y et/+ y en el índice renal existe una diferencia significativa ( $P<0.05$ ) para las tres cepas.

### 8.5 Ceruloplasmina

Los Niveles obtenidos de ceruloplasmina para cada cepa de ratón CD1, et/+, et/et se muestran en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Niveles obtenidos de ceruloplasmina en las diferentes cepas de ratones.

Cepa de ratones	Concentración media de Ceruloplasmina
CD1	50,914
et/+	52,200
et/et	55,620

Los niveles de ceruloplasmina obtenidos para cada cepa no tienen una diferencia significativa ( $P>0.05$ ).

## 8.6 Nitritos

Los resultados obtenidos de Nitritos para cada cepa de ratón CD1, et/+, et/et se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Niveles de nitritos en las diferentes cepas de ratones.

Cepa de ratones	Concentración media de Nitritos
CD1	0,501
et/+	0,649
et/et	0,113

Para los niveles de nitritos obtenidos en las diferentes cepas no hay una diferencia significativa en los grupos.



## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

La diferencia mostrada en la mortalidad en las cepas concuerda con el nivel de daño a nivel de hueso alveolar, la periodontitis que es causada por una hipersensibilidad retardada, en la cual actúan diferentes estirpes celulares de defensa, al no ser específica en contra de *P. intermedia*, y debido a que dicha bacteria tiene mecanismos de defensa en contra de la fagocitosis, provoca un daño periodontal localizado debido a la respuesta inmune del ratón, y no por la bacteria. Debido a que los ratones et/et muestran hipotimia y presentan una exocrinopatía espontánea, en la cual su respuesta inmune celular está deprimida en relación a los ratones eutéimicos, la respuesta de hipersensibilidad se encuentra disminuida y como consecuencia presenta un daño menor y muestra una mortalidad también menor.

La evaluación del daño a nivel de órganos muestra que no hay daño a nivel hepático para las 3 cepas, el índice esplénico muestra una diferencia significativa entre la cepa CD1 y la cepa et/+, la cepa et/+ muestra un daño más severo a nivel periodontal, por lo que se deduce que el nivel de lesión periodontal es proporcional a la inflamación producida en el bazo debido a la infiltración de células de la respuesta inmune. El índice renal muestra una diferencia significativa en las tres cepas, siendo menor para la cepa CD1, y mayor para la cepa et/et, este daño puede estar ocasionado directamente por la bacteria, ya que al disminuir la capacidad de respuesta celular, aumenta la inflamación producida por el riñón, también se puede deber a que los riñones de la cepa CD1 tengan necrosis y que por lo tanto sean de menor tamaño que lo de la cepa et/et.

Las concentraciones en los niveles de ceruloplasmina y nitritos no muestran una diferencia significativa. La mayor concentración de estos analitos se encuentra en la cepa et/+, la cual presenta un daño a nivel de hueso alveolar más grave, la respuesta inmune de esta cepa es mayor, y se puede deducir que existe más inflamación, por una hipersensibilidad crónica que afecta directamente a la necrosis de los tejidos de sostén del diente y también genera necrosis renal.

La cepa CD1 muestra un daño moderado a nivel de hueso alveolar, el nivel de ceruloplasmina y nitritos es menor en comparación con las otras cepas, su respuesta inmune se altera en gran manera que puede provocar la necrosis del tejido de sostén del hueso alveolar y también la necrosis de algunos órganos como el bazo y el riñón, esta hipersensibilidad es de carácter agudo, lo cual puede causar la muerte de los individuos en un tiempo más corto. El daño ocasionado en estas cepas de ratones proviene de la respuesta exacerbada del sistema inmune en contra de la bacteria, debido a que el ratón et/et es hipotímico su respuesta inmune no es la adecuada, se refleja en un menor daño a nivel de hueso alveolar, la afectación necrótica está dada únicamente en el bazo. La adecuada respuesta inmune del ratón CD1 ocasiona el daño a nivel sistémico y a nivel de hueso alveolar, llevando a una hipersensibilidad aguda, que afecta la mortalidad de estos ratones.

La cepa et/et tiene un daño leve a nivel de hueso alveolar, hay una respuesta inflamatoria leve que va necrosando el bazo, su respuesta es una hipersensibilidad de carácter crónico, la cual afecta muy poco en conjunto a todo el organismo. Esto se explica por qué la respuesta inmune está alterada y no responde en su totalidad ante la agresión de la bacteria.

## 10. CONCLUSIONES

- La cepa CD1 es más susceptible a padecer periodontitis con respecto a las demás cepas, ya que presenta una hipersensibilidad aguda.
- *P. intermedia* es el agente infeccioso presente en el surco gingival, que ocasiono la periodontitis en los ratones.
- El daño periodontal es más severo en la cepa et/+.
- Existe una respuesta inflamatoria a nivel de bazo para la cepa et/+, y una inflamación a nivel renal para la cepa et/et. El hígado no se ve alterado en esta enfermedad.
- Los niveles de ceruloplasmina y nitritos se encuentran en el proceso inflamatorio crónico de la periodontitis en las cepas et/+ y et/et.

## 11. BILIOGRAFIA

- 1.- Stites D, Tristram G, Abba I. Inmunología básica y clínica. Manual moderno 10 ed. México 2002; 563-568.
- 2.- Socransky SS, Haffajee AD. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos y difíciles. *Periodontol* 2000 2003;3:12-55.
- 3.- Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol* 1999;4(1):7-19.
- 4.- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
- 5.- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-44
- 6.- Negroni M. Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica. 1ª ed. 3ª reimp. Buenos aires: Médica panamericana, 2004: 250-275.
- 7.- Koneman WE M, Allen. D. Stephen. MD, Janda .MW. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas. 5a ed. España: Editorial Médica panamericana, 2001: 724, 725, 728-736
- 8.- Finegold M. Sydney, Baron JE. Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico. 7a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana;1991: 488-494
- 9.- Cabrera Y M. 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.
- 10.- Finegold M. Sydney, Baron JE. Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico. 7a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana;1991: 488-494
- 11.-Mc Faddin Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 2a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1993: 228.
- 12.- Goldsby AR, kindt JT, Osborne AB, kuby J. Inmunología. 5a ed. México: Mc GrawHill, 2004: 95-97, 268-270.
- 13.- Tanner The impact of 16S rRNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Journal of Periodontology* 2000. 1994; 5: 26-51, 78-111
- 14.- Mueller PH. Periodontología. México: Editorial el manual moderno; 2005.
- 15.- Fiescher E. Talal N: Do viruses contribute to the development of sjögren's syndrome? *Am J Med* 1991; 90:283-285
- 16.- Fox RI, Robinson Ch A, Curd JG, Kozin F, Howell FV. Sjögren syndrome: its Clinical Manifestations and Associations. *Arthritis etiology, diagnosis, management:* 465-486.
- 17.- Sjögren HS: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca (Keratitis follicularis bei Hypofunktion der Tränen-drüsen). *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1933; 2:1-151.,
- 18.-Morgan W. Castleman B: A clinicopathologic study of Mikulicz's disease. *Am J pathol* 1953; 29: 471-503.
- 19 Fox RI, Howell FV, Bone RC, Michelson P: Primary Sjögren's syndrome: Clinical and Immunopathologic Features. *Semin Arthritis Rheum* 1984; 14: 77-106.
- 20.- Espindola ZN, Morales BJ, Witt GM, Romero CA, Vargas BJ, Hallazgos ecocardiográficos en el síndrome de Sjögren primario. *Arch Inst Cardiol Méx* 1997; 67(2): 114-125
21. Price EJ, Venables PJW. The etiopathogenesis of Sjögren's syndrome. *Sem Arthritis Rheum* 1995; 25: 117-133.
22. Green JE, Hinricks SH Vogel J, Jay GL. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* 1989; 341: 72-74
- 23.-Fox RI. Sjögren syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7: 409-416

24. Arraz CJA, Pérez GA, Zea MA, Alvarez-Mon SM. Síndrome de Sjögren. *Medicine* 1997; 7(54): 2437-2445.
- 25.- Dr Osvaldo Hubsscher; jefe de la unidad de reumatología CEMIC Buenos Aires; El síndrome de Sjögren ya no es considerado una rareza médica. Asociación Síndrome de Sjögren, Argentina.
- 26.-Cañas C, Jiménez C, Restrepo JF, Rondón F, Peña M, Sánchez A, Iglesias A. Síndrome de Sjögren primario (estudio prospectivo para conocer las características clínicas en nuestro medio) *rev. Col Reum* 1997; 4:126-130
- 27.- Anaya JM, Correa PA, Mantilla RD. Síndrome de Sjögren primario. Características clínicas e inmunogenéticas. *Acta Med Col* 1999;24:127-136.
- 28.- Marroquín R, Lara MA, Calvillo R y col. Exocrinopatía mostrada en el ratón hipotímico CD1 et/et que semeja al síndrome de Sjögren. *Vet. Méx* 2003; 34 (2): 129-141.
- 29- 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.
- 30.- Rojas O, Marroquín R, Wek K, Reyes E, Arce P. Susceptibility of “et,” the spontaneously mutating CD1-derived Nude Mouse, to infection of *M. lepraemurium*. *International Journal of Leprosy* 1998; Vol 67, n° 1: 46-51.
- 31.- Blais BW, Leggate J, Bosley J, Martinez-Perez A. Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of *Escherichia coli* 0157 by a novel polymixin-based ELISA. *Lett Appl Microbiol.* 2004, 39: 516-522.
- 32.- Blais BW, Bosley J, Martínez-Pérez A, 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
- 33.- Stauton E, Todd WE, Mason \_HS, Van Bruggen JT. *Bioquímica médica.* Cuarta edición. Interamericana; 1996.
- 34.- Das D, Tapryal N, Goswami SK, Fox, PL, Mukhopadhy CK. Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. *Biochem J.* 2007; 402: 135-141.
- 35.- Sogawa K, Yamada T, Suzuki Y, Masaki T, Watanabe S, Uchida Y et al. Elevation of ceruloplasmin in activity involved in changes of hepatic metal concentration in primary biliary cirrhosis. *Pub. Med.* 1994; 84(3):367-370.
- 36.- Worwood M, Taylor DM, Hunt AH. Copper and Manganese concentrations in biliary cirrosis of liver. *Med. J (brit).* 1968; Agosto: 344-346.)
- 37.- Guevara I. Iwanejko J, Dembi A, Pankiewicz J. Determinación of nitrite/ nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Departament of clinical Biochemistry, collegiums Medicum. Poland;*22 june 1988. Volumen 274, pages 177-188.

## 12. ANEXOS

### 12.1 Daño a nivel periodontal de la cepa CD1

#### 12.1.1 Clasificación 0



Foto 1: Mandíbula inferior derecha del ratón 1, se puede observar que no hay daño a nivel de la base dental, el hueso alveolar se encuentra integro.

#### 12.1.2 Clasificación 1



Foto 2: Mandíbula inferior derecha del ratón 2, se puede observar que el hueso alveolar del primer molar se encuentra disminuido; el segundo molar se encuentra ya muy dañado, por lo que se empieza a comprometer el sostén del diente.

#### 12.1.3 Clasificación 2



Foto 3: Mandíbula inferior derecha del ratón 3, se puede observar que el hueso alveolar de los 3 dientes se encuentra ya muy disminuido debido al daño ocasionado.

### 12.2 Daño a nivel periodontal de la cepa et/+

#### 12.2.1 Clasificación 0

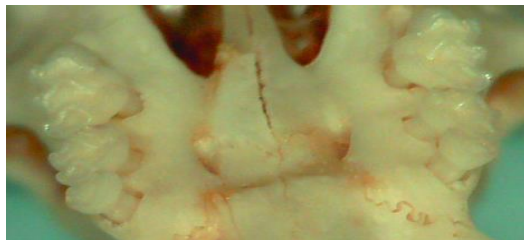


Foto 4: Mandíbula superior del ratón 9, se puede observar que no hay daño a nivel de la base dental, el hueso alveolar se encuentra integro.

### 12.2.2 Clasificación 1



Foto 5: Mandíbula inferior izquierda del ratón 15, se puede observar que el hueso alveolar del primer molar se encuentra disminuido; el segundo molar se encuentra ligeramente dañado.

### 12.2.3 Clasificación 2



Foto 6: Mandíbula inferior derecha del ratón 8, se puede observar que el hueso alveolar de los 3 dientes se encuentra ya muy disminuido debido al daño ocasionado, en el primer molar se observa ya el sostén del diente.



Foto 7: Dientes superiores frontales del ratón 14, se puede observar el daño del hueso alveolar de manera irregular en la base de los dientes.



Foto 8: Mandíbula inferior derecha del ratón 17, se puede observar que el hueso alveolar de los 3 dientes se encuentra ya muy disminuido debido al daño ocasionado, en el primer molar se observa ya el sostén del diente, así como pequeñas lesiones aisladas a lo largo del periodonto del ratón.

## 12.3 Daño a nivel periodontal de la cepa et/et

### 12.1.1 Clasificación 0

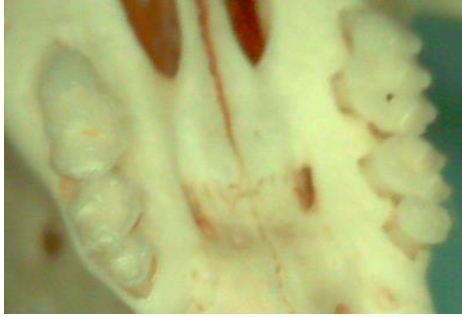


Foto 9: Mandíbula inferior derecha del ratón 19, se puede observar que no hay daño a nivel de la base dental, el hueso alveolar se encuentra íntegro.



Foto 10: Dientes superiores frontales del ratón 20, se puede observar que no hay daño del hueso alveolar ya que este se encuentra de manera regular en la base de los dientes.

### 12.1.2 Clasificación 1



Foto 11: Mandíbula inferior derecha del ratón 29, se puede observar que el hueso alveolar del primer molar se encuentra disminuido; el segundo molar se encuentra ligeramente dañado.

### 12.1.3 Clasificación 2



Foto 12: Mandíbula inferior derecha del ratón 21, se puede observar que el daño al hueso alveolar es disminuida; sin embargo existe la pérdida del primer molar.