

136  
2 Ejan



**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**IZTACALA UNAM**  
**Carrera de Cirujano Dentista**

**"UTILIZACION DE LA TECNICA DE INMUNOFLORESCENCIA  
EN LA DETECCION DE LA RESPUESTA INMUNE A LA  
CARIES"**

**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el Título de  
**CIRUJANO DENTISTA**  
P r e s e n t a

**CARLOTA ELENA FERNANDEZ TINOCO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
RESEÑA HISTORICA.....	2
CARIES.....	4
<u>Streptococo mutans</u> .....	7
INMUNIDAD.....	11
INMUNOGLOBULINA A .....	15
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	17
FASE EXPERIMENTAL.....	20
TRASCENDENCIA.....	21
JUSTIFICACION.....	22
HIPOTESIS.....	23
METODOLOGIA.....	24
RESULTADOS.....	31
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41

## INTRODUCCION:

A través de la historia y a medida que el hombre ha evolucionado el problema de salud se ha modificado y ha aumentado en interés; en la actualidad la caries afecta aproximadamente a un 95% de la población, lo cual es debido a diversos tipos de factores como son:

- Tipo de alimentación: Industrializada, blanda y altamente cariogénica.
- Hábitos de higiene: incorrectos, poco frecuentes ó ausentes.
- Herencia: defectos estructurales de los dientes anatómica e histológicamente que los hacen mas susceptibles a la caries.

Se han realizado numerosos intentos por crear una vacuna contra la caries, sin embargo esto no puede ser considerado como la panacea puesto que la etiología de la caries es multifactorial y sería ilógico delegarle la responsabilidad únicamente al sistema inmune.

El presente trabajo tiene como objeto demostrar que la respuesta antígeno-anticuerpo entre el Streptococo mutans, principal agente causal de la caries y la inmunoglobulina A (IgA) se lleva a cabo y que ésta tiene mayor efectividad en sujetos de sexo femenino que masculino, en un rango de edades de 3 a 9 años.

Para su realización se contó con 20 sujetos cuyas edades fluctuaron entre los 3 y los 9 años, de los cuales el 50% eran hombres y el otro 50% mujeres, tomándoseles muestras de saliva y datos como los siguientes: edad, sexo, tipo de alimentación, hábitos de higiene y

examen clínico; al final del experimento, se analizan los resultados y se comprueban o no nuestras hipótesis.

### RESEÑA HISTÓRICA:

A fines del siglo XVIII y principios del XIX, se consideraba a la caries análoga a la necrosis ósea y se creía que comenzaba dentro de la dentina, se pensaba que la perforación del esmalte formaba -- una vía natural de salida para el " absceso óseo " (23.).

Posteriormente se propuso la teoría de que las sales cálcicas eran disueltas por el ácido que resultaba de la simple descomposición de partículas alimenticias acumuladas en ciertas áreas de los órganos dentarios, se supuso entonces que la caries comenzaba en la superficie de los dientes; estas hipótesis son anteriores a la evolución de la microbiología y al conocimiento de la etiología de las enfermedades infecciosas. (23).

En la segunda mitad del siglo XIX, se descubrieron microorganismos -- en los tubos dentinales cariados, este fue el principio de la teoría quimicobacteriana actual sobre la caries.

Según los conocimientos actuales, la caries comienza en la superficie dental y para que ocurra descalcificación debe alcanzarse un pH de - 5.2 ó menos, además deben existir simultáneamente microorganismos que posean las enzimas necesarias y un substrato adecuado para que produzcan el ácido como resultado de su metabolismo.

En 1960 Keyes demostró la infección y la naturaleza transmisible de la enfermedad en animales experimentales.

Estudios realizados por Fitzgeral y Keyes demostraron que el agente -- transmisible es un tipo de estreptococo, el cual puede producir caries cuando se inocula libre en ratas.

En 1965 Krasse notó que hamsters mantenidos con dieta de sucrosa, mostraban superficies dentales rápidamente colonizadas por S.mutans en dichas superficies se apreciaban lesiones cariosas extensas. Subsecuentes estudios en el mismo año, mostraron que el S.mutans - humano aislado causaba caries en animales; recientemente Bratthall mostró que el S.mutans se encontraba pandémicamente en bocas humanas, Loesche et.al. observaron que proporciones elevadas de S.mutans se encuentran en la caries dental.

En 1966 Starting, Jordan y Keyes, Gibbons y Banghart, Guggenheim y Newbrun demostraron que cuando tipos cariogénicos de S.mutans se desarrollaron en sucrosa, produjeron grandes cantidades de glican y fructuosa extracelulares de alto peso molecular, esenciales para el ataque y la acumulación en superficies lisas.

En 1969 Genco et.al., reportaron que la saliva puede funcionar para regular microorganismos en el medio ambiente oral, algunos estudios en 1970 y 1971, sugieren que la adherencia selectiva bacteriana de los tejidos orales suaves pueden jugar también un papel importante - en la determinación de los componentes bacterianos en la flora oral en salud y enfermedad.

A principios de 1970 Brandtzal et.al. demostraron que la IgA secretoria es el principal componente funcional del sistema inmune secretorio.

En 1972 Williams y Gibbons reportaron un efecto inhibitorio de anticuerpos naturales de la clase IgA apareciendo en el fluido de la parótida humana, en la adherencia de la bacteria a células epiteliales-orales in vitro; investigadores de la Universidad Estatal de N.Y. en Búffalo y la Universidad de Florida, demostraron la inhibición in vitro de la adherencia de S.mutans a las superficies lisas por el anticuerpo. (4).

En 1974 Taubman y Smith, usando ratas normales y gnotobióticas - mostraron que la inmunización en la vacunación de las glándulas - salivales con preparación de S.mutans muertos en adyuvante de - - Freund dan por resultado anticuerpos específicos en la saliva, -- con bajos promedios de caries, observaron también que la reducción de caries fue mayor en superficies lisas que en superficies oclusa les. (4).

En 1975 Mc Ghee et.al., reportaron una respuesta específica salival de IgA obteniendo bajos promedios de caries en ratas gnotobióticas-inmunizadas en la región submandibular con células completas muertas de S.mutans (8).

Emings, Evans y Genco encontraron un incremento de IgA secretoria - en la saliva parotídea de los animales inmunizados.

Experimentos adicionales en ensayos llevados por estos investigadores mostraron que la IgA secretoria en la saliva de primates, fue altamente específica para serotipo de S.mutans, e inhibió marcadamente - la implantación de S.mutans en las bocas de los animales vacunados.

En un estudio recientemente reportado por Crawford et.al., observaron que la inmunoglobulina predominante en las secreciones de la glándula menor labial humana es la IgA. Estos investigadores notaron que la glándula salival menor, produce de 30 a 35% de IgA que el resto - de la cavidad oral y sugieren que por el potencial de estas glándulas para estimulación de antígeno, puede ser una fuente importante de los factores inmunes involucrados en la regulación de los microorganismos de la cavidad bucal.

## C A R I E S :

La caries dental es una enfermedad bacteriana en la cual las estructuras duras del diente son destruidas progresivamente. Para que se produzca la caries, el ácido formado por la desintegración de los carbohidratos mediante las bacterias en la placa dental, debe disolver el esmalte de los dientes antes que el flujo constante de saliva pueda lavar el ácido, dos propiedades de la placa permiten que esto suceda:

- a). - La placa contiene una alta concentración de bacterias que permite la producción de grandes cantidades de -- ácido en un período corto de tiempo.
- b). - La difusión de materiales a través de la matriz comparativamente lenta, los ácidos formados en la placa requieren un período mayor para difundirse en saliva.

Debido a que la velocidad a la cual se produce el ácido es mayor que la velocidad a la que se difunde a partir de la placa hacia la saliva, se acumula ácido en la placa.

Cuando se acumula ácido en la placa, el pH de ésta desciende y -- puede medirse con relativa facilidad con microelectrodos de antimoniaco o vidrio.

La disolución del esmalte depende de las condiciones de la solubilidad del fosfato de calcio en la placa y la superficie del diente. El fosfato de calcio es una sal que constituye casi toda la porción inorgánica de esmalte y dentina, tiene solubilidad baja a pH neutral y ligeramente ácido, pero se hace progresivamente mas soluble conforme disminuye el pH por debajo de 5.0.

Mientras la saliva permanezca sobresaturada con fosfato cálcico, el esmalte estará protegido y se puede tolerar la formación de alguna cantidad de ácido antes de que el diente se disuelva. Dicho ácido es producido por el S. mutans principal organismo causal de la caries; - en el medio ambiente bucal podemos encontrar tambien otro tipo de microorganismos Nolte menciona el siguiente porcentaje que se encuentra en el proceso carioso:

Estreptococo facultativo.....	27%
Difteroide facultativo.....	23%
Difteroides anaerobios.....	18%
Peptoestreptococos.....	13%
Fusobacterias.....	4%
Neisseria.....	3%
Vibrlos.....	2%



El S.mutans es capaz de fabricar una masa de dextrán de la placa mediante su enzima glucosiltransferasa, la cual descalcifica al diente. (23).

En 1971, se estableció por experimentos con animales de laboratorio, la importancia de S.mutans como inductor de la caries, se observó su habilidad para formar placa rápidamente en la superficie dentaria. (4).

Recientes investigaciones han confirmado que la sucrosa derivada - del glican extracelular facilita la colonización de las superficies lisas por S.mutans, otros mecanismos incluyen la agregación bacteriana, la atracción electrostática, las reacciones de tipo receptor específico, la presencia de inmunoglobulina en la saliva y la retención mecánica, pueden también determinar el éxito o el fracaso de la bacteria para adherirse a los dientes y otros tejidos humanos. (4).

Los siete serotipos de S.mutans pueden ser aislados de la placa humana sin embargo no todos parecen ser cariogénicos.

Desde 1971, reportes de algunos laboratorios han confirmado que la caries puede ser parcialmente prevenida en monos y roedores por la vacunación de una gran variedad de antígenos, el mayor éxito se ha logrado por la inyección intraoral con células muertas de S.mutans.

Evidentemente la protección depende en su mayoría de la inducción de niveles elevados de anticuerpos salivales. (4).

## Streptococo mutans:

El S. mutans pertenece a la familia STREPTOCOCCACEAE, género -- Streptococcus, no forma esporas, es aeróbico facultativo, capsulado e inmóvil. Como organismo aerobio facultativo, prefiere vivir aerobicamente, pero se adapta a las condiciones anaeróbicas de crecimiento. Un organismo aeróbico es aquel que requiere oxígeno o aire atmosférico para su desarrollo y crecimiento (20).

S. mutans se adhiere fuertemente al esmalte y parece ser el primero que coloniza las superficies dentales, formando polisacridos extracelulares mediante la enzima glucosiltransferasa y --- fructosiltransferasa activa en sucrosa. (4).

El polímero que se forma primariamente se conoce como glicano, -- es un componente de la glucosa  $\alpha$ 1-3 marcada, el cual contribuye a la habilidad patogénica del microorganismo, aumentando su -- capacidad para adherirse a la superficie, protegiéndolo de la sa liva sirviéndole como un mecanismo de nutrientes esenciales, actuando como fuente que le proporciona carbohidratos y aumentando los límites de difusión de sustancias a través de la placa dental.

El S. mutans es además un potente productor de ácidos de una amplia variedad de hidratos de carbobo. (4).

S. mutans pertenece a un grupo genéticamente heterógeno. En agar -- mitis-salivarius produce colonias altas convexas, de color azul cla ro de 0.5 a 1 mm. de diámetro que tiene márgenes ondulados y una estructura interna característica finamente granular. También se han identificado las variantes lisas. Debido a la síntesis de dextranos a partir de sacarosas, se puede colectar de estas colonias un exudado -- acuoso. (22).

Estos estreptococos crecen en un medio que contiene 4% de NaCl, no producen amoníaco a partir de arginina, no hidrolizan el almidón, fermentan la insulina, el manitol y el sorbitol.

En caldo sacarosa se produce un dextrano precipitable por un volumen de etanol.

Los estreptococos orales difieren en su capacidad para producir caries, aunque todas las especies son capaces potencialmente de producir caries en las fosas y fisuras de los dientes, sólo - - S. mutans origina lesiones en las superficies lisas. Su cariogenicidad se relaciona con su capacidad para unirse y acumularse en los dientes. Se piensa que su habilidad para agregarse es resultado de sus características superficiales que le permiten interactuar con las moléculas de dextrán de modo que los organismos se unen. Los dextranos le permiten adherirse a las superficies duras.

Estructura y función del polisacárido tipo específico del S. mutans:

La habilidad del microorganismo para adherirse a la superficie dental y participar en la formación de la placa depende en gran parte de la síntesis de polímeros extracelulares de sucrosa; se ha demostrado que la habilidad del S. mutans para adherirse a la superficie bucal *in vitro*, se inhibe cuando se emplea un antisuero que interfiere en la formación de placa, lo cual se explica en parte por la presencia de anticuerpos dirigidos a la superficie celular de antígenos tipo específico.

Cuando las células completas de S. mutans se usaron como antígeno en experimentos de inmunización, los animales inmunizados tuvieron menos organismos cariogénicos o baja incidencia de caries. (4).

En la saliva y el suero de animales inmunes se detecta el anticuerpo dirigido al antígeno tipo específico por la reactividad en la superficie celular de S.mutans.

Se ha categorizado serológicamente al S.mutans en por lo menos siete serotipos ( a-g ), se considera que el extracto 6715 se localizó en la superficie celular, esto se confirmó en estudios ultraestructurales usando la técnica de inmunoperoxidasa. Otros estudios indican que en la célula de S.mutans 6715, el antígeno tipo específico tiene una localización superficial y una distribución uniforme alrededor de la superficie bacteriana. (4).

Se ha reportado que el antisuero dirigido contra el antígeno serotipo a bloquea la adherencia del S.mutans a las superficies bucales lisas, este mecanismo depende aparentemente del bloqueo de la unión de la glucosiltransferasa a la estructura dentaria.

Para que S.mutans exprese su virulencia es necesaria su adherencia, que resulta de la fermentación de manitol y sorbitol (ambos producidos por la glucosiltransferasa) que el microorganismo -- lleva a cabo produciendo glican insoluble en agua.

Los estudios *in vitro* que muestran inhibición de las propiedades de adherencia del S.mutans causada por el uso de suero serotipo específico y adsorción, apoyan el propósito de que los antígeno serotipo purificados, sean usados como una posible vacuna contra la caries.

El S.mutans tiene muy baja afinidad para superficies epiteliales en la boca, sin embargo, cuando la sucrosa está presente en la boca del huésped, coloniza las superficies dentales sirviendo como un sustrato para la síntesis de novo de dextranos insolubles, los cuales se adhieren a la superficie dental y son rápidamente unidos por receptores de dextrán, son determinantes inherentes de la adherencia y virulencia de S.mutans.

Los carbohidratos receptores al estreptococo oral pueden dividirse en dos categorías funcionales:

- 1a. Receptores que unen productos bacterianos específicos para llevar a cabo agregación celular y células para la superficie de la adherencia.
- 2a. Receptores que unen productos del huésped para llevar el enlace de la célula bacteriana a la superficie del huésped.

El dextrán ( ó glican ) receptor de S.mutans, es el único ejemplo conocido de un carbonhidrato receptor en la primera categoría. Este receptor utiliza los dextranos producidos por S.mutans y quizá por otros estreptococos orales para mediar la formación de agregados de células de S.mutans a las superficies.

S.mutans es el único entre los estreptococos orales en su habilidad para sintetizar y unir dextranos o glicanos solubles e insolubles. La unión de estos polisacáridos ha mostrado como resultado la adherencia intercelular, cuando los dextranos solubles de alto peso molecular ramificados, son unidos tienen implicaciones en la célula para la adherencia superficial cuando dextranos adherentes son unidos.

## INMUNIDAD:

Se conoce como inmunidad a la capacidad que nuestro cuerpo - posee para evitar las enfermedades, resistiendo e así todos los tipos de toxinas y organismos que tienden a lesionarlo. (16).

Conocemos la existencia de dos tipos de inmunidad, en primera instancia la inmunidad innata que depende de las funciones corporales generales y que incluye los siguientes factores:

- a).- Destrucción de bacterias y gérmenes que son deglu  
tidos y pasan al estómago y son desintegrados --  
por las secreciones ácidas y las enzimas digesti  
vas.
- b).- Resistencia de la piel a la invasión por microor  
ganismos.
- c).- Destrucción de organismos ó toxinas por los glóbu  
los blancos y el sistema reticuloendotelial.
- d).- Presencia en la sangre de ciertos compuestos quími  
cos que se unen a los organismos extraños o a las  
toxinas y los destruyen.

Por otro lado, la inmunidad adaptativa es específica para gérmenes  
determinados o toxinas que invaden el cuerpo, dentro de un sistema  
especializado muy desarrollado.

Cuando se presenta el primer contacto con el gérmen, la mayoría de  
las veces el cuerpo no lo resiste, pero a partir del mismo, el siste  
ma inmune especial desarrolla una gran resistencia contra el invasor,  
dicha resistencia es específica para ese tipo de gérmen.

Este tipo de inmunidad se presenta después de una primera invasión, por lo que el cuerpo dispone de un mecanismo para reconocer la invasión inicial; son los antígenos los que originan la inmunidad adaptativa. En general se trata de proteínas, polisacáridos de gran volumen ó complejos lipoprotéicos muy voluminosos.

Dicho sistema inmunológico está integrado por dos componentes -- principales: la inmunidad humoral y la inmunidad celular, las cuales se desarrollan a lo largo de vías de diferenciación separadas pero interrelacionadas donde intervienen diversos tipos de células y tejidos.

La célula central es el linfocito, se han identificado dos poblaciones principales de linfocitos, los B y los T, mediante marcadores -- sobre la membrana y actividades funcionales de los linfocitos. (16).

Los sistemas inmunitarios humoral y celular reaccionan a los antígenos, usualmente proteínas extrañas al cuerpo como las bacterias o los tejidos extraños. La inmunidad humoral es debida a los anticuerpos circulantes en la fracción de  $\gamma$ -globulinas de las proteínas -- plasmáticas. Es una defensa importante contra las infecciones bacterianas. La inmunidad celular es mediada en parte por los productos -- linfocitarios de alto peso molecular llamados linfocinas y es la responsable de las reacciones alérgicas retardadas, de los rechazos de trasplantes de tejido extraño y del rechazo de células tumorales.

Durante el desarrollo fetal, los precursores de los linfocitos existentes en el timo, se transforman por el ambiente de este órgano en linfocitos responsables de la inmunidad celular (Linfocitos T). (13).

En las aves, los precursores que pueblan la Bolsa de Fabricio, se transforman en linfocitos B responsables de la inmunidad humoral.

En los mamíferos no existe la Bolsa y parece que la transformación en linfocitos B ocurre en el hígado fetal y posiblemente en el bazo fetal. Después de la residencia en el timo o en el hígado y el bazo, muchos de los linfocitos T y B emigran a los ganglios linfáticos y a la médula ósea (13).

La inmunidad celular está mediada por los linfocitos T que se encuentran en todo el cuerpo. Cuando estas células encuentran los antígenos sobre las células de otro individuo o sobre las células tumorales o los virus, son activadas, se agrandan, se dividen y liberan linfocinas, sustancias de alto peso molecular que participan en el ataque contra una proteína extraña, tienen primotipos capaces de reconocer virtualmente todos los antígenos concebibles los linfocitos T efectores, se especializan en reconocer los antígenos histocompatibles, esto significa, los antígenos sobre las células vivas que las distinguen entre las células propias y las extrañas. Una vez activada la célula T crece, se divide y produce lisis independiente del complemento de las células extrañas por lo que son llamados también citotóxicos.

El sistema de linfocitos T es el responsable del rechazo de un tejido trasplantado. (13).

Los linfocitos B tienen receptores para antígenos particulares en la superficie. Cuando el antígeno se une a la célula, ésta es estimulada para dividirse y sus células hijas son transformadas en células plasmáticas. Estas células secretan grandes cantidades de anticuerpos hacia la circulación general. Los anticuerpos circulan en la fracción de  $\gamma$ -globulinas del plasma y como anticuerpos en cualquier otro lado, son llamados inmunoglobulinas. (13).

Las inmunoglobulinas son moléculas protéicas que portan actividad de anticuerpos, es decir, la propiedad de combinarse específicamente con la sustancia que provocó su formación (antígeno). (16).



Con la posible excepción de los anticuerpos naturales, los anticuerpos se originan como respuesta a las sustancias extrañas producidas en el cuerpo, las inmunoglobulinas comprenden un grupo heterogéneo de proteínas que constituyen el 20% de las proteínas plasmáticas totales.

Existen cinco tipos de inmunoglobulinas denominadas:  
IgA, IgE, IgD, IgG , IgM.

La IgA, predomina en las secreciones corporales y proporciona el mecanismo de defensa primario contra la infección local debido a su abundancia en la saliva, las lágrimas, las secreciones bronquiales, la mucosa nasal, el líquido postático, las secreciones vaginales y las secreciones mucosas del intestino delgado. (16).

## INMUNOGLOBULINA A:

El sistema secretorio de inmunoglobulinas IgA, constituye el - mayor factor en la protección mediada por anticuerpos de las su-  
perficies mucosas. Las inmunoglobulinas diméricas IgA son secre-  
tadas como IgA secretorias (SIgA), a través de la mucosa o las  
glándulas exócrinas sobre las superficies mucosas. En la cavidad  
bucal SIgA es secretada por las glándulas salivales menores.

Las células productoras de anticuerpos responsables de la produc-  
ción de SIgA, se encuentran en los tejidos linfoides submucosos.  
Las inmunoglobulinas IgA diméricas que contienen una cadena J, son  
sintetizados por los linfocitos B y las células plasmáticas, las  
cuales son las encargadas de la producción SIgA.

La interacción de estas células con un componente secretorio pro-  
ducto de las células epiteliales (-SC) puede ser responsable en -  
parte de la concentración de células productoras de SIgA, presen-  
tes en las superficies submucosas, las glándulas exócrinas y los  
ganglios linfáticos que desaguan las zonas mucosas. El componente  
secretorio ayuda al transporte de IgA dimérica a través de las cé-  
lulas epiteliales y protege a la molécula SIgA contra la digestión  
proteolítica. (29).

Kennedy et.al. encontraron que el número de anticuerpos aglutinan-  
tes de paredes celulares de ciertos estreptococos cariogénicos era  
mayor en el suero de pacientes libres de caries que en los pacientes  
con caries rampante.

En contraste, sin embargo, Lehener et.al. observaron que el suero de  
pacientes con alta experiencia previa de caries, contenían mas anti-  
cuerpos hematoaglutinantes para organismos cariogénicos, que el sue-  
ro de sujetos con bajo número de lesiones cariosas. La evidencia in-  
dica que el anticuerpo IgA aumenta la habilidad de los polimorfonu-  
cleares para fagocitar S.mutans (4).

la población de células blancas en saliva puede ascender cuando mucho a 540 células por  $\text{mm}^3$ , significativamente se encontraron más leucocitos intactos en la saliva de pacientes libres de caries que en la saliva de pacientes con caries activa.

Secuencia de la formación de placa en las superficies lisas de los dientes:

- a).- Adherencia de la bacteria a la superficie
- b).- Multiplicación de los microorganismos y desarrollo de un medio ambiente que parece involucrar la secreción de polímeros de glican.

La acción de los anticuerpos para S.mutans, puede ser dirigida primariamente a una inhibición de la adherencia de estas células a la superficie del diente; un poco más que un efecto bactericida de la lisis sérica o la digestión fagocítica de los cocos S.mutans que colonizan las superficies preferentemente.

En monos y ratas inmunizados con células completas de S.mutans, los títulos de IgA salival se han visto incrementados; en monos los anticuerpos salivales inhiben la implantación del microorganismo. (4).

## MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA:

La *inmunelectroforesis* es la propiedad de las partículas - cargadas eléctricamente de desplazarse en una dirección determinada dentro del campo electroforético, se produce tanto en las macromoléculas cargadas como en las bacterias. (25).

La *fluorescencia* es un fenómeno que presentan ciertas sustancias, por el cual, si se les ilumina o radia con luz de onda corta (ultravioleta), son capaces de convertir esta luz de onda corta que es invisible en luz de onda larga que es visible. En el caso de la verdadera fluorescencia, la luz de onda larga sólo es visible mientras dura la radiación de la sustancia con luz ultravioleta. En determinadas circunstancias puede ocurrir que la radiación visible inducida persista algún tiempo después de retirar la fuente de rayos ultravioleta, en cuyo caso el fenómeno se denomina "*fosforescencia*". (7).

Cuando se trata una mezcla de bacterias con una solución de un colorante fluorescente los organismos que combinan o retienen - en cualquier forma este producto se hacen fluorescentes y pueden verse en un campo microscópico iluminado con luz ultravioleta. (25).

*Técnica anticuerpo-fluorescencia.* Cuando se inyectan bacterias - en un organismo animal, éste responde produciendo en la corriente sanguínea sustancias solubles que se combinan con dichas bacterias, las bacterias inyectadas son el antígeno y la sustancia soluble el anticuerpo.

La combinación del antígeno con el anticuerpo constituye una reacción serológica o inmunológica. El anticuerpo puede combinarse - químicamente con un colorante fluorescente, como la fluoresceína, - el organismo aparece luminiscente, lo que indica que se ha realiza

de la reacción antígeno-anticuerpo.

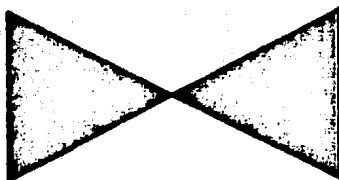
Técnica de anticuerpos fluorescentes; es un procedimiento inmunológico indirecto que hace visible la reacción que tiene lugar cuando un anticuerpo conocido, marcado con un colorante -- fluorocromático, se combina con su antígeno homólogo.

Si un cultivo mixto o una muestra, puestos en un portaobjetos -- se mezcla con suero que contiene el anticuerpo fluorescente conocido y se observa con microscopía en campo obscuro corriente, -- todos los organismos presentes aparecerán brillantes sobre el -- fondo obscuro, pero si la misma preparación microscópica de -- fluorescencia, iluminada con un foco de luz ultravioleta apropiado, sólo serán visibles aquellos antígenos que han quedado revestidos por el anticuerpo marcado con el colorante fluorescente.

Procedimiento: La primera fase y la más difícil de la técnica -- de los anticuerpos fluorescentes, es el marcaje de los anticuerpos con el color fluorescente, (uno de los colorantes más satisfactorios es el isotiocianato de fluoresceína ).

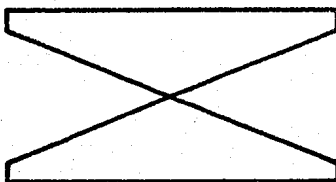
La segunda opción es fijar en el portaobjetos el antígeno del cultivo con acetona, metanol, etanol ó aún el calor.

A continuación se vierte la preparación fijada, unas gotas de la -- solución (en suero) del anticuerpo marcado y se deja actuar durante 10 minutos a 37°C, ó una hora a temperatura ambiente. Se lava -- para eliminar el exceso del anticuerpo fluorescente y se monta en glicerina con un amortiguador quedando lista la preparación para -- el examen de iluminación. (25).

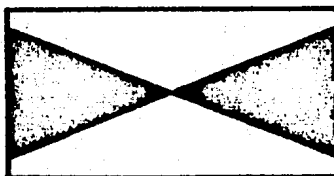


ANTICUERPO MARCADO

+



ANTIGENO NO MARCADO



PRODUCTO MARCADO

TECNICA DEL ANTICUERPO FLUORESCENTE TINCION DIRECTA REPRESENTADA ESQUEMATICAMENTE.

FASE EXPERIMENTAL

## TRASCENDENCIA:

Siendo la caries una entidad nosológica que afecta en gran porcentaje a la mayoría de la población, causando la pérdida del órgano dentario total o parcialmente, es de suma importancia el conocimiento de todos y cada uno de los factores que influyen en su aparición y desarrollo, así como la manera de eliminarlos en su gran mayoría.

El sistema inmune constituye una fuente potencial en la detección y destrucción de los microorganismos causales de la caries, esta protección está a cargo de la IgA presente en saliva, al realizar este experimento de manera representativa y cualitativa podremos darnos cuenta de cual es el comportamiento del individuo ante el proceso carioso y cuales son los factores que favorecen o disminuyen la respuesta inmune.

Este trabajo puede ser útil como base para futuros experimentos al mencionar técnicas específicas para el S. mutans y resultados que son válidos para el tipo de población que se maneja los cuales en determinado momento puede ser punto de partida para subsecuentes experimentos.



## JUSTIFICACION:

Cuando el proceso carioso se ha instalado unicamente puede ser detenido eliminando la infección mediante la remoción del tejido carioso y la restauración de la porción perdida con algún material de obturación.

Desde el punto de vista prevención es importante el poder detectar que la respuesta inmune a la caries está presente, para que ésta, aunada a la higiene y a una buena alimentación, se refuercen entre sí y no permitan el inicio del proceso carioso.

El realizar este trabajo con una población minoritaria se debió a que probamos una técnica que nos diera resultados confiables, si la respuesta inmune a la caries existe, se puede pensar posteriormente en llevar a cabo experimentos con una población mayor, manejando otro tipo de variables para establecer que factores y en que medida influyen en el desarrollo de la caries, y de qué manera en un nivel de prevención se puede eliminar para lograr con ello un índice de caries menor en la población.

## HIPOTESIS:

### *Hipótesis Nula:*

*La respuesta antígeno-anticuerpo es mayor ó igual en mujeres que en hombres.*

### *Hipótesis alterna:*

*La respuesta antígeno-anticuerpo es menor en mujeres que en hombres.*

## METODO:

El método que se siguió para realizar el experimento, se divide en seis fases:

### FASE "A"

#### Obtención del S. mutans:

Se realizó a partir de una cepa liofilizada de S. mutans 38 manitol sorbitol, proporcionada por el laboratorio de Microbiología de la ENEPI.

Para poder emplearlo fue necesario rehidratar la cepa liofilizada y sembrarla a fin de que se reproduzca logrando con ello una siembra masiva para posteriormente la reacción antígeno-anticuerpo, llevarla a cabo.

Elaboración del medio de cultivo selectivo para S. mutans, agar mitis -salivarius.

#### Material:

Físico: Matraz Erlenmayer (3)

Pipetas milimétricas (2)

Probeta de 100 ml. (1)

Matríz Kitasato para filtrar al vacío.

Membrana Millipore

Abatelenguas

Gasa

Algodón

Periódico para esterilizar

Cinta testigo

Balanza granataria  
Balanza analítica  
Autoclave

Químico: Agua destilada.....200 ml.  
Peptona tripticasa.....3.0 g.  
Proteosa peptona.....1.0 g  
Dextrosa.....0.2 g  
Fosfato dipotásico.....0.8 g  
Azul de tripano.....0.0150 g  
Cristal violeta.....0.00016 g  
Telurito de potasio.....0.002 g  
Sacarosa.....10 g  
Bacitracina.....0.0054 g  
Agar.....3.0 g

**Método:**

Se coloca en un matríz Erlenmayer de 250 ml peptona tripticasa, proteosa, peptona, dextrosa, sacarosa, agar, fosfato dipotásico y azul tripano.

Para facilitar la medición del cristal violeta y el telurito de potasio, se preparan las siguientes disoluciones:

- a).- cristal violeta al 0.03% tomando una alícuota de 0.5 ml y colocándola en un matríz.
- b).- telurito de potasio al 1%, tomando 0.2 ml para agregarlo al medio de cultivo.

El matríz Erlenmayer que contiene el medio de cultivo se sella con un tapón de algodón con gasa y un sombrero de papel en la boquilla con cinta testigo y se coloca dentro del autoclave a esterilizar a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos, junto con dos pipetas milimétricas y una caja de Petri que contiene una membrana millipore sobre una gasa, que se emplea para el filtra-

do del telurito de potasio en el matríz Kitasato al vacío.

Cuando se encuentra estéril el medio de cultivo, se le agrega el telurito de potasio cerca del mechero para evitar contaminación, se vacía en cajas de Petri previamente esterilizadas para los siguientes cultivos.

La cepa liofilizada de S.mutans se rehidrata colocando medio de cultivo dentro del vial en el que se encuentra la cepa y después se extrae con una jeringa hipodérmica y se coloca en una caja de Petri.

Esta caja se mete en la estufa a 36 C durante 48 horas, al -- igual que 10 tubos de ensaye con caldo soya tripticasa.

Elaboración del medio de cultivo para desarrollar S.mutans. -  
Caldo soya tripticasa.

Material:

Polvo de caldo soya tripticasa.....2.25 g  
Agua destilada.....75 ml  
21 Tubos de ensaye.

Método:

En un matríz Erlenmayer se mezcla el polvo y el agua y se colocan en los tubos de ensaye, posteriormente se colocan en el autoclave para esterilizarlos.

Al efectuar la siembra se utiliza un asa de platino y se trabaja cerca de la flama del mechero para evitar contaminación, después se colocan los tubos en la estufa a 36 C durante 48 horas.

Esta primera siembra es para desarrollar el S.mutans y posteriormente se realiza un frotis para comprobar que se trata de este microorganismo, se usa la tinción de Gram y al microscopio se observan cocos agrupados en cadenas de color azul.

## FASE "B"

### Siembra masiva de S.mutans

#### Material:

Físico: Matraz Erlenmayer (1)  
Tubos de ensaye (20)  
Tapones de plástico para tubos (20)  
Caja de Petri (1)  
Asa de platino (1)  
Mechero (1)  
Tubo de ensaye con S.Mutans  
Papel para envolver  
Cinta testigo  
Un Bote  
Autoclave

Químico: Polvo de caldo soya tripticasa.....2.25 g  
Agua destilada.....75 ml

#### Método:

Se mide el caldo soya y el agua, se mezclan en el matraz y se coloca el medio de cultivo en los tubos de ensaye, éstos se meten en un bote de metal que se cubre con un periódico y cinta testigo, para colocarlo en el autoclave.

En la caja de Petri se colocan los tapones y se envuelve para colocarla en el autoclave, todo el material se esteriliza a  $121^{\circ}\text{C}$  a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Esterilizados y a temperatura ambiente, se realiza la siembra - se tapan los tubos de ensaye y se colocan en la estufa a  $36^{\circ}\text{C}$  - por 72 horas para el posterior centrifugado de bacterias.

### FASE "C"

Obtención del concentrado de bacterias por centrifugación.

Material:

- Centrífuga (1)
- Tubos de ensaye con cultivo (20)
- Mechero
- Matríz Erlenmayer

Método:

Los ocho tubos de cultivo se centrifugan a 2000 rpm, durante 10 - minutos, después se decantan cerca de la flama del mechero para evitar contaminación, colocandose el sobrenadante en un matríz y reuniéndose todos los precipitados en un solo tubo.

### FASE "D"

Elaboración de frotis en fresco.

Material:

- Portaobjetos (20)
- Tubo de ensaye con concentrado bacteriano
- Mechero (1)
- Asa de platino (1)

### Método:

Se trabaja cerca del mechero para evitar contaminación, se coloca el asa en la flama del mechero para esterilizarla, -- cuando está al rojo vivo, se introduce en el tubo de ensaye apoyándola hacia la pared del tubo para que se enfríe y no se quemen los estreptococos cuando se tome la muestra, una vez fría se toma una muestra del concentrado de bacterias y se corre sobre el portaobjetos, esta misma operación se realiza con los portaobjetos restantes.

### FASE "E"

#### Obtención de IgA

#### Material:

- Parafina
- Tubos de ensaye esterilizados (40)
- Algodón
- Maskin tape
- Jeringa hipodérmica
- 10 sujetos hombres
- 10 sujetos mujeres

#### Método:

A los 20 pacientes se les proporciona un trozo de parafina para estimular el flujo salival, la saliva la depositan en un tubo de ensaye que se etiqueta con maskin tape, se anota edad y sexo.

Se les realiza un exámen bucal para determinar el número de piezas cariadas, para después establecer su relación con la -- respuesta antígeno-anticuerpo.



Posteriormente, la saliva se filtra con una jeringa hipodérmica a través de una malla de algodón y se colocan las muestras en refrigeración para evitar lo mas que se pueda la -- desnaturalización de la IgA.

## FASE "F"

*Nefelometría e inmunofluorescencia.*

*Nefelometría:* se realiza en las muestras de saliva para determinar la cantidad de IgA presente en cada una de ellas, posteriormente se establece la relación de la cantidad de IgA con la intensidad de la respuesta antígeno-anticuerpo y la cantidad de dientes afectados por caries de cada paciente, dichos -- datos se muestran en las conclusiones.

Obtenidas las muestras de saliva, se filtran mediante presión a través de una jeringa hipodérmica empacada con  $1\text{cm}^3$  de algodón, para obtener un suero salival libre de partículas sólidas, las muestras se separan a la mitad, las que se emplean para inmunofluorescencia se colocan en el refrigerador para su uso posterior, las que se someten a nefelometría son previamente colocadas en baño maría a  $57^\circ\text{C}$  para provocar una ligera desnaturalización; después se centrifugan a 2500 rpm durante 15 minutos, se colocan en el nefelómetro y se determina la cantidad de IgA de -- cada una de las muestras.

*Inmunofluorescencia:* se emplean los frotis en fresco y la IgA -- marcada con el isotiocianato de fluoresceína.

Al frotis del concentrado de bacterias se le agrega la IgA marcada con fluoresceína y se deja reposar 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , se la va para eliminar el exceso de anticuerpos fluorescentes y se monta en glicerina con un amortiguador, posteriormente se observa al microscopio y se determina la intensidad de la fluorescencia.

RESULTADOS:

Reacción de inmunofluorescencia.

( + ) escasa

(++ ) regular

(+++ ) buena ( a la mas alta concentración )

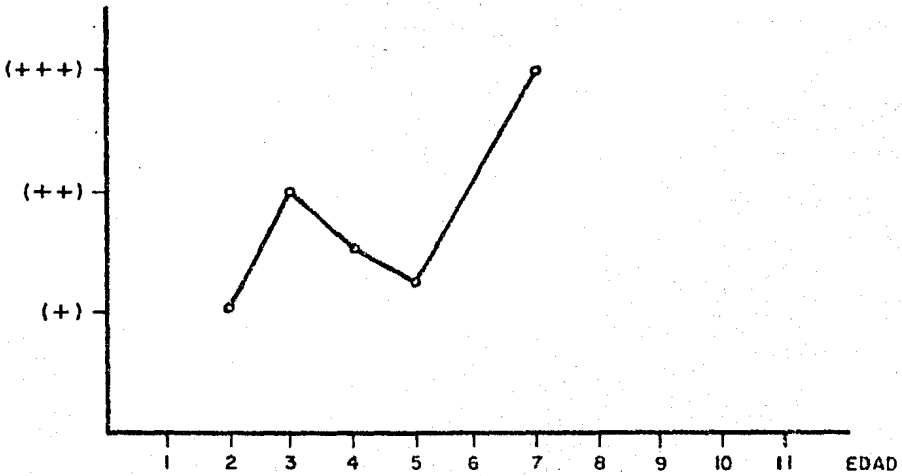
Los tubos de los sujetos masculinos se titularon con números -  
los de los sujetos femeninos con letras.

Tubo	No.	Edad	Tubo	letra:	Edad
1.	+	2 años	A.	+	4 años
2.	++	6 "	B.	+	5 "
3.	++	3 "	C.	+	8 "
4.	++	5 "	D.	++	7 "
5.	+	4 "	E.	++	6 "
6.	++	4 "	F.	+	9 "
7.	+++	7 "	G.	++	5 "
8.	+	5 "	<u>H.</u>	++	4 "
9.	+	2 "	I.	+	3 "
10.	+	5 "	J.	+	2 "

NO HUBO DIFERENCIA ESTADISTICA A  $P < 0.05$

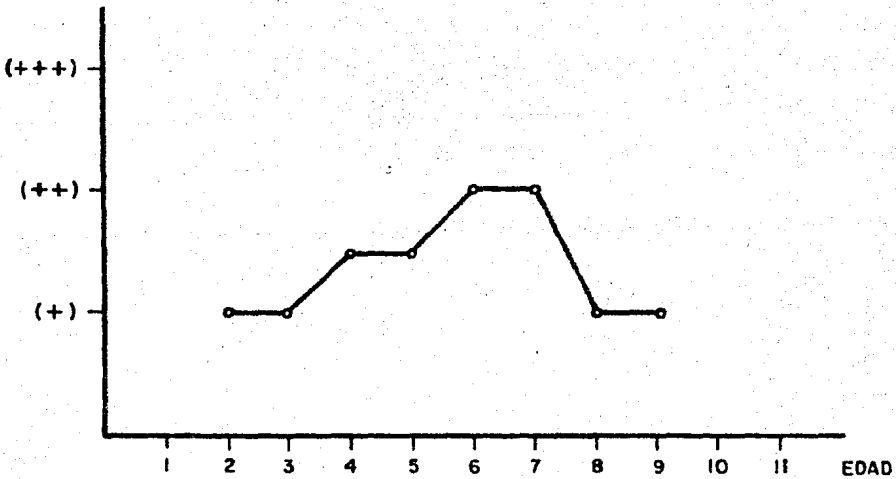
INMUNOFLUORESCENCIA

SEXO: MASCULINO



INMUNOFLUORESCENCIA

SEXO: FEMENINO



REACCION DE INMUNOFLUORESCENCIA

*Resultado de La Nefelometría:*

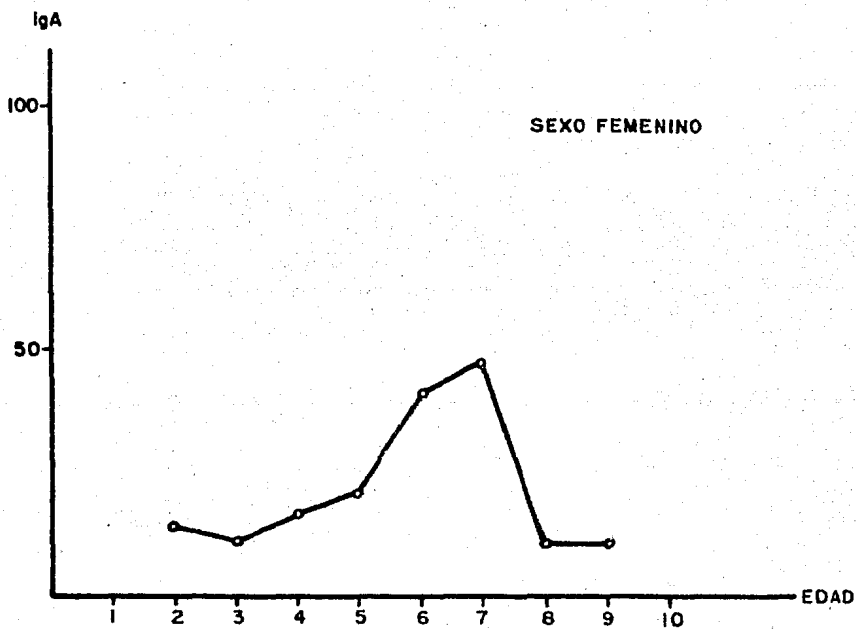
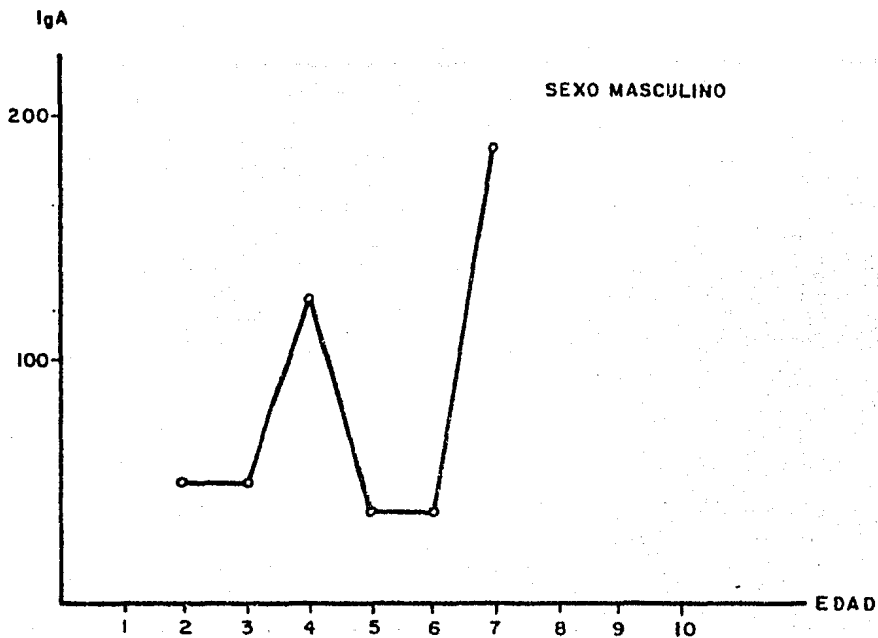
*Valores obtenidos de IgA.*

*Los tubos de ensaye de los sujetos masculinos se titularon con números, los de los sujetos femeninos con letras.*

<i>Tubo</i>	<i>No.</i>	<i>Tubo</i>	<i>Letra</i>
1.	17.9	A.	26.8
2.	36.6	B.	31.3
3.	48.5	C.	28.0
4.	61.2	D.	95.5
5.	43.9	E.	85.3
6.	198.1	F.	29.7
7.	242.2	G.	48.6
8.	19.4	H.	41.2
9.	25.5	I.	24.2
10.	34.5	J.	31.5

**NO HUBO DIFERENCIA ESTADISTICA**

**A P < 0.05**



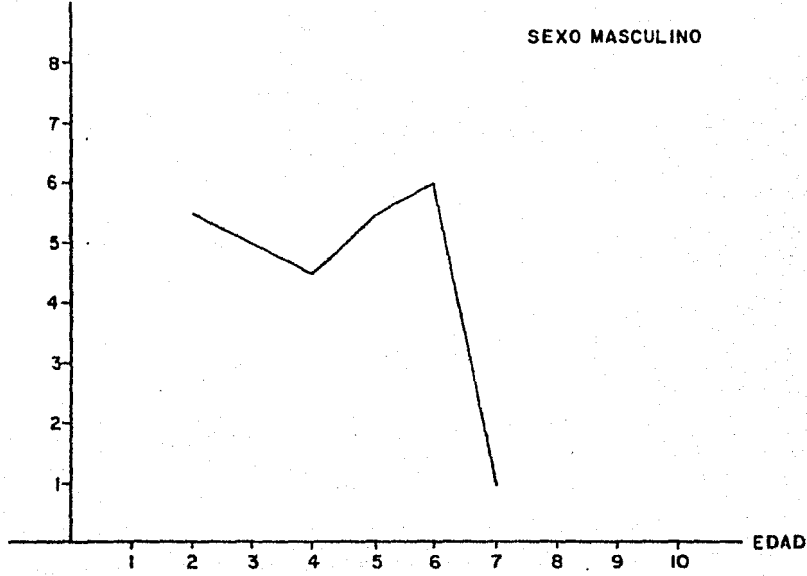
VALORES OBTENIDOS DE IgA.

Número de dientes con caries que presentaron los pacientes.

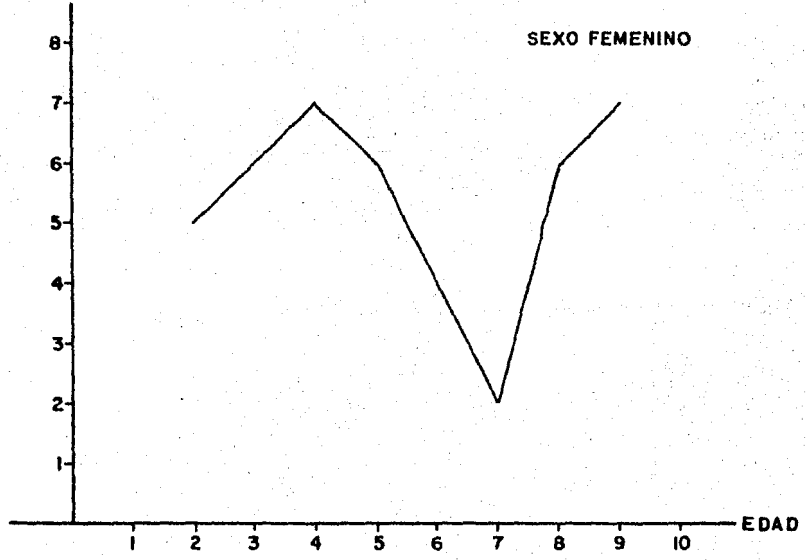
HOMBRES		MUJERES	
Edad	Dientes con Caries	Edad	Dientes con Caries
2 años	5	4 años	8
6 "	6	5 "	7
3 "	5	8 "	6
5 "	4	7 "	2
4 "	6	6 "	4
4 "	3	9 "	7
7 "	1	5 "	5
5 "	7	4 "	6
2 "	6	3 "	6
5 "	5	2 "	5

NO HUBO DIFERENCIA ESTADISTICA A  $P < 0.05$

**No. DE PIEZAS QUE PRESENTAN CARIES**



**No. DE PIEZAS QUE PRESENTAN CARIES**



**NUMERO DE DIENTES QUE PRESENTAN CARIES**

Indices obtenidos de los exámenes bucales de placa dentobacteriana.

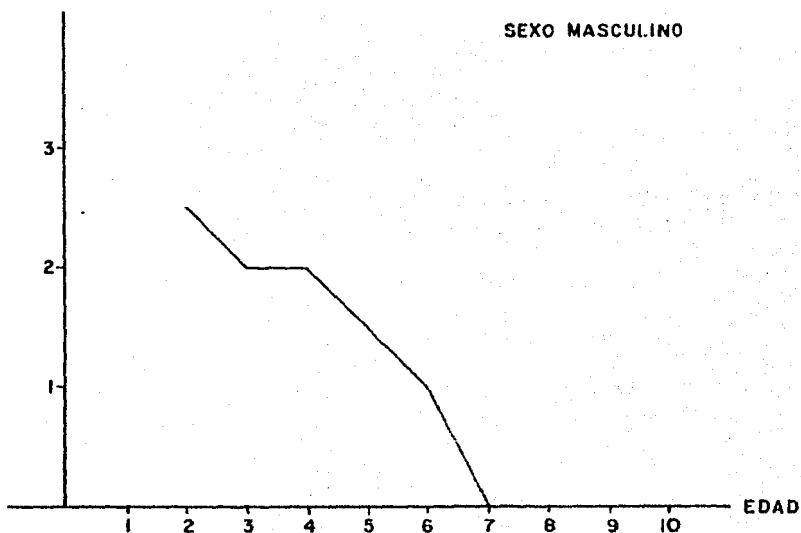
HOMBRES		MUJERES	
Edad	Indice PDB	Edad	Indice PDB
2 años	3	4 años	2
6 "	1	5 "	2
3 "	2	8 "	1
5 "	1	7 "	1
4 "	2	6 "	1
4 "	2	9 "	2
7 "	0	5 "	3
5 "	2	4 "	2
2 "	2	3 "	2
5 "	2	2 "	2

NO HUBO DIFERENCIA ESTADISTICA A  $P < 0.05$



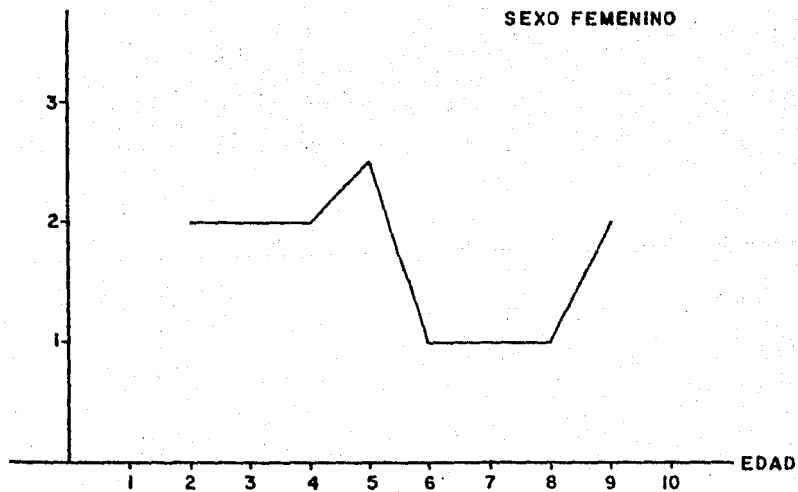
INDICE  
PDB

SEXO MASCULINO



INDICE  
PDB

SEXO FEMENINO



INDICE DE PLACA DENTOBACTERIANA

31=  
24.3RLS  
31.5 MG/DL WHO  
32=  
32.7RLS  
41.2 MG/DL WHO  
33=  
38.3RLS  
48.5 MG/DL WHO  
34=  
27.0RLS  
34.5 MG/DL WHO  
35=  
124.4RLS  
242.2 MG/DL WHO  
36=  
18.5RLS  
25.5 MG/DL WHO  
37=  
28.8RLS  
36.6 MG/DL WHO  
38=  
11.8RLS  
19.4 MG/DL WHO  
39=  
34.8RLS  
43.9 MG/DL WHO

40 =  
109.8RLS  
198.1 MG/DL WHO  
41=  
10.0RLS  
17.9 MG/DL WHO  
42=  
47.7RLS  
61.2 MG/DL WHO  
43=  
24.7RLS  
31.8 MG/DL WHO  
44=  
71.7RLS  
105.0 MG/DL WHO  
45=  
11.6RLS  
19.2 MG/DL WHO  
46=  
54.8RLS  
73.7 MG/DL WHO  
47=  
40.5RLS  
51.6 MG/DL WHO  
REPEAT SAMPLE #?  
J  
NO

RESULTADOS OBTENIDOS POR COMPUTADORA DE LA NEFELOMETRIA  
REALIZADA A LAS MUESTRAS

## CONCLUSIONES :

- 1.- En base a los resultados estadísticos obtenidos en los experimentos realizados, no existe diferencia de la respuesta inmune a la caries entre los dos sexos.
- 2.- En las gráficas se puede observar que la presencia del proceso carioso se encuentra en relación inversamente proporcional a la presencia de IgA en saliva, a la presencia de placa dentobacteriana y a la intensidad de la respuesta inmune a la caries de los sujetos estudiados.
- 3.- Este trabajo marca la pauta para realizar estudios subsecuentes ya que sienta las bases del procedimiento para la detección de la respuesta inmune a la caries.
- 4.- Sería conveniente aumentar el tamaño de la muestra para obtener una mayor significancia en los resultados.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ACEVES MEDINA.- ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA CARIES DENTAL  
*Facultad Química UNAM, 1978.*
- 2.- ACKERMANS F. *et.al.* 1981. ULTRAESTRUCTURAL LOCALIZATION OF IMMUNOGLOBULINS IN CARIOUS HUMAN DENTINE.  
*Archs Oral Biol. Vol. 26 pp. 879-886*  
*Great Britain.*
- 3.- ALALUOSUA S.*et.al.* 1981 QUANTITATION OF IgA HUMAN WHOLE SALIVA: A COMPARISON OF THREE IMMUNOASSAYS. *Acta Odontológica Scandinavica Vol. 33 No. 3 pp. 151-161*
- 4.- BOWEN, WILLIAM H. IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF DENTAL CARIES  
1976.
- 5.- BRYAN H. BACTERIOLOGIA 6a. Edición. Editorial Continental  
1983 México.
- 6.- CARLOS J.P. 1982. THE PREVENTION OF DENTAL CARIES: TEN -- YEARS LATER. *JADA Vol. 104 pp. 193-197. E.U.A.*
- 7.- CASARTELLI, D.I. MICROSCOPIA TEORICO-PRACTICA Editorial -  
URMO Barcelona, 1968.

- 8.- CLAUSE J., TECNICAS INMUNOQUIMICAS PARA IDENTIFICACION Y ESTIMACION DE MACROMOLECULAS. Editorial El Manual Moderno, 1975 México. Pp. 118-119.
- 9.- DANIEL, WAYNE W. BIOESTADISTICA 1a. Edición Editorial Limusa, México, 1977.
- 10.- FRIEDMAN, HERMAN. MANUAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY Washington D.C. 1976.
- 11.- FUDENBERG, H. HUGH.- MANUAL DE INMUNOLOGIA 2a. Edición Editorial El Manual Moderno, México, 1980.
- 12.- FUERST, R.- MICROBIOLOGIA 14a. Edición Editorial Interamericana, México, 1983.
- 13.- GANONG, W.F.- FISIOLOGIA MEDICA. 8ava. Edición Editorial El Manual Moderno, México, 1982.
- 14.- GIUNTA, PAUL.- PATOLOGIA BUCAL Editorial Interamericana, México, 1978.
- 15.- GRONBLAD, E.A. 1982.- CONCENTRATION OF IMMUNOGLOBULINS IN HUMAN WHOLE SALIVA: EFFECT OF PHISICOLOGICAL STIMULATION Acta Odontológica Scandinavica Vol. 40 No. 2 pp. 87-94.
- 16.- KRASEE, BO. 1983.- AVAILABLE IMMUNOGLOEULIN A ANTIBODIES - IN MOUTH RINSES AND IMPLANTATION OF Streptococcus mutans. Infection and Immunity Vol. 41 pp. 1360-1362

- 17.- GUYTON, ARTHUR C.- FISIOLOGIA HUMANA 4a. Edición.  
Editorial Interamericana, México, 1975.
- 18.- LAZZARI, EUGENE.- DENTAL BIOCHEMISTRY 2a. Edición  
Philadelphia Lea & Febiger, 1976.
- 19.- LEGLER D.W., 1981.- IMMUNODEFICIENCY DISEASE AND DENTAL  
CARIES IN MAN. Archs Oral Biol. Vol. 26 pp. 905-910.
- 20.- MAC FADDIN, JEAN.- PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFI  
CACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA. 1a. Edición -  
Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1980.
- 21.- MAKINEN, K. 1981.- EXTRACELLULARHIDROLASE ACTIVITY OF THE  
ORAL BACTERIUM Streptococo mutans ISOLATED FROM MAN AND -  
GROWN ON GLUCOSE OR XYLITOL Archs Oral Biol. Vol. 26  
pp. 889-904.
- 22.- MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO Y DE PRODUCTOS BBL  
BECTON DICKINSON DE MEXICO, S.A. DE C.V.- PREPARACION DE  
MEDIOS DE CULTIVO PARA Streptococo mutans Editores Asociados  
S.A., 1974.
- 23.- NOLTE, WILLIAM.- MICROBIOLOGIA ODONTOLÓGICA.- Editorial In-  
teramericana, México 1971.

- 24.- OLSSON, J., 1981.- ASSOCIATION BETWEEN BACTERIAL AGGLUTININS AND IMMUNOGLOBULIN A IN HUMAN SALIVA.-  
Acta Odontologica Scandinavica Vol. 39 No. 2 pp. 61-66.
- 25.- PELCZAR, M.J. - MICROBIOLOGIA Editorial Mc.Graw-Hill,  
México, 1970.
- 26.- ROBBINS, STANLEY L.- PATOLOGIA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL  
1a. Edición, Editorial Interamericana, México, 1975.
- 27.- RUSSEL, S. WEISER.- FUNDAMENTALS OF IMMUNOLOGY Lea & Fe-  
biger Philadelphia, U.S.A. pp. 31-33
- 28.- TIECKE, RICHARD W.- FISIOPATOLOGIA BUCAL Editorial Inter  
americana, México, 1966.
- 29.- VOLLER, A. 1976.- ENZYME IMMUNOASSAYS IN DIAGNOSTIC MEDICINE  
Bull. World Health Organ. Vol. 53 pp. 55-62.