

22

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



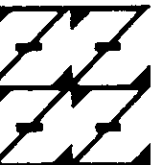
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Correlación del índice CPO e IgAs contra el antígeno I/II de Streptococcus mutans por el método de ELISA en adolescentes.

29766A

TESIS DE LICENCIATURA QUE PRESENTA: EUNICE GALAVIS ESPINOZA QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

UNAM FES ZARAGOZA



MEXICO, D. F.

OCTUBRE DE 2001

LO QUE NO SE VE EN NUESTRA REFLEXION



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.

## **JURADO**

**Presidente: Dr. Rubén Marroquín Segura**

**Vocal: Q. F. B. María de las Mercedes Zamudio Durán**

**Secretario: Q. F. B. Francisco Javier Parada García**

**Suplente: C. D. Patricia Meneses Huerta**

**Suplente: Q. F. B. Yolanda Flores Cabrera**

Este trabajo se desarrolló bajo la asesoría del Dr. Rubén Marroquín Segura en el Laboratorio L-313 de la F. E. S. Zaragoza de la U. N. A. M

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente mi asesor de Tesis Dr. **Rubén Marroquín Segura**, toda la paciencia, el tiempo y el esfuerzo que empleo para la realización de este proyecto, y en especial, por animarme a no darme por vencida.

A la C. D. **Patricia Meneses Huerta** y C. D. **Teresa Zaragoza Meneses**, que se encargaron de registrar los casos clínicos

A los profesores de la F. E. S.:

**Q. B. P. Dora Alicia Pérez García**, que aportó su experiencia para la sección microbiológica de este proyecto, y me dio consejos valiosos no sólo para mi formación académica, sino para mi vida.

**Q. F. B. Yolanda Flores Cabrera**, por cada consejo y opinión dada en el momento justo, gracias por involucrarme en el trabajo de laboratorio.

**M. C. Maurilio Flores Pimentel**, quien colaboró con paciencia en el área inmunológica, particularmente, en el manejo de animales, además de ser un gran amigo.

Al M. en C. **Arturo Cano Flores**, que ha sido uno de mis mejores profesores, uno de mis mejores amigos y una de las personas más íntegras y honestas que conozco, quien supo encausar y ayudar a fijarme en la meta, a encontrar el camino, no el más fácil, pero sí el correcto.

Agradezco a mis sinodales, que aportaron sus conocimientos para mejorar este trabajo.

A todos los profesores a quienes debo mi formación académica, en especial aquellos que dejaron huella en mi vida. GRACIAS

Dedicó con mucho amor este trabajo y les doy las gracias:

**A Dios:**

Por darme la oportunidad de disfrutar esta vida, porque puedo percibir todas las cosas que haz creado, con mis sentidos, por darme una familia, salud y muchos amigos amorosos.

**A mis padres:**

Papá: por darme la oportunidad de acceder a la educación, porque me ensañaste a conducirme con honestidad y ser franca, porque aprendí por ti a no hacer con otros lo que no quiero para mí. Mamá: gracias por todo el amor con el que me cuidas hasta hoy, por escucharme, apoyarme, enseñarme a respetar la opinión y el modo de vivir de otras personas, y por tenerme presente en tus oraciones. A ambos, gracias por darme la vida.

**A mis hermanos, mis mejores amigos:**

Daniel, además de darme buenos momentos a nuestras charlas con tu humor, agradezco profundamente la ayuda incondicional que me diste en la elaboración de los esquemas.

Saulo, por tu honestidad, pues, cuando la ocasión lo amerita, haz hablado con verdad, por no decirme lo que quiero escuchar, sino la neta y por tu solidaridad en los momentos difíciles, gracias por ayudarme a encontrar lo que se había perdido.

Jael, por ser mi confidente, por tu sinceridad en cada opinión y consejo, por ser la mejor hermana y una gran amiga.

Marco, por tener a flor de piel un intenso amor a la vida y contagiarme tu ánimo y buen humor, sé que todo lo que te diga sería poco para expresarte cuanto me haz ayudado.

**A mis sobrinos:**

Jonathan, Andrea y Marcia, quienes le dieron un nuevo sentido a mi vida, y a quienes amo profundamente y cada día me dan motivos para quererlos más.

A cada uno de ustedes les agradezco cada momento feliz.

**A mis amigos:**

**Lupita:** Haz estado conmigo desde el inicio, y hasta ahora, mostrando toda la lealtad, confianza, buena voluntad, disposición y sobre todo amistad.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: **Sandra, Raquel, Oscar, Liz, Lulú, Rosalba** y **Fabiola**, quienes de una o de otra manera contribuyeron con la realización de este trabajo, MUCHAS GRACIAS

A mis amigos de la carrera: **Carlos, Chuy y Julia.**

Jamás se inventaría nada si todos nos sintiéramos satisfechos con las cosas descubiertas.

*Séneca*

Nosotros, ustedes y yo, tenemos el privilegio de estar vivos en esta época extraordinaria de la historia del mundo, la época en la que se establece la frontera entre el pasado milenio de guerra y sufrimiento y el futuro de paz, justicia, moralidad y bienestar. Tenemos el privilegio de contar con la oportunidad de contribuir a lograr la abolición de la guerra y reemplazarla por las leyes mundiales. Confío en que lograremos triunfar en esta gran empresa, en la que la comunidad mundial se verá no solo libre del sufrimiento causado por la guerra, sino también —a través del mejor uso de los recursos naturales, de los descubrimientos científicos y de los esfuerzos de la humanidad— del hambre, la enfermedad, el analfabetismo, y el miedo. En el futuro estaremos en la posibilidad de construir un mundo caracterizado por la justicia económica, política y social para todos los seres humanos una cultura, que refleje la inteligencia del hombre.

*Linus Pauling*

## ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	1
Resumen	2
1. Introducción	3
2. Marco teórico	4
2.1. Anatomía dental	4
2.1.1 Esmalte	5
2.1.2 Cemento	9
2.1.3 Dentina	10
2.1.4 Pulpa	10
2.2. Etiología de la caries dental	11
2.3. La cavidad oral, características	16
2.4. Inmunidad innata y específica	17
2.4.1. Inmunidad innata	17
2.4.2. Inmunidad específica	18
2.4.3. Características de la respuesta inmune específica	19
2.4.4. Fases de la respuesta inmunitaria	19
2.5. Sistema inmunitario	21
2.5.1. Células del sistema inmune	22
2.5.2. Anatomía funcional de los tejidos linfoides	26
2.6. Inmunidad humoral	32
2.6.1. Inmunoglobulinas: estructura y función	32
2.6.2. Antígeno	40
2.6.3. Interacciones antígeno anticuerpo	40
2.7. ELISA	40
2.8. Inmunolectrotransferencia	42
2.9. Índice CPO	44
3. Planteamiento del problema	47
4. Objetivos	48
4.1. Objetivo general	48
4.2. Objetivos particulares	48
5. Hipótesis	49
6. Justificación	50

7. Diseño de la investigación	51
8. Material y equipo	52
9. Diseño experimental	55
10. Métodos	56
10.1. Purificación del antígeno	56
10.2. Cromatografía	56
10.3. Determinación de proteínas por el método de Lowry	57
10.4. Preparación del antisuero	58
10.5. Inmunodifusión	58
10.6. Inmunoelectroforesis	59
10.7. Contraimmunoelectroforesis	60
10.8. Recolección de datos y manejo de las salivas	61
10.9. Cuantificación de <i>Streptococcus mutans</i>	61
10.10. Estandarización de la técnica de ELISA	62
10.11. Determinación del título de anticuerpos IgAs contra el Ag I/II	63
10.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida	64
10.13. Inmunoelectrotransferencia	65
11. Modelo estadístico	69
12. Resultados	70
13. Discusión de resultados	81
14. Conclusiones	84
15. Propuestas	85
16. Anexo	86
17. Referencias	92



## ABREVIATURAS

- CPO.** Número de piezas cariadas y pérdidas.
- ATCC.** American Type Culture Collection
- MSB.** Mitis-salivarius-bacitracina (agar)
- SDS.** Dodecilsulfato de sodio
- GTF.** Glucosiltransferasa
- DMFT.** Índice de dientes cariados, perdidos y obturados, CPO, por sus siglas en inglés *decayed, missing, filled, teeth index*.
- NK.** Asesinas naturales, del inglés *natural killer*
- APC.** Células presentadoras de antígeno, del inglés *antigen-presenting cells*
- APS.** Persulfato de amonio
- PAGE.** Electroforesis en geles de poliacrilamida.
- CTL.** Linfocitos T citotóxicos.
- CD.** Grupos de diferenciación, del inglés *cluster of differentiation*.
- MHC.** Complejo mayor de histocompatibilidad.
- Fab.** Fragmento de unión al antígeno (antigen-binding)
- Fc.** Fragmento que cristaliza.
- C<sub>H</sub>.** Región constante de la cadena pesada.
- C<sub>L</sub>.** Región constante de la cadena ligera.
- V<sub>L</sub>.** Región variable de la cadena ligera.
- V<sub>H</sub>.** Región variable de la cadena pesada.
- SC.** Componente secretor.
- CDR.** Regiones determinantes de la complementariedad, del inglés *complementarity-determining regions*.
- ELISA.** Análisis por enzimas fijadas a inmunoadsorbentes, del inglés *Enzyme linked immunosorbent assay*.
- WHO.** World Health Organization.
- FCA.** Adyuvante completo de Freund.
- PBS.** Solución amortiguadora de fosfatos.
- RM.** Rojo de metilo.
- VP.** Vogues-Proskauer
- PBST.** Solución amortiguadora de fosfatos con Tween
- DBA.** 3, 3'-diaminobencidina
- UFC.** Unidades formadoras de colonia.
- cbp.** Cuanto baste para.
- TEMED.** N-N-N-tetrametilendiamino.
- Ig.** Inmunoglobulina
- IgAs.** Inmunoglobulina A secretora
- Ag III.** Antígeno III de *Streptococcus mutans*

## RESUMEN

La caries dental es una enfermedad causada principalmente por la infección con *Streptococcus mutans*; el antígeno I/II es una proteína de 185 kDa, presente en la pared celular de *S. mutans*, la cual se aisló y caracterizó mostrando su utilidad en la inmunización de animales de experimentación. El presente estudio, tuvo como finalidad describir la influencia del título de IgA secretora (IgAs) sobre el desarrollo de la caries dental. Se planteó la posibilidad de que títulos de anticuerpos IgAs elevados disminuyen la incidencia de caries dental.

Sin embargo, se observó que la IgAs presente en la saliva contra el Antígeno I/II de *S. mutans*, no disminuye la presencia de caries dental, es decir, los resultados encontrados no son suficientes para aseverar que la IgAs protege contra la prevalencia e incidencia de caries.

La inmunoelectrotransferencia muestra especificidad para el antígeno I/II. Por lo que puede afirmarse que la IgA es específica para el antígeno I/II.

## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad la humanidad ha padecido los efectos de la caries dental, como la pérdida parcial o total del diente, disminuyendo la funcionalidad del aparato digestivo.

El desarrollo de caries dental en humanos y animales de experimentación se atribuye a la presencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, que forman parte de la placa dentobacteriana. En 1924 Clark fue el primero en aislar *Streptococcus mutans* de un absceso bucal de un paciente hospitalizado, asociándolo a la presencia de caries.

En 1975 se demostró en monos *rhesus* que la presencia de *S. mutans* serotipo *c* en la placa dental y que una dieta rica en sacarosa, favorecían el desarrollo de caries, además, la inmunización con células completas de *S. mutans* y adyuvante incompleto de Freund reducían sustancialmente la caries en la superficie lisa del diente. En 1978, se caracterizó un antígeno de *S. mutans*, asociado a la pared celular, denominado antígeno I/III. En 1980, el antígeno se utilizó para inmunizar con adyuvante completo de Freund, monos *rhesus*, resultando en la protección contra caries dental. Estudios más recientes, identificaron los epitopos del antígeno responsables de respuesta inmune en las células B y T, además, se observó que el antígeno I/III y péptidos pequeños derivados de éste tienen un efecto protector contra la caries dental.

Por su elevado índice de morbilidad, que la coloca como una de las enfermedades con mayor incidencia, siendo un problema de salud pública, *S. mutans* se ha asociado a endocarditis en humanos y a nefritis en conejos, lo que justifica su estudio. Actualmente, las lesiones cariosas se evalúan por observación clínica y se reportan como Índice CPO (número de piezas Cariadas, Pérdidas y Obturadas), sin embargo, este método no proporciona información sobre el estado inmunológico del paciente y por lo tanto, que exista protección a recolonizaciones posteriores al examen evitando, así nuevas lesiones. Se realizó un estudio en un grupo de adolescentes con edades entre 12 y 15 años de edad. Los anticuerpos implicados en esta respuesta inmune, son IgAs salival cuantificados por el método de ELISA, además se buscó la fracción proteica del Antígeno I/III sobre la que está dirigida la respuesta, por la técnica de Inmunoelctrotransferencia.

De esta manera, se hizo una correlación entre el índice CPO y el título de anticuerpos IgAs en saliva contra el antígeno I/III, se evaluaron otros parámetros asociados a la determinación de caries, tales como, capacidad amortiguadora salival y grado de infección de *S. mutans*; este estudio poblacional pretende establecer la posibilidad de detectar un efecto protector causado por la infección natural en individuos expuestos esperando que los resultados proporcionen información suficiente para proponer a este antígeno como una posible vacuna contra la caries dental y por lo tanto evitar en adelante el desarrollo de procesos cariosos.

## MARCO TEORICO

### Anatomía dental <sup>1,2,3</sup>

El aparato dental realiza la función activa de la masticación, contribuye al mecanismo del habla y sirve para conservar un aspecto agradable.

La dentición humana comprende: incisivos, caninos, premolares y molares, los cuales difieren en forma y se adaptan a las funciones masticatorias especializadas en incisión, prensión y trituración. El hombre está dotado de dos dentaduras, la primera se conoce como temporal o decidua; la segunda, se denomina permanente.

Hay 20 dientes temporales y 32 dientes permanentes, la mitad de dicho número se encuentra colocada en el maxilar superior, dispuesta en forma de arco; la otra mitad, dispuesta de manera semejante, se halla en la mandíbula.

Comenzando con la línea media (plano sagital), los dientes de la dentadura temporal reciben los siguientes nombres:

- |                     |                  |
|---------------------|------------------|
| 1. Incisivo central | 4. Primer molar  |
| 2. Incisivo lateral | 5. Segundo molar |
| 3. Canino           |                  |

En el mismo orden, los dientes de la dentadura permanente reciben los siguientes nombres:

- |                     |   |
|---------------------|---|
| 1. Incisivo central | 5. Segundo premolar                                     |
| 2. Incisivo lateral | 6. Primer molar   |
| 3. Canino           | 7. Segundo molar  |
| 4. Primer premolar  | 8. Tercer molar (llamado comúnmente "muela del juicio") |

Cada diente se divide anatómicamente en dos porciones: corona y raíz. La corona es la parte del diente cubierta de esmalte; la raíz es la parte del diente cubierta de cemento (Fig. 1).

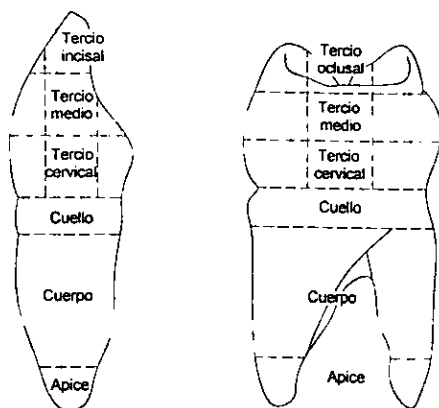


Fig. 1. Esquema de dientes que muestra la división de la corona y raíz de los dientes anteriores y posteriores.<sup>2</sup>

Estructuralmente el diente se compone de cuatro tejidos: esmalte, cemento, dentina y pulpa (Fig. 2)

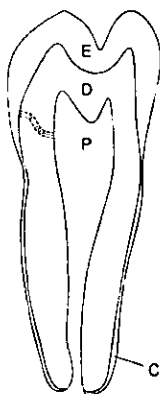


Fig. 2. Diagrama de un diente que muestra la distribución de E: esmalte; D: dentina; P: pulpa; y C: cemento.<sup>3</sup>

### Esmalte

El esmalte es la sustancia dura que recubre la corona del diente, protege los tejidos subyacentes de las presiones. Es el tejido más duro del organismo; pues contiene entre 94 y 98% de sustancias inorgánicas, su componente más abundante es la hidroxiapatita (90%) presente en forma de cristales. Contiene de 2 a 6% de agua y sustancia orgánica.

## Propiedades físicas del esmalte

Propiedad	Valor/característica
Dureza	Entre 5 y 6 en la escala KHN (Koop Hardness Number), es quebradizo, su estabilidad depende de la dentina.
Peso específico	2.95
Densidad	Entre 2.8 y 3.0
Color	Carece de color propio, el color que se observa está ligado a la dentina.
Paso de la luz a través de él	Traslúcido, a mayor grado de mineralización, más translúcido.
Índice de refracción	1.627
Permeabilidad	Escasa, se le considera una membrana semipermeable.
Exposición a rayos X	Opaco, debido a su alto grado de mineralización.
Espesor	2-3 mm dependiendo de la localización en el diente, y funciones que realiza.
Elasticidad	Escasa, relacionada principalmente a la cantidad de agua y materia orgánica.
Solubilidad	Se solubiliza en medio ácido.

Tabla 1. Propiedades físicas del esmalte.<sup>1</sup>

## Estructura del esmalte, los prismas

Los prismas, altamente mineralizados por cristales de hidroxiapatita se alojan en una matriz orgánica de naturaleza proteica, se presentan como columnas que atraviesan el esmalte, de aspecto cristalino y claro, permiten el paso de la luz; tienen forma de una pirámide truncada de base periférica, al corte pueden aparecer en forma de arcos, escamas y ojo de cerradura (Fig. 3)

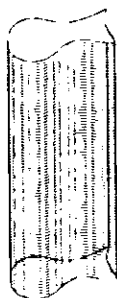


Fig. 3. Representación esquemática de un prisma<sup>1</sup>.

La forma de ojo de cerradura presente en un corte transversal indica que los prismas se distribuyen de tal forma que su relación constituye un sólido engranaje interprismático (Fig. 4).

Los prismas se rodean de una zona delgada de sustancia orgánica, constituida por queratina y mucopolisacáridos, participando en el crecimiento de los cristales.

Los cristales de hidroxiapatita son sólidos cristalinos pertenecientes al sistema hexagonal, cuyas bases terminan en una pirámide truncada (Fig. 5), su fórmula química es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , la acumulación de esas unidades repetitivas en la dirección de sus tres ejes forma un cristal completo, estos cristales contienen aproximadamente 40 000 unidades repetitivas con un tamaño de 2 000 a 10 000 Å de longitud, 500 a 1 000 Å de ancho y 150 a 1 000 Å de espesor.

El esmalte contiene además, material amorfo constituido principalmente por carbonatos de calcio ubicados en los espacios entre los cristales de hidroxiapatita; este material aparentemente funciona como material cementante entre los cristales de hidroxiapatita.

### **Histofisiología**

El conocimiento de las características del esmalte es indispensable para llegar a establecer en qué forma se dan las condiciones para la iniciación de caries, teniendo en cuenta la estructura del esmalte y sus características fisicoquímicas y biológicas, es posible realizar una correcta reparación de los tejidos perdidos y evitar que la caries repita su mecanismo destructivo.

Es necesario conocer la estructura y constitución del esmalte resistente al ataque de la caries, para establecer si dichas estructuras tienen relación con la poca susceptibilidad cariosa que se presenta en los individuos con bajo índice de caries, y establecer si la susceptibilidad corresponde a algún factor estructural o constitutivo.

La histología y la fisiología del esmalte están en íntima relación con una serie de factores que lo condicionan para resistir a los agentes destructivos del medio bucal, entre dichos factores se puede mencionar:

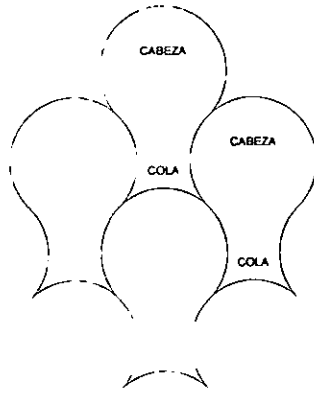


Fig. 4. Representación esquemática de la sección transversal de los prismas del esmalte en forma de ojo de cerradura, donde la cabeza de un prisma se encuentra con las colas de los prismas vecinos<sup>1</sup>.

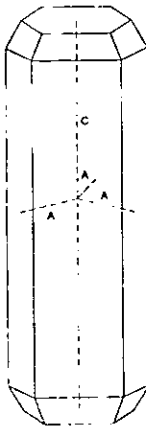


Fig. 5. Esquema de un cristal adamantino de hidroxiapatita<sup>1</sup>.



Factores inherentes al esmalte:

- a) Grado de mineralización.
- b) Presencia de ciertos elementos inorgánicos tales como el flúor.
- c) Forma y disposición de los prismas.
- d) Estructura y disposición de los cristales en el prisma.
- e) Naturaleza y cantidad del material inorgánico.
- f) Características de la superficie libre de esmalte.

Factores que dependen del medio bucal:

- a) pH bajo de la saliva, provocando la disolución de los cristales.
- b) Presencia de microorganismos altamente cariogénicos.
- c) Régimen alimenticio.
- d) Tiempo durante el cual se mantienen los carbohidratos en la boca.
- e) Tipo de oclusión. Ciertas anomalías por disposición dentaria impiden realizar la limpieza adecuada de las superficies dentarias.

El esmalte no tiene capacidad para regenerar tejido perdido, sin embargo, es susceptible de sufrir modificaciones a partir de su superficie libre, bajo las influencias del medio bucal, cuando esté tiene un pH ácido, puede provocar la disolución de los cristales del esmalte, además, algunas sustancias disueltas en la saliva, pueden incorporarse a los cristales. La incorporación de minerales al esmalte de un diente ya erupcionado, se denomina *remineralización*, la capacidad del esmalte para incorporar elementos es muy restringida, en cantidad y selectividad; las sustancias susceptibles a incorporarse en el esmalte son escasas, entre ellas se encuentra el flúor que disminuye su solubilidad, aparentemente formando fluoroapatita, la disminución de la solubilidad del esmalte no produce protección absoluta frente a caries. El flúor no inhibe en forma absoluta la formación de caries, pero disminuye los sitios afectados, ejerciendo una función cariostática.

### **Cemento**

El cemento es una delgada capa de material mineralizado que recubre la raíz del diente, es el único tejido dentario mineralizado que tiene células incluidas, es blanco nacarado, más claro que la dentina, su dureza es similar a la del hueso laminar.

Contiene 65% de sustancia inorgánica, siendo la hidroxiapatita la más importante, además de carbonato de calcio y pequeñas cantidades de otros elementos, tales como sodio, potasio, hierro, flúor, azufre, entre otros y 35% de material orgánico, principalmente colágena, incluyendo en éste un 20% de agua.

Se distinguen dos tipos de cemento. El cemento *acelular* o *primario* y el cemento *celular*, *secundario* o *laminar*.

### **Dentina**

Es un tejido calcificado cuya formación continúa mientras la pulpa se mantenga viva; es la porción envuelta por el cemento y el esmalte, constituye la mayor parte del diente, aproximadamente 70% es material inorgánico, en su mayoría cristales de hidroxiapatita, 18% de materia orgánica y 12% de agua. Casi toda la fracción orgánica es colágena, posee una pequeña porción de albúmina y lípidos (tales como colesterol y sus ésteres, glicéridos, ácidos grasos y fosfolípidos)

Cambia como consecuencia de la edad, en individuos jóvenes, cede a la presión, es sensible al calor y a otros estímulos, con el tiempo aumenta la dureza de la dentina por la calcificación adicional, reduciendo la sensibilidad a los estímulos exteriores.

### **Pulpa**

Se encuentra ocupando el canal delgado que corre a lo largo de la porción central de toda la extensión de la raíz y se extiende a la cavidad central; es un sistema de tejido conjuntivo formado por células que fabrican la matriz fundamental que es la base y precursor del complejo fibroso.

Los fibroblastos son células fundamentales de la pulpa sintetizan colágena y glucoproteínas, sulfato de condroitina, heparina y sulfatos de dermatán, además resorben colágena extracelular. La función principal de los odontoblastos es la producción de dentina.

Cerca de los vasos sanguíneos se encuentran histiocitos capaces de convertirse en macrófagos, cuando surge la necesidad. Las células mesenquimatosas, se convierten en fibroblastos, odontoblastos u osteoclastos, no es común encontrar células grasas.

En la pulpa sin inflamación, generalmente, no se encuentran linfocitos, células plasmáticas ni eosinófilos, pero sí después de lesiones en la pulpa.

La sustancia fundamental de la pulpa es similar a la de otros tejidos conjuntivos corporales, ésta ataca la diseminación infecciosa, cambios metabólicos celulares, estabilidad de cristales y efectos de hormonas, vitaminas y otras sustancias metabólicas.

### Etiología de la caries dental

La caries (del latín *caries* podredumbre) dental es una enfermedad que causa desmineralización y disolución de los tejidos dentales. Este proceso ocurre en la corona del diente y sobre la superficie de la raíz cuando es expuesta, al definir esta enfermedad es necesario apoyarse en la descripción clínica, se caracteriza por la formación de cavidades en los dientes. En niños y adultos jóvenes hasta la edad mediana, las cavidades se localizan en las coronas de los dientes, comenzando por la superficie del esmalte y penetrando el esmalte y la dentina, formando cavidades socavadas, las cuales, sin tratamiento pueden llegar a afectar la pulpa, ocurren principalmente en las superficies oclusales, donde comienzan en las fosetas y en las fisuras, en las superficies interproximales de dientes que contactan, aparece sobre cualquier superficie dental que está sometida a estancamiento, como las fosetas bucales de los molares, las fosetas linguales de los incisivos, en los márgenes de empastes con escapes que sobresalen, debajo de los ganchos de dentaduras superpuestas o férulas y en fosetas hipoplásicas. Puede haber formación de caries en cualquier parte donde hay estancamiento de alimentos, la caries dental no ocurre sin la formación de placa.

Los primeros estadios de la enfermedad son asintomáticos y los síntomas solamente ocurren después de la cavitación, el primer signo suele ser dolor al comer dulces, y en ocasiones alimentos salados (aunque esto es raro), en ocasiones, a esto sigue dolor al ingerir alimentos y bebidas calientes o frías y diversos síntomas de pulpitis y periodontitis, sin embargo, algunos pacientes con grandes cavidades, no tienen síntomas. Esto tal vez se debe al progreso lento de las lesiones daría tiempo para el establecimiento de reacciones protectoras <sup>4</sup>.

La caries dental ha sido una plaga desde la antigüedad y quizás es la infección bacteriana más común en humanos, los organismos causales más fuertemente asociados son los llamados comúnmente estreptococos del grupo mutans: *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* <sup>5</sup>. Estos organismos poseen varios determinantes antigénicos de pared celular, tales como péptidoglicanos antigénicos, polisacáridos y ácido lipoteicoico <sup>6</sup>. Diversas investigaciones revelan que la caries, dental es un proceso patológico que puede desarrollarse sólo en presencia de bacterias, por lo tanto, es de origen bacteriano, de naturaleza infecciosa y transmisible, se presenta en dos etapas: descalcificación o reblandecimiento de los tejidos y disolución del tejido reblandecido.

El establecimiento de *Streptococcus mutans* en la boca de niños depende de la transmisión intrafamiliar, principalmente la materna, una madre que tiene numerosos

estreptococos en la boca, puede introducirlos en la boca del bebé antes de la erupción de los dientes por diversas prácticas, tales como, utilizar la misma cuchara de ella para alimentar al bebé y humedecer el chupón en su propia saliva antes de que lo use el bebé, la baja acidez gástrica en los infantes, especialmente durante la ingestión, permite a los componentes celulares bacterianos el paso a través del estómago sin dañarse, debido a la exclusión de antígenos incompleta en el intestino neonatal, la ingestión de *Streptococcus mutans* puede conducir a una respuesta de anticuerpos sistémica: Algunos retrasos en la inmunización contra *S. mutans* pueden causar alta susceptibilidad a la caries dental, especialmente en las superficies proximales de los dientes, las caries activas que usualmente contienen un alto número de *S. mutans*, pueden inducir a la producción de anticuerpos de este organismo <sup>7</sup>.

La caries dental se presenta como un problema de salud pública, la cual tiene un elevado índice de morbilidad en México <sup>8</sup>. Varios autores coinciden en que *Streptococcus mutans* serotipos *c*, *e* y *f* así como *Streptococcus sobrinus* serotipos *d*, *g* y *h* que son dos de los principales agentes causales para el desarrollo de la placa dentobacteriana en humanos y otros mamíferos <sup>5,6,9</sup>. La habilidad de *Streptococcus mutans* para adherirse firmemente a la película adquirida de la superficie dental en presencia de una dieta rica en sacarosa, y para formar ácidos por fermentación de azúcares se asocia con el potencial cariogénico. A estos factores, se une la producción de glucanos insolubles por *S. mutans* y *S. sobrinus* como determinantes muy importantes en la producción de caries dental <sup>10</sup>.

*Streptococcus mutans* descrito primero por Clark, corresponde a la colección ATCC (American Type Culture Collection) con número 25175, el cual tiene las siguientes características: cocos grampositivos, presentes en pares y cadenas, las células miden 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, fermentadores de manitol, sorbitol y rafinosa, producen glucanos adhesivos a partir de sacarosa, son aerobios, y su crecimiento se incrementa en atmósferas reducidas en el contenido de oxígeno (Fig. 5), no producen amoniaco de arginina, las colonias de agar que contiene sacarosa al 5% tienen 1 mm de diámetro, rugosas y pegadas, posteriormente tienen gotas de líquido (conteniendo glucano soluble) alrededor de éstas (de 3 a 5 días de incubación), en agar sangre las colonias son  $\alpha$ -hemolíticas, puntiformes, adheridas al agar, no crecen a 22 °C, producen ácido sin gas de: glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina, salicina, dulcitol, mientras no fermentan glicerol, almidón, arabinosa, melibiosa ni xilosa <sup>11</sup>.

*Streptococcus mutans* ha sido implicado como el organismo causal primario de la caries dental, su establecimiento primario, ocurre frecuentemente entre el primer y cuarto año de vida, la principal fuente de infección es usualmente la saliva materna y los altos niveles salivales de *S. mutans* en la misma, más de  $10^5$  unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL) incrementan la posibilidad de la colonización, además se ha encontrado que la colonización primaria por *S. mutans* es menor en niños con caries dental <sup>12</sup>, la colonización de las superficies dentales es una etapa importante para la iniciación de la caries dental, este proceso es mediado por dos mecanismos principales, uno independiente del consumo de sacarosa y el otro dependiente del consumo de sacarosa, el primer mecanismo involucra la interacción entre sustancias de la superficie celular de *S. mutans* tales como el Ag I/II y las películas adquiridas formadas en el diente <sup>13, 14</sup>, el siguiente mecanismo involucra la síntesis de glucanos insolubles en agua a partir de sacarosa catalizadas por glucosiltransferasas (GTF), adicionalmente los glucanos se unen firmemente cubriendo la superficie del diente, formando una barrera que impide la difusión de ácidos producidos por el organismo, la producción de ácidos (asociada principalmente a *S. mutans*, *S. sobrinus* y a lactobacilos orales) es uno más de los factores patogénicos, es decir, la disminución del pH hasta 4.5 se presenta en individuos que tienen mayor susceptibilidad a caries dental, esta disminución de pH es más evidente alrededor de las zonas blancas de las lesiones cariosas que en las superficies sanas <sup>15</sup>.

*S. mutans* posee gran cantidad de sustancias antigénicas en su superficie celular, de los cuales se ha caracterizado en particular una proteína de 185 kilodaltons (kDa) que ha sido designada por varios autores como Antígeno I/II <sup>16</sup>, B, IF, P1, SR, Pac <sup>12, 17</sup> y MSL-1 <sup>18</sup>.

El Antígeno I/II posee dos determinantes antigénicos, de los cuales uno es resistente al tratamiento con proteasas (Antígeno II), el Antígeno I/II tiene un peso molecular estimado por SDS-PAGE de 185 kDa, un punto isoeléctrico de 4.7-4.9, con un pico de absorción de 270-280 nm y una absorción elevada por debajo de 230 nm; la composición química es la siguiente: proteína 82%, carbohidratos 1.7%, aminoazúcares 2.5%, fósforo 0.06%, el análisis de aminoácidos por hidrólisis ácida reveló la presencia de los aminoácidos más comunes, sin embargo, éstos mostraron cantidades bajas o indetectables de metionina y cisteína, respectivamente, el triptofano no se detectó pero es probable que no resistiera al tratamiento; otros aminoácidos que se han reportado como constituyentes de peptidoglucanos de *S. mutans*, no se encontraron en cantidades apreciablemente más grandes que otros aminoácidos <sup>19</sup>. Dos secuencias de aminoácidos internas repetidas se

presentan en el antígeno: una región repetida (la región A), localizada en la región N-terminal (Thr-219 a Lys-464), es rico en alanina, y la otra región (la región P), localizada en la región central (Thr-851 a Glu-967) es rica en prolina. El Antígeno I/II (Ag I/II) pertenece a un grupo de proteínas fibrilares de la familia de las adhesinas <sup>20</sup> la cual participa en la unión de los estreptococos a la película adquirida en las superficies dentales <sup>13</sup>, esta proteína aparentemente se une a las aglutininas de la saliva, cubriendo las superficies dentales favoreciendo la colonización *in vivo* de *S. mutans*, además esta proteína presenta una reactividad cruzada con la proteína de *Streptococcus sobrinus* de 210 kDa llamada SpaA <sup>5</sup>. El grupo de las glucosiltransferasas (GTF) se encuentran involucradas en la producción de glucanos insolubles en agua a partir de sacarosa con la consecuente acumulación de *S. mutans* <sup>21</sup>.

Se ha observado que este antígeno incrementa la actividad de la función supresora y cooperadora de los linfocitos T que actúan sobre las células formadoras de anticuerpos, además de tener un efecto proliferativo en células T <sup>22</sup>, las diferencias en el incremento de la actividad funcional es dependiente de la dosis <sup>23, 24</sup>, estudios *in vitro* en linfocitos humanos indican que a bajas y altas concentraciones del antígeno I/II se incrementa la actividad supresora de los linfocitos T, mientras que a dosis intermedias se incrementa la actividad cooperadora de los linfocitos T <sup>23</sup>.

La sensibilidad natural se presenta cuando el Antígeno I/II presente en la superficie de *S. mutans*, que habita comúnmente en la boca, entra en contacto con el sistema inmune del huésped, este antígeno incrementa la respuesta inmune natural, para prevenir la colonización del diente por *S. mutans* y por lo tanto evita el desarrollo de caries <sup>24, 25</sup>, la inmunización artificial en primates, mostró que el antígeno es fuertemente inmunogénico, incrementando los anticuerpos séricos IgG, IgA, e IgM <sup>24</sup>.



Fig. 6. Colonias de *Streptococcus mutans* en placas de agar mitis-salivarius-bacitracina (MSB). Las colonias que se observan pueden ser descritas con apariencia de "vidrio gaseado". Esto se debe al polisacárido extracelular, formado por la sacarosa en la placa de MSB (Bratthall).



Fig. 7. Las dos figuras anteriores, altamente magnificadas muestran la adherencia de colonias de *S. mutans* a la superficie (Fotografías por microscopía electrónica del Dr Jörgen Jönsson, Malmö). La habilidad para adherirse a las superficies es un factor patogénico de los microorganismos (Bratthall).

### **La cavidad oral, características**

La cavidad oral sirve como puerta de entrada para una gran diversidad de sustancias antigénicas exteriores, algunos son transitorios, como los alimentos, medicamentos y antígenos de bacterias muertas contenidas en alimentos y bebidas, otra parte de los antígenos es el resultado de la colonización bacteriana, el reto es más duradero y puede causar daño. La boca constituye un medio ambiente diverso y único, la mucosa oral y la lengua se colonizan con un grupo de microorganismos que reconocen receptores específicos en el epitelio, la superficie del diente forma un medio ambiente con microbiotas distintas, que van apareciendo de especificidad célula-célula o interacciones célula-película. Un tercer grupo de medio ambiente existe bajo la gingiva y está colonizada por otro tipo de microorganismos que tienen la capacidad de supervivencia en condiciones microaerofílicas, aquí, los productos bacterianos que se forman pueden disolver el diente, estimulando la resorción o la necrosis del tejido. El crecimiento desenfrenado de ciertos microorganismos y la acumulación de sus productos puede conducir a la pérdida de la función oral, algunos organismos secretan enzimas que pueden inactivar parcialmente componentes del sistema inmune del huésped, otros organismos inmóviles tienen la capacidad de invadir tejido oral.

Los retos a la homeóstasis se encuentran con una variedad de respuestas inmunes del huésped debido a la presencia de microorganismos, a menudo distintos mecanismos inmunes se encuentran en diferentes medios ambientes orales o en distintos estadios de la enfermedad. La saliva representa la "primera línea de defensa"; confronta a los microorganismos con una amplia variedad de anticuerpos y componentes inmunes innatos como mucinas, lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa que median los efectos protectores en varios caminos; los gránulos que revisten la membrana del epitelio no queratinizado, típico de muchas superficies orales, constituyen otra barrera, estas estructuras fosfolipídicas derivan del epitelio fundamental, retardando el movimiento de materiales, la membrana del epitelio basal forma otra barrera contra la invasión, finalmente, los linfocitos e inmunoglobulinas (inmunidad específica), obstruyen la penetración de microorganismos o sus productos, las barreras de tejido duro y suave, reflejan su origen y tienen características diferentes en los sitios anatómicamente distintos en la cavidad oral. En 1975 Lehner describió por separado el dominio salival y gingival dentro de los cuales funcionan diferentes mecanismos de defensa del huésped, el dominio salival se caracteriza por la presencia de derivados de las glándulas salivales tales como mucinas, lactoferrina, peroxidasa salival, lisozima (inmunidad innata) e IgAs



secretora (inmunidad específica), el dominio gingival se caracteriza por factores que fluyen de hendiduras gingivales tales como IgG, complemento, y componentes celulares, estos dominios se afinan, hacia las inmediaciones según el tipo, localización y grado de estimulación del tejido linfoide <sup>26</sup>.

Una de las funciones principales de la saliva humana es proteger la cavidad oral del sobrecrecimiento microbiano y la producción de sustancias nocivas microbianas que pueden causar enfermedades orales, los mecanismos protectores incluyen el flujo salival, el efecto amortiguador y factores antimicrobianos inmunes y no inmunes, estos factores tienen su origen en las glándulas salivales mayores y menores, o a través de hendiduras gingivales, los factores inmunes comprenden principalmente a la IgA secretora pero, depende del estado de salud oral del individuo, otros isotipos de inmunoglobulinas (Ig) incluyen a IgG e IgM, la saliva completa contiene además proteínas del complemento y polimorfonucleares <sup>27</sup>.

Para la identificación de caries en niños se han implementado varias pruebas, entre ellas se encuentran los conteos de *Streptococcus mutans* y lactobacilos, la velocidad de secreción de la saliva, el pH salival y la capacidad amortiguadora, sin embargo, estos métodos no han probado ser confiables en la predicción de la caries dental, entre todas las pruebas de tamiz, la que ha mostrado mejor efectividad hasta ahora es el índice CPO (en inglés DMFT, decayed, missing, filled, teeth index) para la predicción del riesgo de caries en niños <sup>28</sup>.

### **Inmunidad innata y específica (adaptativa) <sup>29</sup>.**

Inmunidad (latín *immunitas*, libre, exento) es la reacción frente a sustancias extrañas, dicha reacción no tiene efectos patológicos. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune, la respuesta global y coordinada tras la introducción de sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria, los individuos sanos se protegen contra microorganismos por diferentes mecanismos de protección, tales como la inmunidad innata (natural o nativa), es la primera línea de defensa frente antígenos extraños, consta de:

1. Barreras físicas y químicas: epitelios y sustancias antimicrobianas producidas por los epitelios.
2. Proteínas sanguíneas: sistema del complemento y mediadores de la inflamación.

### 3. Células fagocíticas: neutrófilos y macrófagos y células asesinas naturales (NK, del inglés, *natural killer*).

La capacidad los microorganismos para resistir esta barrera se relaciona, en parte, por su patogenicidad.

#### Inmunidad específica

Existen mecanismos de defensa que se estimulan tras la exposición a agentes infecciosos, aumentando su intensidad y capacidad ante nuevas exposiciones al mismo agente, se desarrolla como respuesta a la infección, y se denomina inmunidad adaptativa o específica, es específica y especializada, para discriminar distintos microorganismos, sus componentes son los linfocitos y sus productos entre ellos los anticuerpos, en conjunto con la respuesta inmunitaria innata, forman un sistema integrado de defensa en el huésped en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas.

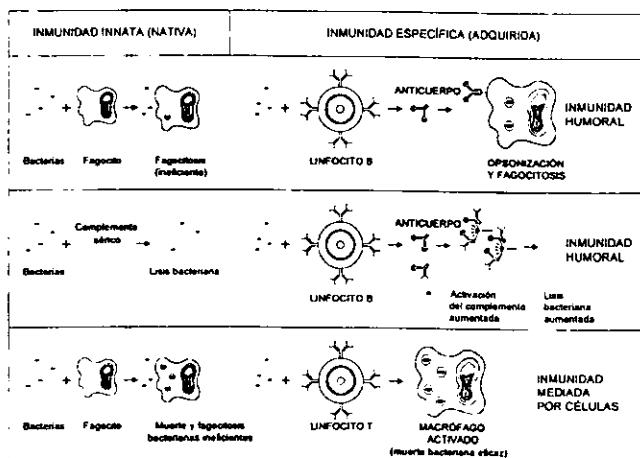


Fig. 8. Comparación de la inmunidad innata y específica en la defensa del huésped contra las infecciones<sup>29</sup>.

#### Respuesta inmunitaria específica

La generación de respuestas inmunitarias específicas se producen normalmente tras la exposición de un individuo a un antígeno extraño, se clasifican en dos tipos, según el componente del sistema inmunitario que participa en la respuesta:

- 1) Inmunidad humoral: participan moléculas, responsables de reconocer y eliminar a los antígenos llamadas anticuerpos producidos por los linfocitos B.
- 2) En la inmunidad mediada por células o inmunidad celular, participan linfocitos T.

#### *Características principales de la respuesta inmunitaria*

Las respuestas inmunitarias humoral y mediada por células a todos los antígenos tiene una serie de características fundamentales.

- ❖ *Especificidad*
- ❖ *Diversidad*
- ❖ *Memoria*
- ❖ *Especialización*
- ❖ *Autolimitación*
- ❖ *Discriminación entre lo propio y lo no propio*

Las respuestas inmunitarias se dividen en (Fig. 9):

- ❖ Fase de reconocimiento
- ❖ Fase de activación
- ❖ Fase efectora

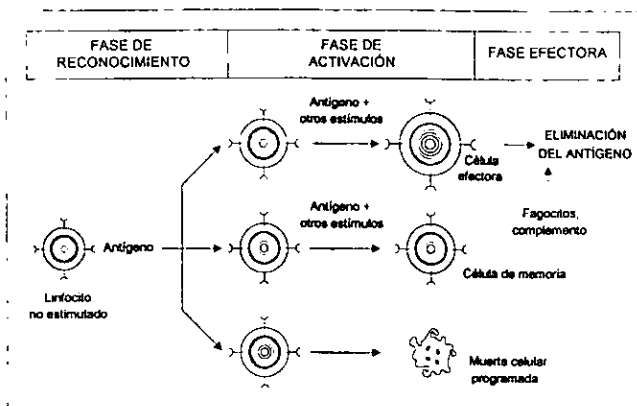


Fig. 9. Fases de la respuesta inmunitaria específica. La respuesta inmunitaria consta de tres fases: reconocimiento del antígeno, activación (proliferación y diferenciación de los linfocitos) y efectora (eliminación del antígeno), algunos linfocitos mueren por un proceso llamado muerte celular programada o apoptosis<sup>29</sup>.

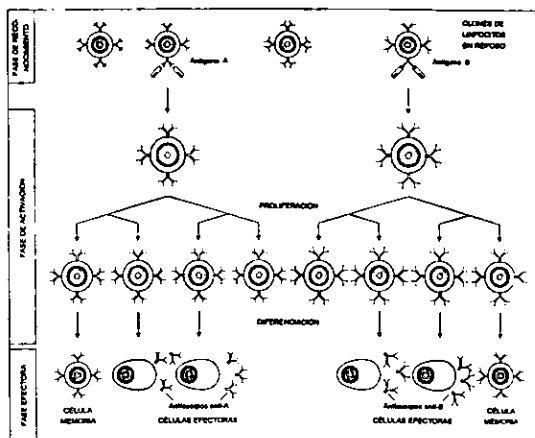


Fig. 10. Hipótesis de la selección clonal. Cada antígeno selecciona un clon preexistente de linfocitos específicos y estimula su proliferación y diferenciación<sup>29</sup>.

## Sistema inmunitario

Las células del sistema inmunitario en condiciones normales circulan en la sangre y la linfa. El sistema inmunitario debe responder a un gran número de antígenos extraños que se introducen en el organismo por cualquier sitio, sólo un pequeño número de linfocitos reconoce y responde específicamente frente a cualquier antígeno.

### Linfocitos

Los linfocitos reconocen y responden a los antígenos extraños, median las respuestas inmunitarias, pues son las únicas células capaces de reconocer específicamente y distinguir diferentes determinantes antigénicos o epitopos.

Los linfocitos constan de subgrupos que difieren en sus funciones y productos proteicos. Una clase de linfocitos son los linfocitos B, sus primeras fases de maduración se dan en la médula ósea, son los únicos que producen anticuerpos protegen eliminando por unión microorganismos extracelulares y antígenos solubles, los receptores para antígenos son formas de anticuerpos unidos a membrana, la interacción de los antígenos con estos anticuerpos de membrana inicia la secuencia de activación de la célula B (Fig. 11), que termina con el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos.

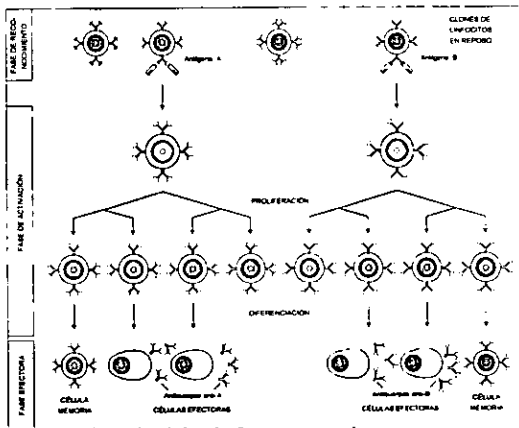


Fig. 11. Clases de linfocitos B que reconocen los antígenos solubles y evolucionan hacia células secretoras de anticuerpos <sup>29</sup>.

El segundo grupo de linfocitos son las células T; regulan la respuesta inmunitaria frente a antígenos proteicos y actúan como células efectoras en la eliminación de

microorganismos intracelulares; no producen anticuerpos, se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas, células T cooperadoras y células T citolíticas (o citotóxicas), los receptores para antígenos son moléculas de membrana estructuralmente relacionados con los anticuerpos.

Los linfocitos T cooperadores y citotóxicos reconocen sólo antígenos peptídicos unidos a proteínas codificadas por genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y que se expresan sobre la superficie de otras células; así, estos reconocen y responden a antígenos asociados a la superficie celular pero no a los antígenos solubles. Después de la estimulación antigénica, las células T cooperadoras secretan citocinas, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células T, células B y macrófagos, además, atraen y activan leucocitos inflamatorios, proporcionando importantes conexiones entre la inmunidad específica de las células T y los mecanismos efectores de la inmunidad natural. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) lisan las células que producen antígenos extraños, como células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares. Además de realizar la función cooperadora y citotóxica, las células T también inhiben las respuestas inmunitarias. No está claro si la supresión de la respuesta inmunitaria celular está mediada por una subpoblación diferente de linfocitos T, llamados células T supresoras o por células que, en diferentes situaciones pueden funcionar igualmente como células cooperadoras o citotóxicas.

Existen subpoblaciones de células T funcionalmente diferentes que expresan distintas proteínas de membrana, estas proteínas sirven como marcadores fenotípicos de las distintas poblaciones linfocitarias. Así, la mayor parte de las células T cooperadoras expresan una proteína de superficie llamada CD4, por lo que la mayoría de estos linfocitos son CD3+, CD4+ y CD8- mientras que la mayoría de los CTL expresan un marcador diferente llamado CD8, y el resto de los antígenos que presentan son CD3-, CD4- y CD8+. CD significa "grupos de diferenciación" (del inglés *cluster of differentiation*).

La tercera clase relevante de linfocitos no expresa marcadores de células B o T, son linfocitos grandes con gránulos citoplasmáticos capaces de lisar diferentes células tumorales e infectadas por virus sin una estimulación antigénica clara. Como resultado a estos linfocitos se les denomina linfocitos grandes granulares o células NK.

### **Linfocitos activados**

Antes de la estimulación antigénica o policlonal, los linfocitos pequeños se encuentran en reposo. Como respuesta a la estimulación antigénica o policlonal, los linfocitos aumentan

de tamaño (linfocitos grandes o linfoblastos) la progresión continúa y los linfocitos activados se dividen (transformación blástica), la proliferación de los clones de linfocitos se da por división mitótica.

Algunos linfocitos estimulados se diferencian a partir de células cognitivas, hacia células efectoras que eliminan al antígeno. Los CTL diferenciados albergan gran número de gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas que lisan a las células diana o blanco. Las células productoras de anticuerpos pueden diferenciarse hacia células plasmáticas, éstas se encuentran sólo en órganos linfoides y en los sitios donde se produce la respuesta inmunitaria, normalmente no circulan por la sangre ni por la linfa. Son fábricas para la síntesis y secreción de anticuerpos.

Algunos de los linfocitos T y B estimulados por un antígeno no se diferencian hacia células efectoras, en lugar de ello evolucionan a linfocitos de memoria, estas células son funcionalmente inactivas, no se conocen bien las características de las células de memoria porque estas se definen por su supervivencia, y apenas existen marcadores fenotípicos para distinguirlas definitivamente de los linfocitos estimulados y de los linfocitos efectoras o activados.

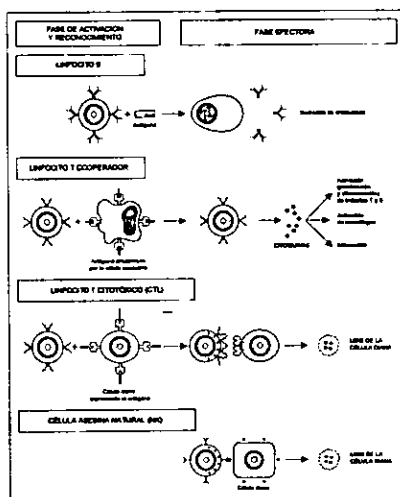


Fig. 12. Clases de linfocitos. Los linfocitos reconocen y evolucionan hacia células secretoras de anticuerpos. Los linfocitos T cooperadores reconocen antígenos en la superficie de las células accesorias y secretan citocinas, que estimulan a los distintos componentes de la inmunidad y de la inflamación. Los linfocitos citotóxicos reconocen antígenos sobre las células diana y las lisan.<sup>29</sup>

### Fagocitos mononucleares

La segunda población celular en importancia del sistema inmune involucra los monocitos y macrófagos, su función principal es la fagocitosis, estas células se originan en la médula ósea, tras su maduración y posterior activación, adquieren diversos tipos morfológicos, el monocito entra en la sangre periférica después de dejar la médula ósea antes de estar completamente diferenciado; cuando colonizan los tejidos, maduran, convirtiéndose en macrófagos, o histiocitos, capaces de fusionarse para formar células gigantes multinucleadas. Se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos y reciben nombres especiales para designar localizaciones específicas (Tabla 2)

Nombre	Ubicación
Células de la microglía	Sistema nervioso central
Células de Kupffer	Capilares del hígado
Macrófagos alveolares	Vías pulmonares
Osteoclastos	Hueso

Tabla 2. Algunas designaciones que reciben los macrófagos y su ubicación <sup>28</sup>.

Las funciones principales de los fagocitos mononucleares en la inmunidad innata son los siguientes:

- 1) Fagocitan partículas extrañas y partículas recubiertas por proteínas del complemento, las sustancias fagocitadas se degradan dentro de los macrófagos por las enzimas lisosomales y reactivos de oxígeno, controlando la diseminación de infecciones.
- 2) Producen citocinas que reclutan a otras células inflamatorias, especialmente neutrófilos, producen factores de crecimiento para fibroblastos y endotelio vascular, promoviendo la reparación de los tejidos dañados.

Los fagocitos mononucleares desempeñan las siguientes funciones en las fases de reconocimiento, activación y efectora de la inmunidad específica:

- 1) Los macrófagos muestran en su superficie antígenos extraños de forma que se reconocen por los linfocitos T antígeno-específicos, participando como células presentadoras de antígeno (APC; del inglés *antigen-presenting cells*), producen citocinas que estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, los macrófagos activados expresan proteínas de superficie que incrementan la



respuesta de las células T en el sitio de infección, actuando como células accesorias.

- 2) En la fase efectora algunos linfocitos T estimulados por el antígeno secretan citocinas que activan a los macrófagos, que son más eficientes en la eliminación de microorganismos fagocitados.
- 3) En la fase efectora de la respuesta inmune humoral, las partículas extrañas se recubren u opsonizan con anticuerpos y proteínas del complemento, entonces los macrófagos fijan y fagocitan estas partículas opsonizadas más ávidamente que las partículas no recubiertas.

### **Células dendríticas**

Son células accesorias que participan en la inducción de la respuesta inmunitaria, se identifican por sus proyecciones membranosas o espinosas; se dividen en dos tipos celulares con propiedades y funciones diferentes, las células dendríticas interdigitantes (células dendríticas), presentes en el intersticio de la mayoría de los órganos, son abundantes en las zonas ricas en células T de ganglios linfáticos y el bazo, y en la epidermis (células de Langerhans), se originan a partir de precursores de la médula ósea relacionadas con la estirpe de los fagocitos mononucleares, son muy eficientes presentando antígenos proteicos a los linfocitos T cooperadores, las células de Langerhans captan antígenos que entran a través de la piel y los transportan hacia los ganglios linfáticos donde se pone en marcha la respuesta inmunitaria.

El segundo tipo se denomina células dendríticas foliculares presentes en los centros germinales de los folículos linfoides de ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas, estas células en su mayoría no derivan de precursores de la médula ósea; atrapan antígenos unidos a anticuerpos o productos del complemento, expresándolos en su superficie para que sean reconocidos por los linfocitos B.

### **Granulocitos**

Son otro grupo de células sanguíneas, que participan en la fase efectora de la respuesta inmunitaria específica. Se estimulan por citocinas producidas por los linfocitos T, fagocitan partículas opsonizadas participando en la fase efectora de la respuesta inmune específica. La sangre periférica posee tres grupos de granulocitos

Los neutrófilos o polimorfonucleares, son los más numerosos. Responden a estímulos quimiotácticos; fagocitan y destruyen partículas extrañas como microorganismos; se

activan por citocinas producidas por macrófagos y células endoteliales, son la población celular principal en la respuesta inflamatoria aguda, poseen receptores para IgG y proteínas del complemento, migran y se establecen donde se activa el complemento, fagocitan partículas opsonizadas.

Los eosinófilos actúan principalmente en la defensa contra determinados tipos de agentes infecciosos, expresan receptores para anticuerpos IgE, fijándose con avidez a partículas recubiertas por él, son eficaces destruyendo agentes infecciosos que estimulan la producción de IgE (v.g. helmintos), son abundantes en los lugares donde se produce hipersensibilidad o alergia inmediata; contribuyendo al daño tisular e inflamación. La activación de los linfocitos T contribuye a la acumulación de eosinófilos en lugares con infestación parasitaria y reacciones alérgicas.

Los basófilos son células circulantes con una función muy similar a la de las células cebadas tisulares. Tanto los basófilos como las células cebadas expresan receptores de alta afinidad por la IgE, uniéndose con avidez a los anticuerpos IgE libres, la interacción posterior de los antígenos con IgE unidas a las células, estimula los basófilos y células cebadas a secretar las sustancias contenidas en sus gránulos, que son mediadores químicos de la hipersensibilidad inmediata.

### **Anatomía funcional de los tejidos linfoides**

La mayoría de los linfocitos, fagocitos y otras células accesorias se localizan y concentran en órganos linfoides anatómicamente definidos, son los lugares donde se transportan y concentran antígenos extraños, ésta compartimentación anatómica no es fija, muchos de los linfocitos recirculan y se intercambian constantemente entre la circulación y los tejidos.

Los tejidos linfoides se clasifican en dos grupos:

- a. Órganos generadores o tejidos linfoides primarios, son los tejidos en los que los linfocitos expresan por primera vez los receptores antigénicos y alcanzan la madurez fenotípica y funcional.
- b. Órganos periféricos, también llamados tejidos linfoides secundarios, son los lugares donde se inicia y desarrolla la respuesta de los linfocitos a los antígenos extraños.

## Médula ósea

En la vida fetal la hematopoyesis tiene lugar en los islotes sanguíneos, luego en el hígado y en el bazo, gradualmente se lleva a cabo en la médula ósea y posteriormente por la médula de los huesos planos, ya en la pubertad la hematopoyesis ocurre principalmente en el esternón, las vértebras, los huesos ilíacos y las costillas. La médula roja que se encuentra en estos huesos consta de un armazón reticular esponjoso, lleno de células adiposas y precursores de células sanguíneas que maduran y salen a través de senos vasculares, para formar parte del sistema circulatorio, todas las células sanguíneas se originan de una célula madre común, la proliferación y maduración en la médula ósea de las células precursoras se estimula por las citocinas.

La médula contiene linfocitos B maduros desarrollado a partir de células progenitoras. Hay numerosas células plasmáticas secretoras de anticuerpos que se desarrollan en los tejidos linfoides periféricos como consecuencia de la estimulación antigénica de las células B y que luego migran a la médula.

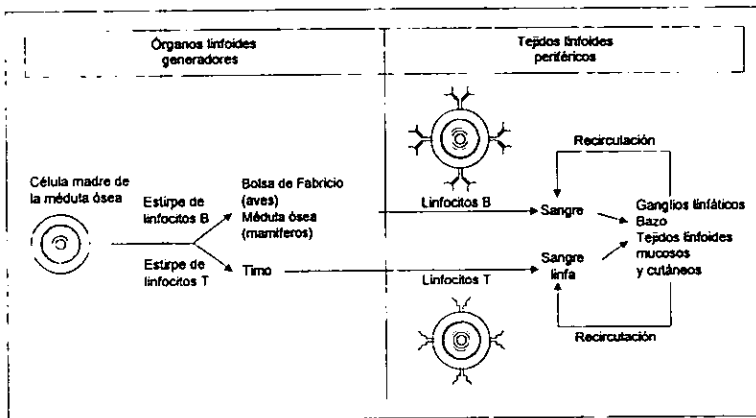


Fig. 13. Maduración de los linfocitos. El desarrollo de los linfocitos maduros previo a la exposición del antígeno ocurre en los órganos linfoides generadores y la respuesta inmunitaria a antígenos extraños tiene lugar en los tejidos linfoides periféricos<sup>29</sup>.

## Timo

Es un órgano bilobulado situado en el mediastino anterior, cada lóbulo se divide en múltiples lobulillos mediante septos fibrosos, cada lobulillo consta de una corteza

periférica rica en linfocitos T y una médula central. A través del timo existen células epiteliales no linfoides, células dendríticas y macrófagos, los vasos linfáticos drenan a los ganglios mediastínicos.

Los timocitos, son linfocitos T en distintos estadios de maduración no expresan los receptores para antígenos o marcadores de superficie (CD4 y CD8), los precursores de células T, provenientes de médula ósea, entran en la corteza del timo a través de vasos sanguíneos, migran desde la corteza hacia la médula y se ponen en contacto con células epiteliales, macrófagos y células dendríticas, en su camino hacia la médula, empezando a expresar receptores para antígenos y marcadores de superficie, sólo salen del timo células T maduras CD4 o CD8, comprometidas a funciones cooperadoras o citotóxicas, entrando en la sangre y en los tejidos linfoides periféricos, sólo las células capaces de reconocer y responder a antígenos extraños se seleccionan para sobrevivir, proliferar y madurar.

### **Ganglios linfáticos**

Son pequeños agregados nodulares de tejido linfoide situados a lo largo de los canales linfáticos repartidos por todo el cuerpo los epitelios como la piel, las mucosas de los tractos respiratorio y gastrointestinal, al igual que los tejidos conectivos y la mayoría de los órganos, tienen drenaje linfático, los vasos linfáticos recogen fluidos y células de los espacios intersticiales y devuelven éste fluido (linfa) a la sangre a través de los ganglios linfáticos, los antígenos penetran a través de la piel y los tractos respiratorio y gastrointestinal, terminan en los vasos linfáticos, profusamente tapizados con células accesorias y son transportados a los ganglios.

En la corteza externa del ganglio hay agregados celulares que constituyen los folículos que son áreas ricas en células B, algunos contienen centros germinales, los folículos primarios no poseen centros germinales, contienen principalmente linfocitos B maduros vírgenes que no han sido estimulados previamente por antígenos; los folículos secundarios si poseen centros germinales, las células dendríticas foliculares de los centros germinales presentan los antígenos a las células B activadas, las células plasmáticas totalmente diferenciadas se desarrollan fuera de los centros germinales y migran de los ganglios linfáticos a otros tejidos.

La médula interna contiene linfocitos y fagocitos esparcidos entre sinusoides linfáticos y capilares, donde los linfocitos pueden migrar y recircular entre la linfa, la sangre y los

tejidos. Las diferentes clases de los linfocitos y de células accesorias no linfoides son secuestradas en zonas especiales del ganglio.

Los linfocitos T se localizan predominantemente entre los folículos y en la corteza profunda, la mayoría son células CD4+ mezcladas con unas pocas células CD8+, los linfocitos T vírgenes que no han sido estimulados por antígenos extraños específicos, llegan a los ganglios a través de la linfa o a través las de vénulas endoteliales, donde se encuentran con los antígenos extraños, las células dendríticas, se localizan a lo largo del tejido conectivo del ganglio y presentan los antígenos a las células T cooperadoras inmaduras, por lo tanto los ganglios linfáticos son los lugares donde se inicia la respuesta de las células T a antígenos proteicos procedentes de la linfa.

La médula contiene linfocitos diseminados, macrófagos y células dendríticas y en los ganglios que drenan a los lugares de inmunización numerosas células plasmáticas, todas ellas intercaladas en los canales linfáticos.

Los linfocitos B que entran en los ganglios desde la sangre atraviesan las zonas ricas en linfocitos T cooperadores hacia los folículos y de esta manera se optimizan las oportunidades de interacciones cooperativas entre células T y células B, por lo tanto, la organización de las distintas poblaciones celulares en los ganglios linfáticos es crítica para la generación de la respuesta inmunitaria, la estructura de los ganglios linfáticos no es fija, y cambia con la exposición al antígeno: los centros germinales se desarrollan alrededor de una semana después de la inmunización y gradualmente regresan después de que se elimina el estímulo antigénico.

## **Bazo**

Se sitúa en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, está irrigado por la arteria esplénica, las arteriolas se encuentran envueltas por un manguito de linfocitos denominado vaina linfoide periarteriolar, donde se encuentran tejidos linfoides, algunos con centros germinales, las vainas linfoides y los folículos se rodean por un borde de linfocitos y macrófagos llamado zona marginal, estos tejidos linfoides densos constituyen la pulpa blanca del bazo. Las arteriolas terminan en capilares sinusoidales entre los cuales se hallan esparcidas grandes cantidades de eritrocitos, macrófagos, células dendríticas, escasos linfocitos y células plasmáticas; que forman la pulpa roja. Los sinusoidales terminan en vénulas que drenan en la vena esplénica que lleva la sangre desde el bazo hacia la circulación portal.

Las vainas periarteriolas contienen principalmente linfocitos T, de los cuales las dos terceras partes son CD4+ y una tercera parte CD8+, los folículos y centros germinales contienen predominantemente linfocitos B y presentan las mismas características anatómicas y funcionales que los ganglios linfáticos. Las zonas marginales albergan macrófagos, linfocitos B y células CD4+, los antígenos y linfocitos entran en el bazo a través de sinusoides capilares; la activación de las células B se inicia en las zonas marginales adyacentes a los linfocitos T cooperadores de las vainas periarteriolas, las células B activadas migran hacia los centros germinales o hacia la pulpa roja.

En principio la función del bazo y su respuesta a los antígenos es muy parecida a la de los ganglios linfáticos; la diferencia esencial es que el bazo es el lugar principal de la respuesta inmunitaria a los antígenos procedentes de la sangre, mientras que los ganglios linfáticos están implicados en la respuesta a antígenos procedentes de la linfa, el bazo es también un importante filtro para la sangre, los macrófagos de la pulpa roja limpian la sangre de sustancias extrañas indeseables y de eritrocitos viejos, incluso en ausencia de inmunidad específica.

#### **Otros tejidos linfoides periféricos**

Además de los ganglios linfáticos y el bazo, los linfocitos se encuentran en muchos tejidos, bien diseminados o en forma de agregados, algunos de estos grupos están anatómicamente bien organizados y poseen propiedades singulares, se sitúan bajo la mucosa de los tractos respiratorio y gastrointestinal, hay agregados de linfocitos y células accesorias que se asemejan a los ganglios linfáticos en cuanto a estructura y función, entre estos agregados se incluyen las placas de Peyer en la lámina propia del intestino delgado, las amígdalas de la faringe y los folículos linfoides de la submucosa del apéndice y en toda la extensión de las vías aéreas superiores. El tejido linfoide de estas zonas constituye el sistema inmunitario de las mucosas (Fig. 14). El sistema inmunitario cutáneo consta de linfocitos y células accesorias que se encuentran en la epidermis y la dermis <sup>29</sup>.

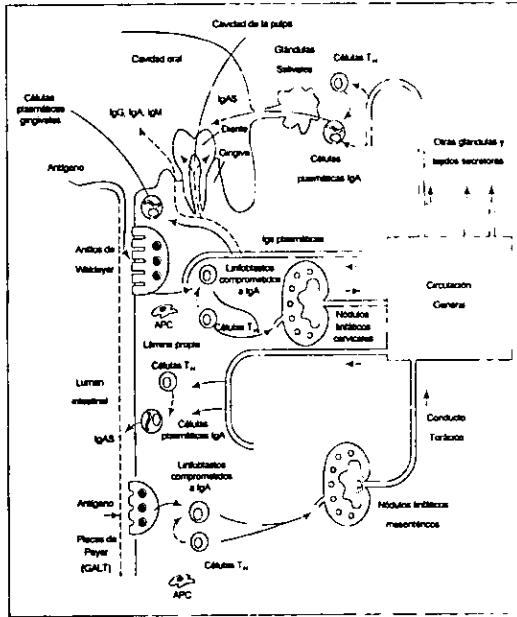


Fig. 14. Sistema inmunológico común de las mucosas y la inmunidad salival. Las células epiteliales especializadas (células M) cubren la mucosa asociada a los tejidos linfoides, en las criptas de las toncillas y adenoides (anillos de Waldeyer) y las placas de Peyer en el intestino, toman los materiales antigénicos y los transportan hacia las células presentadoras de antígeno (APC) subyacentes, las cuales presentan estos a las células T cooperadoras. Estas en su momento estimulan células B para diferenciarse en precursores de células plasmáticas IgA secretoras. Las células B y T migran por vía del drenaje local de los nódulos linfáticos, entrando en la circulación, y finalmente estableciéndose en varios sitios efectores de la mucosa, incluyendo el estroma de las glándulas salivales donde toma lugar la diferenciación terminal de los linfoblastos B hacia células plasmáticas IgA secretoras bajo la regulación de citocinas secretadas por las células T y epiteliales. La IgA polimérica secretada es tomada por el receptor polimérico Ig (componente secretor) en la superficie basolateral de las células epiteliales glandulares, y transportada hacia la superficie apical donde se libera unido al componente secretor para formar IgA-s. Pequeñas cantidades de IgM, IgG e IgA circulantes transudan a través de la hendidura gingival hacia la cavidad oral, y además puede penetrar los túbulos dentinales de la cavidad de la pulpa de los dientes. En enfermedad periodontal avanzada, las células plasmáticas colocadas en la gingiva secretan IgM, IgG e IgA las cuales exudan hacia las bolsas periodontales y la cavidad oral. <sup>30</sup>.

## INMUNIDAD HUMORAL

Los efectos protectores de la inmunidad humoral están mediados por una familia de glucoproteínas llamadas anticuerpos, los cuales siempre inician sus efectos biológicos al unirse a los antígenos, la unión del antígeno con el anticuerpo, es específica para un antígeno dado y muy fuerte.

Los anticuerpos se producen por los linfocitos B unidos a la membrana, estas moléculas actúan como receptores para antígeno de la célula B, la interacción de los antígenos con los anticuerpos de membrana de las células B constituye la fase de reconocimiento de la inmunidad humoral, los anticuerpos que se producen se secretan por la progenie de células B diferenciadas en respuesta a la estimulación antigénica, los anticuerpos secretados se unen al antígeno y desencadenan varias de las funciones efectoras del sistema inmunitario, la especificidad de la fase efectora se debe a la interacción antígeno-anticuerpo, las funciones efectoras están mediadas por partes del anticuerpo que se sitúan en lugares diferentes del sitio de unión del antígeno.

Los anticuerpos se encuentran en el plasma sanguíneo, además están presentes sobre la superficie de los linfocitos B, en su retículo endoplásmico y complejo de Golgi, también se les localiza, aunque en menor proporción en el líquido intersticial de los tejidos donde se acumulan los anticuerpos secretados, en la superficie de ciertas células que no producen anticuerpos, pero poseen receptores para unir anticuerpos tales como fagocitos mononucleares, células NK y mastocitos. También se les encuentra en ciertos fluidos secretados en las mucosas y la leche, los cuales transportan específicamente ciertos tipos de anticuerpos.

### **Inmunoglobulinas: estructura y función** <sup>31,32</sup>

Las inmunoglobulinas (Ig) son los miembros prototipo de la familia de las inmunoglobulinas. Las proteínas de membrana CD4 y CD8, los receptores antígeno específicos de linfocitos T, y los antígenos de clase I y II de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), entre otros, forman parte de esta familia.

El análisis tridimensional de estas moléculas revela más que una simple homología en la secuencia de aminoácidos; estructuralmente estas moléculas son similares, la variación es la esencia fundamental de los anticuerpos, por lo que de un isotipo de cadena a otro, pueden alterarse significativamente las funciones naturales de la respuesta inmune, funciones tales como la fijación de complemento, el cruce a través de la barrera



placentaria y la habilidad para originar formas poliméricas son sólo unas cuantas variaciones en la función de anticuerpos debida a las diferencias isotópicas. Cada una de estas respuestas se debe a las diferencias discretas en la estructura del anticuerpo.

El repertorio potencial de las especificidades de los distintos anticuerpos es de un millón a diez millones de antígenos diferentes, esta función se atribuye a la región variable de las cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras para cualquier anticuerpo dado, llamada región "variable", cualquiera de las dos regiones variables son de un 70 a un 99 % idénticas, ocasionalmente, cambia sólo un aminoácido; las diferencias muestran especificidades antigénicas distintas.

### **Características generales de las inmunoglobulinas**

Una molécula prototipo de inmunoglobulina se compone de cuatro cadenas polipeptídicas las cuales se unen en un complejo macromolecular mediante varios enlaces disulfuro. El polipéptido pequeño se denominan cadena ligera y el polipéptido grande cadena pesada. Una molécula de anticuerpo se compone de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas (Fig. 15).

El tratamiento con enzimas proteolíticas, como papaína o tripsina, escinden la molécula de inmunoglobulina en puntos específicos, dividiéndola en dos dominios funcionales básicos, dos fragmentos  $F_{ab}$  que consisten de una cadena ligera y un fragmento de la cadena pesada, el nombre  $F_{ab}$  se debe a que esta porción de la molécula se deriva del sitio activo de unión al antígeno (antigen-binding [ab]), la porción restante, el fragmento  $F_c$ , se denomina así, debido a que cristaliza (c) fácilmente, la porción  $F_c$  de la molécula es responsable de las funciones biológicas efectoras de la inmunoglobulina, como la fijación del complemento, cada cadena pesada puede dividirse en regiones, cada región tiene aproximadamente 110 aminoácidos, las cadenas ligeras consisten en dos regiones indicados como  $V_L$  y  $C_L$ .  $V_L$  es la región variable de la cadena ligera que participa en la unión con el antígeno,  $C_L$  es la región constante de la cadena ligera, que es invariable para un tipo de cadena ligera dada, la cadena pesada posee una región variable,  $V_H$ , la cual al igual que la cadena ligera es la porción de polipéptido que participa en la unión con el antígeno, en contraste con la cadena ligera, el prototipo de la cadena pesada tiene tres dominios constantes,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ , y  $C_{H3}$ . Las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas tienen una región conocida como bisagra (localizada generalmente entre  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ ) y proporciona a la porción  $F_{ab}$  la capacidad para moverse con respecto a la región  $F_c$ . Alguna región  $V_H$  y  $V_L$  pueden combinarse con otra región  $C_H$  y  $C_L$  respectivamente. Así,

la habilidad para reconocer un antígeno dado (una propiedad de la región V), puede estar ligarse a varias funciones efectoras (una propiedad de la región C).

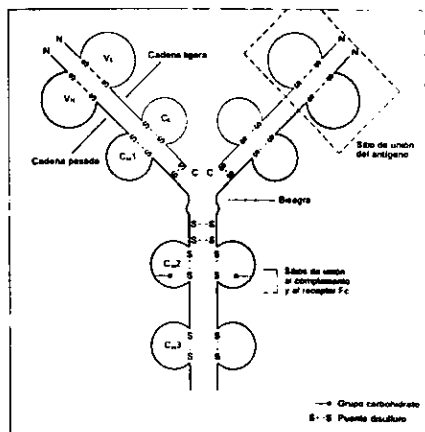


Fig. 15. Diagrama esquemático de una inmunoglobulina (Ig) <sup>29</sup>.

Una característica importante en la estructura de este dominio es la presencia de dos cisteínas que forman un enlace disulfuro intramolecular, el enlace disulfuro intradominio, mantiene la estructura terciaria y cuaternaria de la inmunoglobulina, la cadena ligera se une generalmente a la cadena pesada mediante un enlace disulfuro, además, la cadena pesada se enlaza covalentemente a otra cadena por puentes disulfuro entre las unidades de la bisagra, cada par formado por cadena pesada y ligera, tiene la capacidad de reconocer y unirse al mismo epitopo, de esta manera, una molécula de inmunoglobulina intacta puede interactuar con dos epitopos simultáneamente, esta característica en la estructura de inmunoglobulinas da a un monómero de inmunoglobulina una valencia de dos.

Algunas inmunoglobulinas se presentan como polímeros (Fig. 16), uniéndose covalentemente, la IgA usualmente forma una molécula dimérica, y la IgM forma una molécula pentamérica, ambas macromoléculas utilizan una molécula accesoria llamada cadena J para formar estos complejos, los polímeros tienen valencias altas para enlazarse a antígenos proporcionalmente para el número adicional de sitios de unión en la molécula. Además, las formas secretadas de IgA se asocian con una molécula llamada

componente secretor (SC), el cuál está involucrado en el transporte de la inmunoglobulina a través de las membranas epiteliales.

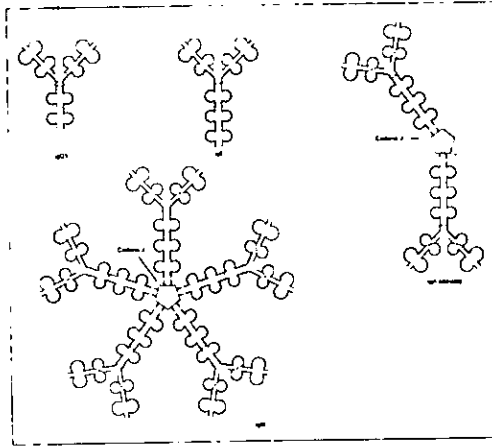


Fig. 16. Diagramas esquemáticos de varios isotipos de inmunoglobulina. La IgG y la IgE circulan como monómeros, mientras que las formas secretadas de IgA e IgM son dímeros y pentámeros respectivamente, estabilizados por la cadena J.<sup>29</sup>

## Moléculas accesorias

### Cadena J

La cadena J es un polipéptido de 137 aminoácidos, involucrado en la polimerización de IgA a dímeros y de IgM en pentámeros, la cadena J tiene un alto contenido de aminoácidos de carga negativa, así como, ocho residuos de cisteína involucrados en los enlaces disulfuro inter e intracatenarios, las células B no estimuladas contienen pequeñas cantidades o ninguna de la cadena J, donde la estimulación por mitógenos causa un incremento dramático en los niveles proteicos de la cadena J, una cadena J se asocia con un dímero IgA y con un pentámero IgM.

### Componente secretor/Receptor poli-Ig

El componente secretor (SC), es un miembro de la familia de las inmunoglobulinas, se asocia con IgA de secreciones externas, se le encuentra en secreciones mamarias y salivales como cadena libre, el SC involucra también a un receptor transmembranal, este complejo se llama el receptor poli-Ig (poli-Ig); se sintetiza en el epitelio glandular, donde

se expresa en la membrana basal de las células epiteliales; el poli-Ig es un receptor específico para las moléculas poli-Ig de la superficie basolateral de las células epiteliales, transportándose en vesículas intracelulares y en las superficies apicales celulares, el complejo es liberado de las células, durante el movimiento a través de la célula la molécula receptor es dividida en dos subunidades SC.

### **Anticuerpos de membrana como receptores de antígeno en células B**

La proliferación de las células B y la secreción de anticuerpos se da por la unión entre el antígeno a células B específicas, el antígeno es reconocido por los anticuerpos expresados en la superficie de las células B, éstas expresan distintos isotipos de cadenas pesadas según la fase en que se encuentren, así, los linfocitos B inmaduros expresan IgM, los linfocitos B no estimulados pueden expresar IgM e IgD, y las células B de memoria que han sido estimuladas previamente pueden expresar cualquier isotipo o subtipo, las Ig de membrana son estructuralmente diferentes a las Ig secretadas.

### **Neutralización del antígeno por anticuerpos secretados**

Muchos agentes agresores como toxinas, fármacos, virus, bacterias y otros parásitos, inician el daño celular uniéndose a receptores de superficie específicos, los anticuerpos secretados pueden dificultar estéricamente la interacción, uniéndose a los determinantes antigénicos del agente agresor, o con menor frecuencia a receptores celulares, neutralizando de esta forma el proceso tóxico o infeccioso, este proceso puede estar mediado por anticuerpos de cualquier isotipo y experimentalmente por fragmentos Fab o  $F(ab')_2$ .

### **Funciones de los anticuerpos, específicas de cada isotipo**

Muchas de las funciones de los anticuerpos están mediadas por sus porciones Fc y son por lo tanto, específicas para cada isotipo o subtipo en particular. Las células B pueden sufrir cambios del isotipo en las cadenas pesadas, permitiendo así, que la descendencia de una única célula B pueda expresar diferentes isotipos de moléculas de Ig sin cambiar las regiones de unión al antígeno. Como consecuencia, un antígeno utiliza una misma especificidad y diversidad de la inmunidad humoral, la disponibilidad de múltiples regiones C en distintos isotipos de cadenas pesadas proporciona una medida adicional de adaptabilidad. La producción de varios tipos de isotipos de cadenas pesadas sirve para dirigir la respuesta inmunitaria humoral a lo largo de diferentes vías anatómicas y funcionales.

Tipo de inmunoglobulina	Funciones conocidas
IgG	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Anticuerpo responsable de la respuesta inmune secundaria.</li> <li>❖ Activación del complemento.</li> <li>❖ Oponización para aumentar la fagocitosis.</li> <li>❖ Citotoxicidad mediada por anticuerpos.</li> <li>❖ Está involucrada en la citotoxicidad mediada por células.</li> <li>❖ Inmunidad neonatal mediada por IgG materna.</li> <li>❖ Inhibición por retroalimentación de las respuestas inmunitarias.</li> </ul>
IgA	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Inmunidad de las mucosas y secreciones (saliva, lágrimas, leche, etc.)</li> <li>❖ Citotoxicidad mediada por anticuerpos.</li> </ul>
IgM	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Anticuerpo predominante en la respuesta inmune primaria.</li> <li>❖ Actúa como señal en la activación, proliferación y diferenciación de células B maduras.</li> <li>❖ Activación del complemento.</li> <li>❖ Se observa frecuentemente en desordenes inmunológicos (i. e. Factor reumatoide)</li> </ul>
IgE	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Citotoxicidad mediada por anticuerpos.</li> <li>❖ Hipersensibilidad inmediata desencadenada por IgE.</li> </ul>
IgD	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Está presente como receptor de superficie de las células B maduras</li> <li>❖ El radio de expresión de <math>\mu</math> y <math>\delta</math> puede ser utilizado como indicador del estado de diferenciación de las células B</li> </ul>

Tabla 3. Resumen de algunas funciones, en las que se involucra la presencia de anticuerpos<sup>29</sup>.

La IgA sérica circula en el suero como un monómero, la forma más efectiva de IgA es un dímero, llamada IgA secretora, consistente en dos monómeros conectados con una cadena J, cada dímero entra a través de las mucosas, donde adquieren un polipéptido llamado componente secretor, que le protege de la degradación enzimática.

La IgA es el anticuerpo más abundante en las secreciones (tales como lágrimas, leche, saliva, mucosa intestinal y nasal), comprende del 10 al 15% de las inmunoglobulinas circulantes, es la primera línea de defensa contra organismos que invaden por vías mucosas y juega un rol importante en la respuesta inmune, la presencia de grandes

cantidades de IgAs en el calostro permite la transferencia de la inmunidad materna al neonato, el mecanismo exacto por el cual IgAs afecta el sistema inmune neonatal es desconocido, al parecer ayuda a proteger a los infantes de infecciones gastrointestinales, presumiblemente la IgA de secreción puede sobrevivir al pH bajo del estómago, y pudiera proporcionar al infante la inmunidad intestinal basada en el repertorio inmune de la madre.

Diversas investigaciones de actividad de IgA salival en niños y en adultos, sugieren que niveles elevados del anticuerpo IgA en saliva para *Streptococcus mutans* o sus antígenos están asociados con experiencia baja de caries o incluso ausencia de ella, la elevación en el título de anticuerpos también ocurre cuando se presentan lesiones cariosas activas dentro de la cavidad oral <sup>7,30</sup>.

Características	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Forma molecular usual	Monómero	Pentámero	Monómero, Dimero, Trímero, Tetramero	Monómero	Monómero
Subclases	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	Ninguna estabilizada	IgA1, IgA2	-	-
Cadenas pesadas de las subclases	$\gamma$ 1, $\gamma$ 2, $\gamma$ 3, $\gamma$ 4	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2	-	-	-
Porcentaje total de anticuerpo sérico	75-85	5-10	7-15 <sup>1</sup>	0.3	0.003
Localización	Sangre, linfa, intestino	Sangre, linfa, superficies de células B	Secreciones (lagrimas, saliva, moco, intestino, leche), sangre, linfa	Principal molécula de superficie de linfocitos.	Unida a células cebadas y basófilos
Peso molecular	150,000	950,000	160,000	175,000	190,000
Contenido de carbohidratos (%)	3	10	7	9	13
Vida media (días en suero)	23.0	5.1	5.8	2.8	2.5
Valencia del anticuerpo	2	5 o 10	2 o 4	¿?	¿?
Fijación del complemento	SI	SI	NO <sup>2</sup>	NO	NO
Transferencia placentar	SI	NO	NO	NO	NO
Funciones conocidas	Desarrollo de la fagocitosis, neutraliza toxinas y protege al feto y al recién nacido	Espacialmente efectiva contra microorganismos y antígenos aglutinantes, primer anticuerpo producido en la respuesta a la infección inicial	Protección localizada en superficies mucosas	No se conocen pero su presencia en células B pudiera indicar función en la iniciación de la respuesta inmune	Reacciones alérgicas, posible expulsión o lisis de protozoarios y parásitos. Anticuerpo homocitotrópico anafilaxis, alergia.
Unión a células	Macrófagos, neutrófilos	-	-	¿?	Células cebadas

Tabla 4. Características físicas, químicas y biológicas de las inmunoglobulinas humanas <sup>31</sup>.

<sup>1</sup> Porcentaje solo en suero; si se incluyen las membranas mucosas y secreciones séricas, el porcentaje es mucho más alto

<sup>2</sup> Tal vez "SI" por vía alterna.

## Antígeno

Se define antígeno como cualquier sustancia capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o un receptor de célula T, estas sustancias pueden ser metabolitos intermediarios, azúcares, lípidos y hormonas, macromoléculas de tipo de carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas pueden servir de antígenos, sin embargo, sólo las macromoléculas pueden iniciar la activación linfocitaria necesaria para una respuesta de anticuerpos, las moléculas que originan respuestas inmunitarias se llaman inmunógenos, las moléculas pequeñas se llaman haptenos, que pueden unirse a una macromolécula a la cual se le denomina transportador, un complejo hapteno-transportador, puede actuar como un inmunógeno, en general, las macromoléculas son más grandes que la región que se une al antígeno de una molécula de anticuerpo, por lo tanto, un anticuerpo se une sólo a la parte específica de la macromolécula, denominada determinante o epitopo, se puede decir que un hapteno es un determinante exógeno unido a una macromolécula.

Las macromoléculas contienen típicamente determinantes múltiples, cada uno de los cuales puede unirse a un anticuerpo.

## Interacciones antígeno-anticuerpo

La región del anticuerpo que se une al antígeno es el fragmento  $F_{ab}$ . La localización más precisa de esta función en las regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR, del inglés *complementarity-determining regions*)  $V_L$  y  $V_H$ .

El reconocimiento del antígeno por el anticuerpo implica un enlace reversible y no covalente.

Para IgG e IgE, la interacción implica como máximo dos lugares de unión, ya que sólo existen dos zonas de combinación por cada molécula de anticuerpo, una en cada  $F_{ab}$ , sin embargo, una molécula de IgM puede unirse hasta 10 sitios diferentes.

## ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Análisis por enzimas fijadas a inmunoabsorbentes) <sup>33</sup>

Los análisis con reactivos marcados han pasado a jugar un papel importante en el diagnóstico de laboratorio, entre estas técnicas se encuentran:

- ❖ Inmunofluorescencia
- ❖ Radioinmunoanálisis



### ❖ Enzimoinmunoanálisis

Los enzimoinmunoanálisis son de dos tipos principales, homogéneos y heterogéneos, en los análisis homogéneos la enzima se conjuga con un hapteno, cuando este conjugado reacciona con anticuerpo se altera la actividad enzimática, lo característico de este tipo de ensayo es que no requiere la separación de combinado libre, pero se halla restringido a una sustancia de bajo peso molecular, en los enzimoinmunoanálisis heterogéneos, en los que la separación del reactivo combinado marcado con la enzima del reactivo marcado libre, es una etapa esencial, estos ensayos, generalmente conocidos como análisis por enzimas fijadas a inmunoadsorbentes (ELISA), dependen del hecho de que los anticuerpos o antígenos se pueden ligar a una enzima, reteniendo el complejo tanto la actividad inmunológica como la enzimática.

En estos ensayos, el antígeno o anticuerpo se adosa usualmente a un soporte o una fase sólida para facilitar la separación de los reactivos libres y combinados, se ha hallado que antígenos y anticuerpos se pueden unir covalentemente al material particulado, tal como la celulosa y la poliacrilamida, y que también se puede obtener una adsorción pasiva satisfactoria para tubos, perlas, discos o microplacas, de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno, una parte esencial de ELISA es la conjugación del anticuerpo (o antígeno) fijado a enzima, es necesario que la enzima tenga actividad elevada, sea económica y obtenible en una forma pura y que posea una reacción con el sustrato fácilmente medible, las enzimas consideradas hasta ahora más satisfactorias son la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, la  $\beta$ -galactosidasa y la fosfatasa alcalina, las cuales son fijadas usualmente a anticuerpos o antígenos por medio de glutaraldehído o peryodato, los sustratos deben ser estables y solubles antes y después de la degradación. Los sustratos cromogénicos deben ser incoloros inicialmente y fuertemente coloreados tras la degradación, cuando se utiliza peroxidasa, la *o*-fenilendiamina es un sustrato idóneo, también el ácido 5-aminosalicílico y la *o*-toluidina han mostrado buenos resultados.

Los métodos para la detección de anticuerpo son los siguientes:

- ❖ Método indirecto
- ❖ Método competitivo
- ❖ Método *sándwich* de doble anticuerpo
- ❖ Método de inhibición

El método indirecto es ampliamente utilizado para la determinación de anticuerpos. Consta de las siguientes etapas:

1. Adsorción del anticuerpo a la placa de poliestireno.
2. Adición del anticuerpo de estudio.
3. Adición del conjugado de la antiinmunoglobulina marcado con enzima.
4. Adición del sustrato enzimático.
5. Lectura de las absorbancias.

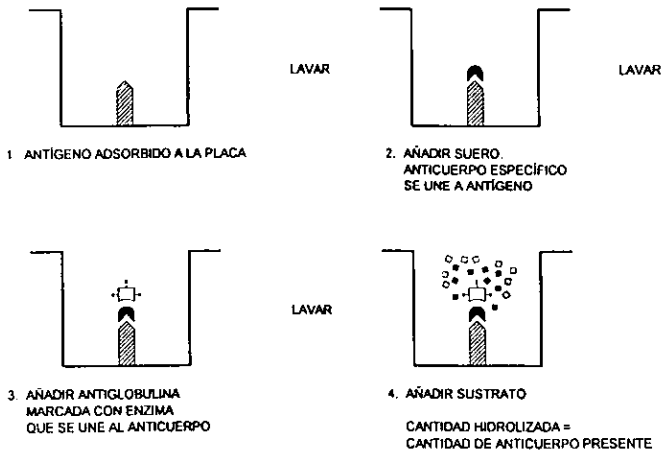


Fig. 17. Representación esquemática de la técnica de ELISA indirecto para la determinación del título de anticuerpos en saliva <sup>33</sup>.

### INMUNOELECTROTRANSFERENCIA <sup>34</sup>

La inmunoelectrotransferencia combina la resolución de la electroforesis en gel y la especificidad de la detección inmunoquímica y puede utilizarse para determinar las características de proteínas antigénicas, la presencia y cantidad de un antígeno, el peso molecular relativo de la cadena polipeptídica, y la eficiencia de la extracción del antígeno, puede combinarse con inmunoprecipitación para detecciones sensibles de antígenos menores y para estudiar interacciones específicas entre antígenos, es útil para ensayar la presencia, cantidad y especificidad de los anticuerpos de diferentes muestras de sueros policlonales, finalmente, puede utilizarse para la purificación de anticuerpos específicos,

debido a que el antígeno no está marcado, no es posible determinar por análisis posteriores, sus propiedades bioquímicas, modificaciones ni vida media.

El procedimiento de la inmunoelectrotransferencia puede ser dividido en seis etapas:

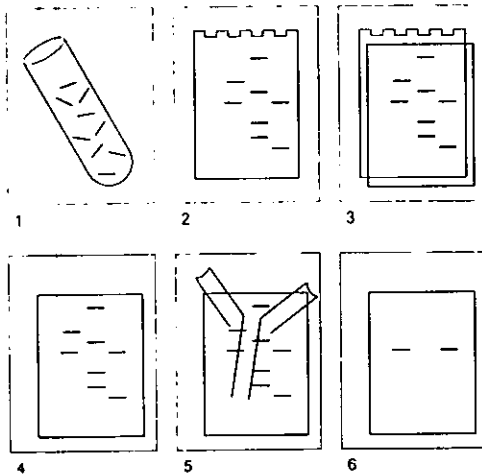


Fig. 18. Representación esquemática de una inmunoelectrotransferencia, mostrando las etapas en las cuales se lleva a cabo. 1) Preparación de la muestra de antígeno. 2) Resolución de la muestra por electroforesis en gel, 3) Transferencia de polipéptidos separados a una membrana de soporte 4) Bloqueo de sitios inespecíficos, 5) Adición del anticuerpo, 6) Detección<sup>34</sup>.

El principal factor para determinar el éxito del procedimiento de la inmunoelectrotransferencia es la naturaleza de los epitopos reconocidos por los anticuerpos, una resolución muy alta en la técnica de electroforesis en gel involucra la desnaturalización de la muestra de antígeno, así que algunos anticuerpos sólo reconocerán a los epitopos resistentes a la desnaturalización, la inmunoelectrotransferencia no requiere de anticuerpos de alta afinidad, la alta concentración local de antígeno, proporciona una mejor oportunidad para que el anticuerpo se una a través de las regiones  $F_{ab}$  de los brazos, aumentando ampliamente la avididad de las interacciones. La densidad del antígeno favorece además, la retención de anticuerpos de baja afinidad en la membrana incrementando la frecuencia con la cual los anticuerpos dejan la membrana uniéndose a los sitios adyacentes.

La sensibilidad de la inmunoelectrotransferencia se determina por detección, su límite es de 20 femtomoles. Para una proteína de peso molecular de 50,000 Da, esto es aproximadamente 1 ng, debido a que las capacidades de corrimiento de los gels son limitadas, un antígeno usualmente no puede ser detectado cuando esta concentración es

menor a 1 ng/muestra, para un gel típico de SDS-poliacrilamida la capacidad de una línea es aproximadamente 150 µg, puede observarse distorsión si se utilizan grandes cantidades, por lo tanto, las proteínas antigénicas pueden presentarse en 1 parte en 150,000, cuando se analizan proteínas de células de mamíferos, este límite representa aproximadamente 10,000 moléculas de proteínas de peso molecular de 50,000 por célula, para detectar proteínas presentes en niveles bajos, se requiere la purificación parcial del antígeno, que puede hacerse convenientemente por fraccionamiento celular, cromatografía, o inmunoprecipitación, a menos que el peso molecular del antígeno sea similar a una proteína abundante, la capacidad de la membrana de transferencia podría no estar limitada.

### Evaluación de caries dental <sup>35</sup>

La evaluación de la caries dental se lleva a cabo con un espejo plano bucal, el empleo de radiografías para la detección de caries proximales no es recomendable por lo impráctico de utilizar el equipo en todas las situaciones.

Los examinadores han adoptado un método sistemático para evaluar el estado de la dentición y la necesidad del tratamiento, el examen procede de una manera ordenada de un diente o un espacio de diente a un diente adyacente o espacio de diente, se considera que un diente está presente cuando alguna parte de éste es visible.

#### *Status de la dentición*

Se utilizan letras y números para registrar el estado de la dentición (Tabla 5).

**Índice de dientes cariados, perdidos y obturados, CPO (en inglés decayed, missing, filled teeth index: DMFT).**

DMFT describe la prevalencia de caries dental en un individuo, es una medida para expresar numéricamente la prevalencia de caries y se obtiene calculando el número de:

- Cariados (decayed D)
- Perdidos (missing M)
- Obturados (filled F)
- Dientes (teeth T)

Se emplea para ilustrar el status de la dentición hasta el día del examen y como se afectado por la caries dental, se hace para 28 dientes, excluyendo los dientes 18, 28, 38 y 48 (las llamadas "muelas del juicio") o para 32 dientes <sup>35</sup>.

El índice DMFT (o CPO) se calcula sumando los dientes cariados, perdidos por caries y los obturados con o sin caries, el valor más alto para este índice es 28, que indica que todos los dientes se encuentran afectados, el registro y la codificación se hacen en el anexo de la página 91.

Código			Condición/Status
Dientes primarios	Dientes permanentes		
Corona	Corona	Raíz	
A	0	0	Sano
B	1	1	Cariado
C	2	2	Obturado con caries
D	3	3	Obturado sin caries
E	4	4	Perdido como resultado de caries
-	5	5	Perdido por otras razones
F	6	6	Fisura sellada
G	7	7	Puente, corona especial o barniz/implante
-	8	8	Diente sin erupcionar (corona)/raíz no expuesta
T	T	T	Trauma (fractura)
-	-	-	No registrado (excluido)

Tabla 5. Código empleado para ver el estado de dentición<sup>35</sup>.

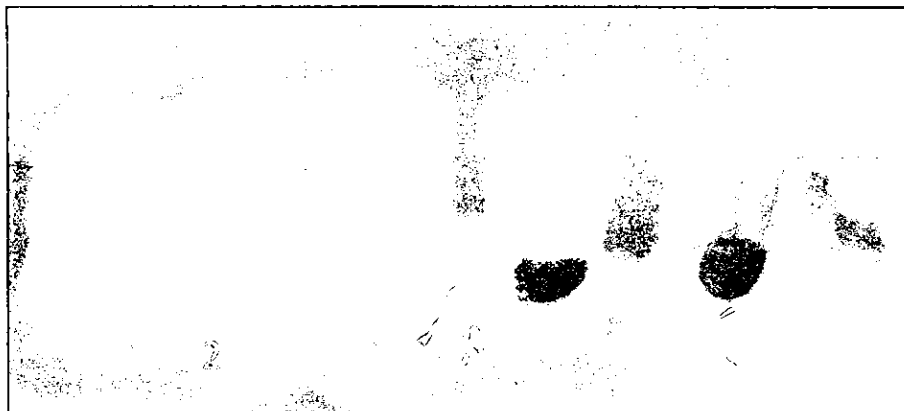


Fig. 19. Fotografía con los estadios de un proceso de caries dental.

1. Superficie dental sin caries
2. Los primeros signos de desmineralización, como pequeñas manchas blancas que se han formado (caries inicial o caries incipiente), no ha llegado a ser una cavidad, la superficie es aún dura, no se calculado como "D" (Decayed) de acuerdo a los criterios del WHO. Con las medidas apropiadas, el proceso de caries puede ser sanado y además reversible.
3. La superficie del esmalte se ha destruido en la parte inferior. Hay una "lesión" con reblandecimiento del piso, ahora se calcula como una "D" de diente o superficie.
4. Se ha hecho un empaste, pero no puede observarse, la desmineralización no se ha detenido, la lesión se encuentra alrededor del empaste, en algunas ocasiones es llamada "caries secundaria" pero en efecto, ésta es usualmente la misma enfermedad en progreso. El diente esta obturado F (filled) y cariado D (decayed), en los índices de caries esto es calculado normalmente solo como diente cariado (D)
5. Continúa la desmineralización y el diente es socavado.
6. El diente se ha fracturado, a causa de un proceso, que pudo ser detenido en su primera etapa

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caries dental es un problema de salud pública, su elevado índice de morbilidad, la colocan dentro de las enfermedades con mayor incidencia, y por lo tanto como un problema de salud. Esta enfermedad de naturaleza infecciosa, en la cual se asocia principalmente la presencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*; se desarrolla a partir del brote inicial de los dientes caducos, además se asocian hábitos alimenticios e higiénicos principalmente.

Actualmente, las lesiones cariosas, se evalúan mediante la observación clínica y se indican como índice CPO (piezas cariadas, obturadas y pérdidas), sin embargo, este método no proporciona información suficiente para considerar al individuo protegido o no contra infecciones o recolonizaciones posteriores. La técnica de ELISA permite la evaluación de la presencia de anticuerpos de tipo IgA en saliva dirigidos contra *Streptococcus mutans*. De las muestras que proporcionen resultados positivos, se pretende encontrar el o los epitopos del antígeno I/II de *Streptococcus mutans* responsables del desarrollo de la respuesta inmune humoral, haciendo uso de la técnica de inmunoelectrotransferencia.

Además, de obtener información sobre la respuesta inmune humoral específica del huésped, se realizará una correlación con el índice CPO y buscar asociación si es que existe. Lehner y Russell han propuesto al antígeno I/II como una buena opción de vacuna utilizando un modelo en primates. Por lo que se intenta saber si a un mayor título de anticuerpos contra los péptidos I/II hay una mejor protección, es decir se encuentra un índice CPO bajo.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Correlacionar el índice CPO con los anticuerpos de tipo IgAs contra el antígeno I/II de *Streptococcus mutans* cuantificados por el método de ELISA

### Objetivos particulares

- Obtener y purificar el antígeno I/II de *S. mutans* ATCC 25175 a partir de cultivos fluidos.
- Caracterizar por métodos físicos (electroforesis en geles de poliacrilamida y tamices moleculares) e inmunológicos (inmunodifusión, inmunoelectroforesis, inmunoelectrotransferencia) el antígeno I/II.
- Levantar el índice CPO en 139 adolescentes entre 12-15 años de edad.
- Obtener el título de anticuerpos de tipo IgA secretora presente en la saliva de los individuos del grupo de estudio por medio del método de ELISA indirecto.
- Identificar el o los epitopos responsables de la respuesta humoral en la población de estudio por medio de inmunoelectrotransferencia.
- Correlacionar los títulos de anticuerpos y el índice CPO.



## HIPÓTESIS

El antígeno I/II de *Streptococcus mutans*, ha sido reportado como una proteína altamente antigénica e inmunogénica, asociada con la adherencia del microorganismo a la superficie del diente; al llevarse a cabo la infección por *Streptococcus mutans*, se espera la relación inversa entre el título de anticuerpos IgAs contra el antígeno I/II de *S. mutans* y el índice CPO.

## JUSTIFICACIÓN

La caries dental es evaluada por medio de la observación clínica, que debe realizarse por personal especializado en el área estomatológica, ésta presenta el inconveniente de no poder llevarse a cabo por cualquier individuo, por lo cual la propuesta de un método de laboratorio tal como el método de ELISA, permitirá además de detectar el título de anticuerpos de tipo IgA secretora en saliva específica contra el antígeno I/II de *Streptococcus mutans*, para prescindir de este método.

La caries dental es una enfermedad con un alto índice de morbilidad, lo que tiene como consecuencia una alta prevalencia dentro de la población en general; hay que tener en cuenta que el problema principal de la caries dental no es meramente estético sino más bien funcional, además un gran número de estreptococos viridans incluido entre ellos *Streptococcus mutans* están asociados a endocarditis bacteriana subaguda<sup>36</sup>, es decir que al perder la continuidad en el tejido debido a inflamación en la gingiva o heridas por limpieza o manipulación mecánica, ponen en contacto al microorganismo con la vía hematológica.

La característica de inmunogenicidad y antigenicidad del Antígeno I/II, ofrece la posibilidad de crear una vacuna, es decir, si un título de anticuerpos alto tiene como consecuencia la disminución de infección, observable en la disminución del índice CPO, lo cual proporcionará las bases para considerar la posibilidad de elaboración de una vacuna y por lo tanto la disminución o posibilidad de eliminación de caries dental en la población.

## DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

**TIPO DE ESTUDIO:** Observacional y Transversal

**POBLACIÓN:** 139 adolescentes entre 12 y 15 años de edad, voluntarios perteneciente a la Escuela Secundaria Diurna Librado Rivera Gódinez No 274.

**CRITERIOS DE INCLUSIÓN:** Adolescentes entre 12 a 15 años que donaron saliva se les levanto el índice CPO.

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:** Aquellos sometidos a tratamiento por antibióticos que pudieran disminuir el número de estreptococos en saliva, y los que presentaron infecciones bacterianas.

**CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:** Adolescentes cuyas muestras de saliva no estuvieron completas.

El índice CPO se levantó por la C. D. Patricia Meneses Huerta y C. D. María Teresa Zaragoza Meneses.

## MATERIAL Y EQUIPO

### Reactivos.

- ❖ Metanol absoluto, T. J. Baker
- ❖ Aceite de Inmersión, Sigma
- ❖ Fosfato de sodio dibásico, T. J. Baker
- ❖ Fosfato de potasio monobásico, T. J. Baker
- ❖ Cloruro de sodio, Técnica Química
- ❖ Formaldehído, Merck
- ❖ Cloruro de potasio, Técnica Química
- ❖ o-fenilendiamina, Sigma
- ❖ Timerosal, Sigma
- ❖ Sulfato de amonio, Baker
- ❖ Ácido acético glacial, T. J. Baker
- ❖ Acrilamida, Sigma
- ❖ N,N-bisacrilamida, Sigma
- ❖ N-N-N-tetrametilendiamino (TEMED), Sigma
- ❖ Tris(hidroximetil)amino-metano (TRIS), Sigma
- ❖ Glicina, Sigma
- ❖ Dodecilsulfato de sodio (SDS), Sigma
- ❖ Ácido clorhídrico, T. J. Baker
- ❖ Ácido sulfúrico, T. J. Baker
- ❖ DEAE-celulosa, Sigma
- ❖ Azul de bromofenol, Sigma
- ❖ Azul brillante de Coomassie, Sigma
- ❖ Carbón activado, Sigma
- ❖ Peróxido de hidrógeno, Sigma
- ❖ 3,3'-diaminobencidina, Sigma
- ❖ Acetona, T. J. Baker
- ❖ Etanol, T. J. Baker
- ❖ Persulfato de amonio (APS), Sigma
- ❖ Bicarbonato de sodio, Baker
- ❖ Albúmina sérica bovina fracción V, Merck
- ❖ Ácido cítrico monohidratado, Técnica Química
- ❖ Buffer de barbituratos, Sigma
- ❖ Kit de colorantes para tinción de Gram, Merck
- ❖ Sephadex G-150, Sigma
- ❖ Carbonato de sodio, J. T. Baker
- ❖ Rojo de Ponceau al 2% en ácido tricloroacético, Gelman Sciences
- ❖ Fenol, Técnica Química
- ❖ Tween 20, Sigma
- ❖ Leche descremada, Svelty
- ❖ Adyuvante completo de Freund, Sigma
- ❖ Adyuvante incompleto de Freund, Sigma
- ❖ Tubos Eppendorf para microcentrifuga de 500 y 1500  $\mu\text{L}$
- ❖ 2-mercaptoetanol

### Medios de cultivo

- ❖ Caldo de Todd-Hewitt, Bioxon
- ❖ Infusión de cerebro-corazón, Bioxon
- ❖ Agar de soya tripticaseína, Bioxon

- ❖ Base caldo rojo de fenol, Bioxon
- ❖ Carbohidratos:
  - Almidón Sigma
  - Arabinosa J. T. Baker
  - Glicerol Merck
  - Glucosa Sigma
  - Inulina Sigma
  - Lactosa Bioxon
  - Maltosa Sigma
  - Manosa Sigma
  - Rafinosa Sigma
  - Sacarosa Merck
  - Salicina Sigma
  - Sorbitol Merck
  - Trehalosa Sigma
  - Xilosa Merck
- ❖ Leche tornasol, Difco
- ❖ RMVP, Bioxon
- ❖ Caldo urea, Bioxon
- ❖ Discos de Bacitracina de 0.04 U. I., Bigaux

### Equipo

- ❖ Cámara de electroforesis owl Scientific
- ❖ Cámara para electrotransferencias BioRad
- ❖ Balanza analítica Mettler H80
- ❖ Balanza granataria de un plato Ohaus
- ❖ Centrífuga Sol-Bat modelo J-12
- ❖ Micropipetas tipo Eppendorf
  - Labnet Labpette 2-20  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$
  - Labsystem 5-40  $\mu\text{L}$ , 40-200  $\mu\text{L}$
  - Transferpette 200-1000  $\mu\text{L}$
- ❖ Pipeta multicanales Costar Octapette 100  $\mu\text{L}$
- ❖ Cuarto frío Temperatura de 4 °C
- ❖ Lector de placas de ELISA Dynatech
- ❖ Secador de geles de poliacrilamida Slab Gel Dryer SGD 4050
- ❖ Concentrador Speedvac modelo AES200
- ❖ Congelador horizontal Revco a -20 °C
- ❖ Ultracentrífuga con refrigeración Damon IEC B-20A
- ❖ Fuente de luz ultravioleta Model UVL-56 Black-Ray Lamp
- ❖ Plataforma de agitación Bellco Glass
- ❖ Incubadora a 37 °C Riossa
- ❖ Horno de microondas Sharp
- ❖ Microcentrífuga Eppendorf 5414C
- ❖ Fuente de poder BRL
- ❖ Vortex Genie
- ❖ Columna para cromatografía
- ❖ Carrusel recolector de muestras 212 Redirac fraction collector LKB Bromma

**Material de vidrio de uso común**

- ❖ Pipetas graduadas 0.1 mL, 1 mL, 5 mL, 10 mL,
- ❖ Vasos de precipitado 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL
- ❖ Matraces Erlenmeyer de 500 mL, 1000 mL,
- ❖ Probetas de 10, 50, 100, 500 y 1000 mL
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Tubos de ensayo con tapón de baquelita
- ❖ Embudos
- ❖ Frascos de vidrio transparentes
- ❖ Pipetas Pasteur

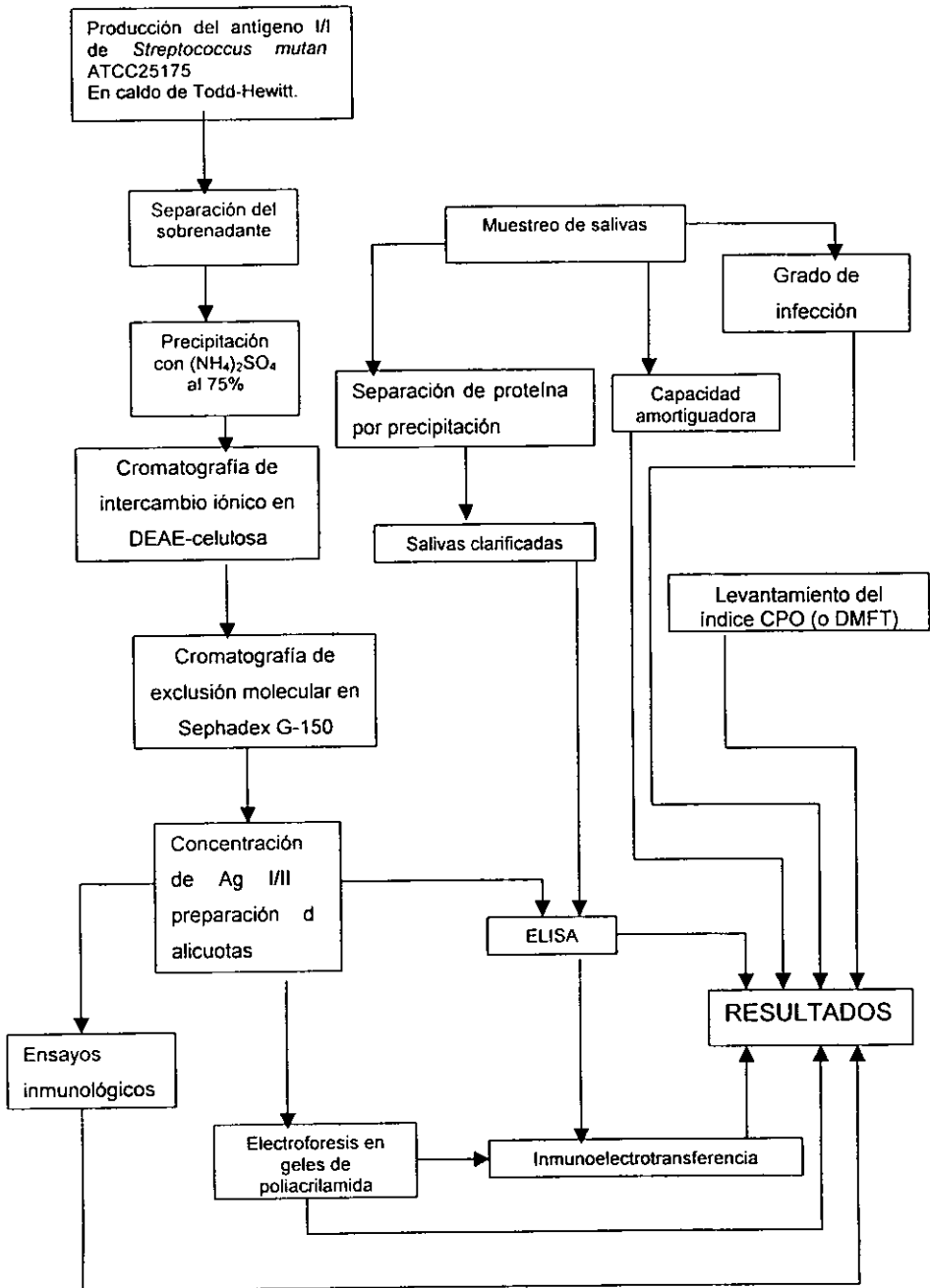
**Material biológico**

- ❖ *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- ❖ 2 conejos Nueva Zelanda blancos
- ❖ Anticuerpos anti-IgA humana ( $\alpha$ -IgA) obtenida en cabra, SIGMA
- ❖ Marcador de pesos moleculares preteñido con rango de 16.5 a 175 KDa, New England Biolabs.
- ❖ Sangre de carnero, estéril
- ❖ Sangre de conejo, estéril

**Otros materiales**

- ❖ Gradillas
- ❖ Jeringas
- ❖ Papel filtro de poro abierto
- ❖ Papel filtro Whatman # 40
- ❖ Tijeras
- ❖ Guantes de látex desechables
- ❖ Placas de Poliestireno tipo Cooke con 96 pozos Corning
- ❖ Acetato de celulosa, SIGMA
- ❖ Algodón
- ❖ Gasa
- ❖ Hisopos
- ❖ Portaobjetos
- ❖ Papel Parafilm
- ❖ Puntas para micropipeta: 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- ❖ Tubos para microcentrifuga tipo eppendorf: 500  $\mu$ L y 1500  $\mu$ L

DISEÑO EXPERIMENTAL



## MÉTODOS

### Aislamiento del Antígeno I/II

#### 1. Propagación<sup>16, 19</sup>

1. En un matraz Erlenmeyer de 5 L conteniendo 2.5 L de caldo de Todd-Hewitt precalentado; se inoculó con 100 mL de un cultivo de toda la noche de *Streptococcus mutans* en caldo de Todd-Hewitt. Se incubo a 37 °C en periodos de 16 a 65 horas.
2. Se separó por centrifugación el sobrenadante a 22.000 r.p.m. por 1 a 2 horas, en frío.
3. El cultivo sobrenadante se concentró al vacío a aproximadamente 200 mL, seguido de una diálisis contra agua, se precipitó con sulfato de amonio al 75% de saturación.
4. En una columna de 30 por 1.5 cm para cromatografía que contenía DEAE-celulosa a pH 7.4, se eluyó la muestra con una velocidad de flujo de 25 mL/hora con 500 mL de NaCl con un gradiente de 0.1 a 0.3 M en el amortiguador inicial. Las fracciones se colectan a intervalos de 15 minutos, los eluatos se monitorearon a 280 nm.
5. Las fracciones colectadas se mezclaron, se dializaron contra agua y se concentraron nuevamente.

#### 2. Purificación del antígeno I/II con DEAE-Celulosa<sup>16, 37</sup>

##### Activación de la DEAE-Celulosa.

- a) Se pesaron 50 g de DEAE-Celulosa, se resuspendieron en 500 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) de pH 8.0.
- b) Se mezcló, se ajustó el pH a 8.0 con HCl 1.0 N, se agitó bien, se permitió sedimentar durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante con la bomba de vacío (para eliminar finos), se adicionó más buffer, se mezcló bien y se repitió el ciclo de sedimentación, dos veces más.
- c) La DEAE-Celulosa se vació en un embudo Buchner con 2 capas de papel filtro Whatman #1.
- d) Se dejó secar por 30 segundos con la bomba de vacío hasta que quedó una pasta húmeda o "cake", se pesó la pasta en un vaso de precipitados y se adicionó la cantidad adecuada del antígeno diluido, la adición se llevó a 4 °C, se agitó 10 minutos y reposo por 1 hora, a la misma temperatura.



- e) Transcurrido este tiempo, se vació el contenido en el embudo Buchner, se recuperó el sobrenadante, donde se encuentra el antígeno.
- f) La muestra se concentró a un volumen equivalente a 1/10 del original, por medio de centrifugación y vació a congelación en un Speedvac.
- g) Se dializó contra agua destilada a 4 °C por 4 días.

### 3. Purificación del antígeno en columna de Sephadex

- a) Se pesaron 16 g de Sephadex G-150, se hidrató con agua destilada durante 24 horas.
- b) Se llenó una columna de 2.5 por 50 cm con el Sephadex hidratado, se corrió agua destilada en la columna, toda la noche.
- c) Se obtuvo el volumen vacío con azul dextrano, en esta fracción se encuentran las proteínas con pesos moleculares mayores de 150 kDa, entre ellas el Antígeno I/II.
- d) Las muestras se concentraron a un volumen aproximadamente 1/10 del original.

### Determinación de proteína por el método de Lowry <sup>38</sup>

#### 1. Preparación de la curva estándar

- a) Se preparó una solución estándar de ovoalbúmina en solución salina con una concentración final de 270.0 µg / mL.
- b) Se colocó una serie de diez tubos con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 mL y se completó el volumen a 1 mL (un tubo lleva sólo 1 mL de solución salina y se le dio el mismo tratamiento que al resto de los tubos, éste corresponde al blanco de reactivos).
- c) Se agregó a cada tubo 3 mL del reactivo C. Se dejó reposar durante 10 minutos.
- d) Se adicionó 0.1 mL del reactivo de Folin sin diluir. Se dejar reposar durante 30 minutos.
- e) Se ajustó a cero con el blanco de reactivos el espectrofotómetro.
- f) La absorbancia se leyó a 600 nm empezando por la de menor concentración hasta llegar a la de mayor concentración.
- g) Se elaboró la curva de calibración.

## 2. Determinación de la concentración de proteínas en el Antígeno I/II.

- a) Se elaboraron diluciones en solución salina del antígeno de prueba de la siguiente forma: 1:10, 1:100, 1:500 y 1:1000.
- b) Se completó el volumen a 1 mL.
- c) Se agregó a cada tubo 3 mL del reactivo C. Se dejó reposar durante 10 minutos.
- d) Se adicionó 0.1 mL del reactivo de Folín sin diluir. Se dejó reposar durante 30 minutos.
- e) La absorbancia se leyó a 600 nm empezando por la de menor concentración hasta llegar a la de mayor concentración.
- f) Se interpolaron las absorbancias en la curva estándar.
- g) Se calculó la concentración de proteína para el Antígeno I/II.

## Métodos inmunológicos<sup>18, 19</sup>

### Preparación del antisuero.

El antisuero poliespecífico se obtuvo de la inmunización conejos blancos Nueva Zelanda, para prepararlo se utilizaron estos dos métodos.

1. De células completas. *S. mutans* ATCC 25175 se cultivó en caldo de Todd-Hewitt, los microorganismos se mataron con formaldehído al 1% se lavaron dos veces con solución salina. Se inocularon los conejos por vía intravenosa en intervalos de 2 a 3 días con 1 mL de suspensión de  $10^8$  microorganismos en solución salina; incrementando a  $5 \times 10^9$  organismos para la 9a, 10a y 11a inyección. El suero se colectó una semana después de la última inoculación.
2. El antígeno del cultivo sobrenadante de *S. mutans* ATCC 25175, se precipitó con sulfato de amonio y se incorporó dentro de adyuvante completo de Freund (FCA), se inyectó 1 mL intramuscularmente un segundo conejo. Además se administró inyecciones del antígeno en FIA (adyuvante incompleto de Freund), tres semanas después el conejo se sangró.

## Métodos inmunológicos para la identificación del Antígeno I/II.

Inmunodifusión:

### Método:

1. En un vaso de precipitados de 250 mL se colocaron 150 mL de agua destilada.

2. Se agregaron 150 mg de ion agar (oxid) y se hizo hervir hasta la disolución total del agar (aproximadamente 1 hora). El volumen del agua evaporada, se repuso con agua destilada.
3. En la solución de agar, aún caliente, se sumergieron portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados, los cuales posteriormente se colocaron en un horno precalentado a 100 °C hasta que se secan.
4. En forma semejante a la que se indica en los pasos 1 y 2, se prepararon 100 mL de una solución de ion agar al 1% en solución salina pH 7.2
5. Los portaobjetos secos, se acomodaron sobre una superficie perfectamente horizontal y con una pipeta de punta ancha se les colocan a cada uno, 4 mL de ion agar caliente. El agar se gelificó a temperatura ambiente.
6. Con ayuda de un molde apropiado, se perforó el gel, el gel residual se removió.
7. Los pozos así formados se llenaron con el antígeno en el centro y los sueros alrededor.
8. Se preparó una cámara húmeda, utilizando una caja de Petri cubriendo la base con un disco de papel filtro húmedo.
9. Se colocaron los portaobjetos en el interior de la cámara sobre aplicadores de madera.
10. Se incubó a temperatura ambiente de 24 a 48 horas, posteriormente se localizaron las bandas de precipitación, con azul de Evans.

Se corrió en agar con amortiguador de barbituratos 0.05M a pH 8.6 en portaobjetos con pozos de 3 mm de diámetro y 5 mm de separación. Al pozo se agregaron 5  $\mu$ L de antígeno I/II y de los anticuerpos. La difusión se continuó por 16 a 40 horas a temperatura ambiente, cuando los geles se secaron, se lavaron en NaCl al 5% y se tiñeron con azul de Coomassie.

## Inmunoelectroforesis

### Método:

1. Se prepararon los portaobjetos barnizados con agar, en forma similar a la descrita para inmunodifusión.
2. Se prepararon 100 mL de una solución de ion agar al 1% en regulador de barbituratos, después de la ebullición el volumen perdido se repuso con agua destilada. Finalmente se añadió 1 mL de merthiolate al 1% para obtener una concentración final de 1:10,000.

3. Los portaobjetos secos se acomodaron sobre una superficie perfectamente horizontal y con una pipeta de punta ancha, se colocaron 4 mL de agar al 1% en caliente. El agar se solidificó a temperatura ambiente. Hasta antes de su uso, los portaobjetos con agar se conservaron sumergidos en regulador de barbituratos a 4 °C.
4. Los portaobjetos con agar se perforaron según el esquema seleccionado, extrayendo cuidadosamente el cilindro de agar de la perforación circular pero no el del canal.
5. En el recipiente de la cama del aparato de inmunolectroforesis se añadió la cantidad necesaria de regulador de barbituratos. Se acomodaron los portaobjetos, estableciendo el contacto entre la placa de agar y el regulador.
6. En las perforaciones de las placas de agar se colocaron las soluciones de antígeno usando una pipeta o un capilar y cuidando que quedará completamente llena la cavidad pero sin que se derramara el líquido sobre la superficie de la placa.
7. Se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder ajustando la corriente a 8-10 vols/cm de gel.
8. Cuando se observó en el portaobjetos que la muestra teñida se había desplazado unos 3 o 4 cm (esto es al cabo de 2 a 3 horas), se suspendió la corriente.
9. Se retiraron los portaobjetos, se removió el agar del canal y se llenó con el anticuerpo.
10. En el interior de una caja de Petri, se formó una cámara húmeda y se depositó el portaobjetos, se dejó a temperatura ambiente entre 24 a 48 horas, se realizaron las lecturas.

Se corrió del mismo modo en agar y amortiguador de barbituratos pH 8.6, utilizando 5µL de antígeno en solución con un gradiente de potencial de 4-5 volts/cm durante 1 hora aproximadamente. Las cubetas contenían 50 µL de antisuero. La difusión se muestra, secando, lavando y tiñendo como se describe para iD.

Contrainmunolectroforesis:

Método:

1. Las placas de agar del equipo con perforaciones necesarias que se identifican mediante una plantilla negra, los números de la tarjeta, quedaron orientados junto

a cada par de horadaciones. El exceso de humedad del agar se eliminó con una tira secante hasta que las cavidades de cada horadación quedaron secas.

2. De cada par de horadaciones, la más cercana al ánodo se llenó con el suero de estudio, usando un capilar.
3. En la horadación más próxima al cátodo se llenó con el antígeno.
4. En el último par de pozos se colocó el suero testigo positivo y el mismo antígeno.
5. Se quitó la plantilla, la placa se invirtió y se colocó sobre el aparato ya listo.
6. Se corrió la electroforesis a 30 mA, durante 1 hora.
7. Se buscaron las bandas de precipitación.

#### **Cuantificación de *S. mutans***

Para la cuantificación de *S. mutans* en saliva se utilizó la técnica de Matsukubo y cols. Modificada (39).

1. Se prepararon 150 mL de caldo mitis-salivarius.
2. Con 24 horas de anticipación se le agregaron telurito de potasio al 0.01% y 0.2 UI/mL de bacitracina, en condiciones de esterilidad.
3. Se distribuyeron 2 mL de medio en tubos de ensayo.

#### **Recolección de datos y manejo de las muestras de saliva**

1. Se levantó el índice CPO a cada uno de los adolescentes participantes en el proyecto, además, se solicitó la donación de 3 a 5 mL de saliva, aproximadamente, en tubos de ensayo estériles, los cuales se mantuvieron en hielo hasta llegar al laboratorio con la finalidad de procesarse el mismo día.
2. Se tomaron 100  $\mu$ L de saliva por cada muestra para inocularse al caldo mitis-salivarius. Una vez inoculado el medio se incubó a 37 °C durante 24 horas (los tubos se inclinaron a 60° para permitir la adherencia de los microorganismos al tubo).
3. Transcurridas las 24 horas, se vació el contenido de los tubos en un recipiente con fenol al 5%, se realizó el recuento de *S. mutans*, en una fuente de luz adecuada, de acuerdo al número de colonias que se adhirieron al tubo. El procedimiento de lectura se realizó de acuerdo a:

Si no aparecen colonias en la pared del tubo	0
Si el número de colonias es menor de 10	+
Si el número de colonias es mayor de 10 pero menor a 100	++
Si el número de colonias es mayor de 100 pero menor a 350	+++
Si es mayor de 350 dándole al tubo un aspecto de cristal nevado	++++

La codificación 0	corresponde a no infectado
La codificación +	corresponde a baja infección
La codificación ++	corresponde a infección moderada
La codificación +++	corresponde a alta infección
La codificación ++++	corresponde a muy alta infección

Los resultados se vacian en las tablas de concentración incluidas en el anexo (página 91)

4. El resto de las muestras de saliva se clarificaron filtrando cada una con una jeringa con filtros de algodón estéril, se hizo pasar la muestra de saliva por la misma, colectando en tubos perfectamente limpios, los tubos se rotularon con la numeración respectiva asignada a cada donante. Esta saliva se utilizó para la determinación de la capacidad amortiguadora de la saliva, determinación del título de anticuerpos por el método de ELISA e inmunoelectrotransferencia. Las muestras de saliva se mantuvieron en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

#### **Estandarización de la técnica de ELISA <sup>40</sup>**

1. Para el ensayo de ELISA se utilizaron placas de microtitulación con 96 pozos irradiadas con luz U. V.
2. Se cubrieron con  $100\text{ }\mu\text{L}$  del Antígeno I/II, de diluciones seriales al doble (de A a G, H es testigo negativo para antígeno) en amortiguador de carbonatos-bicarbonatos  $0.05\text{ M}$  (pH 9.6). Se incubó la placa cubierta a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Se eliminó el sobrenadante.
3. Se bloqueó la placa con  $300\text{ }\mu\text{L}$  de albúmina sérica bovina Fracción V al 2% (p/v) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se incubó la placa cubierta a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween (PBST).
4. Se prepararon diluciones seriales dobles de la saliva (con dilución inicial 1:5) y se adicionaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  por pozo (de 1 a 11, la línea correspondiente a 12 es testigo negativo de anticuerpo), entonces las placas se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Transcurrido este tiempo las placas son lavadas tres veces con PBST.
5. Los anticuerpos se detectaron con un conjugado de peroxidasa de rábano-anti-IgA humana de cabra, del cual se adicionaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  a cada pozo, la placa se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Al cabo de este tiempo se lavaron las placas tres veces con PBST.

6. Se revelaron las placas como sigue: se adicionó del sustrato de *o*-fenilendiamina disuelto en amortiguador de sustrato. Después se incubó a 37 °C por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura de las placas, con un lector de ELISA la absorbancia a 490 nm

El anticuerpo titulado por ELISA se expresa como el  $\log_2$  del recíproco de la dilución más alta dada en  $A_{490}$  por encima de 0.1 del conjugado control (no se adiciona la muestra) después de 1 hora de incubación con el sustrato. Para determinar la cantidad de IgA específica, se elabora una curva de calibración, de la siguiente forma: Se cubren las placas microtituladoras con 1  $\mu\text{g}$  de anti-IgA humana de cabra, posteriormente se bloquea con albúmina sérica bovina al 2% (p/v), se adicionan dos diluciones seriales de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IgA humana purificada por afinidad. La unión se detecta como se describe anteriormente.

#### **Determinación del título de anticuerpos de tipo IgA secretora (IgAS) contra el antígeno I/II de *S. mutans* por el método de ELISA <sup>40</sup>**

1. Se irradiaron placas de microtitulación con 96 pozos con luz ultravioleta durante 30 minutos.
2. Se adicionó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de antígeno I/II (3.2  $\mu\text{g}$  de antígeno) diluido en buffer de carbonatos-bicarbonatos (50 mM, pH 9.6). Se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se eliminó el sobrenadante.
3. Inmediatamente la placa se bloqueó con 300  $\mu\text{L}$  de solución de albúmina sérica bovina al 2% en PBS. Se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se lavó con PBST tres veces.
4. A cada pozo se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de saliva diluida 1:80 en PBS. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente se lavaron tres veces con PBST.
5. La detección de anticuerpos que se unieron específicamente se hizo adicionando un conjugado de peroxidasa de rábano unida a anti-anticuerpo IgA humano ( $\alpha$ -IgA) preparado en cabra, con una dilución 1:500. Se incubó a 37 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron tres veces con PBST.
6. Se colocaron en cada pozo 100  $\mu\text{L}$  del sustrato *o*-fenilendiamina diluido en buffer de sustrato, se incubó durante 15 minutos a 37 °C.
7. Se tomó la lectura de las absorbancias de las placas en un lector de ELISA a 490 nm. La concentración de anticuerpos se detectó por interpolación de los datos

para las muestras de saliva en la curva de calibración como se describe anteriormente.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)<sup>34, 41, 42</sup>**

#### Preparación del gel separador.

1. Formación del gel. Con dos cristales de 12x11 y 12x10 cm y con espaciadores de teflón de 0.5 mm se armó el soporte donde se formó el gel de poliacrilamida. Se sellaron los lados y la parte inferior con agarosa al 2% cuidando de que no quedará algún espacio sin cubrir.
2. En un vaso de precipitados de 100 mL se mezclaron 10 mL de solución A, 7.5 mL de solución B, 0.3 mL de solución D y 12.05 mL de agua. Cuidando que no se formaran burbujas.
3. Se mezcló perfectamente, evitando la formación de burbujas ya que el aire evita la polimerización del gel.
4. Se adicionaron 10  $\mu$ L de TEMED y 150 $\mu$ L de solución E. Cuidando en todo momento que no se formaran burbujas
5. La mezcla se vació en el armazón hasta aproximadamente 4 cm del borde.
6. Se agregó agua cuidadosamente por los extremos, aproximadamente 0.5 mL. El agua forma una capa cuya interfase se observa cuando el gel está polimerizado.
7. Una vez polimerizado, se inclinó el armazón para desalojar el agua.
8. Se lavó la superficie del gel con agua destilada.
9. Se adicionó 1 mL de solución F.
10. Se dejó reposar el gel por unos minutos.

#### Preparación del gel empacador.

1. Se vació el líquido de la superficie del gel.
2. En un vaso de precipitados se agregaron 1.66 mL de la solución A, 2.5 mL de la solución C, 0.1 mL de la solución D, 6.1 mL de agua destilada. Se mezcló evitando la formación de burbujas.
3. Se agregaron 5 $\mu$ L de TEMED y 50 $\mu$ L de solución E. Se mezcló cuidando que no se formaran burbujas.
4. Se llenó el armazón, hasta el tope, con la solución del gel empacador.
5. Se insertó el peine cuidándose de no generar burbujas bajo los dientes de éste.
6. Se dejó reposar el gel por 30 minutos, tiempo en el cual el gel empacador habrá solidificado.



7. Se combinaron por partes iguales la muestra de proteína y regulador de tratamiento 2X, solución G, en un tubo de microcentrifuga.
8. Se colocó el tubo en un baño de agua hirviendo por 90 segundos.
9. Los tubos de las muestras se mantuvieron en hielo hasta su uso.

#### Marcado y corrido de los geles.

1. Se retiró el peine suavemente del gel cuidando no destruir los pozos.
2. Se llenaron los pozos con agua destilada y drenó invirtiendo la cámara.
3. Se colocó el armazón en su posición dentro de la cámara electroforetica.
4. Se llenó cada pozo con el regulador de corrimiento (solución H).
5. En cada pozo se colocó una muestra, en el carril 1 se colocó el marcador de pesos moleculares.

#### Tratamiento de las muestras.

1. Se llenó el comportamiento interior de la cámara electroforetica con regulador de corrimiento, solución H. Se introdujo el armazón en el compartimiento, evitando que quedarán burbujas atrapadas en la zona donde termina el gel.
2. Se conectó la fuente de poder.
3. Se corrió la electroforesis a 80 volts de corriente constante. Cuando entró al segundo gel se subió a 120 volts.
4. Cuando el colorante estuvo a 1 cm del limite del gel aproximadamente, se eliminó la corriente.

#### Tinción y decoloración de los geles.

1. Se desensambló el sándwich y el gel se colocó en la solución J. Se dejó 6 horas, con agitación.
2. Se retiró la solución colorante del gel, y se transfirió a la solución decolorante, solución K, se dejó reposar de 1 a 2 horas.
3. Se transfirió el gel a la solución decolorante, solución L.
4. El gel teñido se secó a 60 °C al vacío.

**NOTA:** Cuando el gel se empleó para inmunoelectrotransferencia se omitieron los cuatro pasos anteriores (correspondientes a tinción y decoloración de los geles)

#### **Inmunoelectrotransferencia (westerblot)** <sup>34, 40, 42</sup>

**IMPORTANTE:** A partir de este momento se trabaja todo el tiempo con guantes de látex nuevos.

### Transferencia

1. Se cortó una hoja de papel de nitrocelulosa y cuatro hojas de papel filtro absorbente (Whatman 3 MM o el equivalente) al tamaño del gel.
2. Se empapó la membrana de nitrocelulosa colocándola en suficiente agua destilada durante varios minutos permitiendo que se humedeciera por acción de la capilaridad. Cuando esto sucedió, se sumergió la hoja 2 minutos más.
3. La membrana se retiró y se empapó en buffer de transferencia durante 5 minutos.
4. El papel absorbente se humedeció remojando en el buffer de transferencia por 5 minutos.
5. El gel, membrana, papel filtro y las almohadillas de soporte se sumergieron en el buffer de transferencia para asegurarse que estuvieran totalmente humedecidos. Se eliminaron cuidadosamente las burbujas de aire de las almohadillas de soporte.
6. Se ensambló el *sándwich* de transferencia (Fig. 21), cuidando que todos los componentes estuvieran húmedos y herméticamente ensamblados.
7. Se colocó el *sándwich* completo en el recipiente de transferencia con la membrana del lado del electrodo positivo.
8. Se transfirió a 15 volts durante toda la noche y se aumentó a 140 volts durante una hora más.
9. Después de la transferencia, se desconectó la fuente de poder. El *sándwich* se desensambló y la membrana de nitrocelulosa se marcó con un recorte en la esquina inferior izquierda.
10. El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie para verificar la transferencia (si está se llevó a cabo, el gel No se teñía)

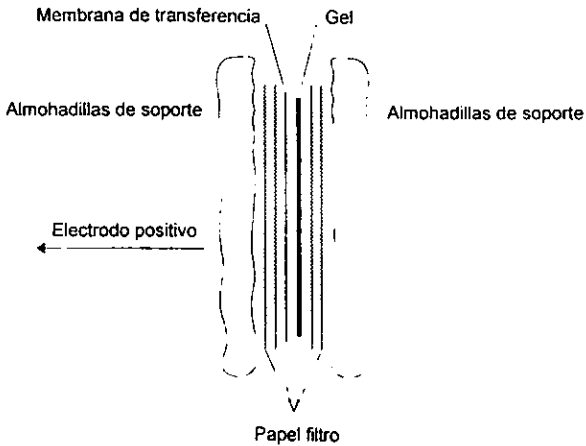


Fig. 20. Representación esquemática del ensamblado para la inmunoelectrotransferencia<sup>34</sup>.

#### Tinción de la membrana de nitrocelulosa

1. Para teñir se preparó un stock concentrado de rojo de Ponceau (al 2%), la solución se diluyó 1:10 con agua y se preparó la solución de trabajo.
2. La hoja de nitrocelulosa se lavó enseguida en la solución de rojo de Ponceau se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se transfirió la hoja de nitrocelulosa a PBS y se lavó por 1 a 2 minutos con varios cambios de PBS.
4. Se marcó la posición de la transferencia y los marcadores de peso molecular.

#### Bloqueo de sitios inespecíficos

1. Se lavó la membrana varias veces con PBS.
2. Se adicionó la solución de bloqueo (albúmina sérica bovina fracción V al 5% en PBS)
3. Se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 2 horas.

#### Adición del anticuerpo

1. Se removió el *blot* de la solución de bloqueo y se lavó dos veces durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente y agitación con PBST.
2. Se cortó el *blot* en tiras.
3. Las muestras de saliva se diluyeron 1:4 en PBS.
4. En recipientes pequeños se colocó una tira del *blot* y la saliva diluida.

5. Se incubaron las muestras de saliva durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
6. Cada *blot* se lavó con cuatro cambios de PBST durante 5 minutos cada uno (con agitación y a temperatura ambiente).

#### Adición del conjugado

1. Se hizo una dilución 1:1000 del conjugado de anti-IgA humana-peróxidasa de rábano en PBS.
2. Se incubó cada *blot* por separado con el conjugado, a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora.
3. Los *blots* se lavaron con 4 cambios de PBST durante 5 minutos cada uno.

#### Detección

1. Justo antes de desarrollar el inmunoblot, se disolvieron 6 mg de 3,3'-diaminobencidina (DBA) en 10 mL de PBS.
2. Se le adicionaron 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %.
3. Los inmunoblots lavados se colocaron en un recipiente adecuado. Se adicionaron 10 mL de la solución. El blot se reveló a temperatura ambiente con agitación hasta que las bandas fueron lo suficientemente oscuras.
4. La reacción se detuvo, removiendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por lavado con PBS.

## MODELO ESTADÍSTICO

La prueba H o prueba de **Kruskal-Wallis** es una prueba de suma de rangos que sirve para probar la hipótesis nula de que  $k$  muestras aleatorias independientes provienen de poblaciones idénticas contra la hipótesis alternativa de que no todas las medias de estas poblaciones son iguales; esta prueba no implica la suposición de que las poblaciones de las que se efectúa el muestreo tienen, por lo menos aproximadamente, distribuciones normales <sup>43</sup>.

## RESULTADOS

### Purificación del antígeno

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry al concluir las siguientes fases de la purificación:

- ❖ Precipitación de proteínas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 75 % y diálisis
- ❖ Purificación con DEAE-celulosa
- ❖ Concentración a aproximadamente a 1/10 del volumen original

El único resultado que se reporta es el obtenido en la última fase de purificación.

Tubo	Concentración de proteína (ovoalbúmina) en $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
Blanco	0.0	0.00
1	27.0	0.09
2	54.0	0.14
3	81.0	0.20
4	108.0	0.30
5	135.0	0.41
6	162.0	0.47
7	189.0	0.61
8	216.0	0.80
9	243.0	0.75
10	270.0	1.20
Problema	¿?	0.09

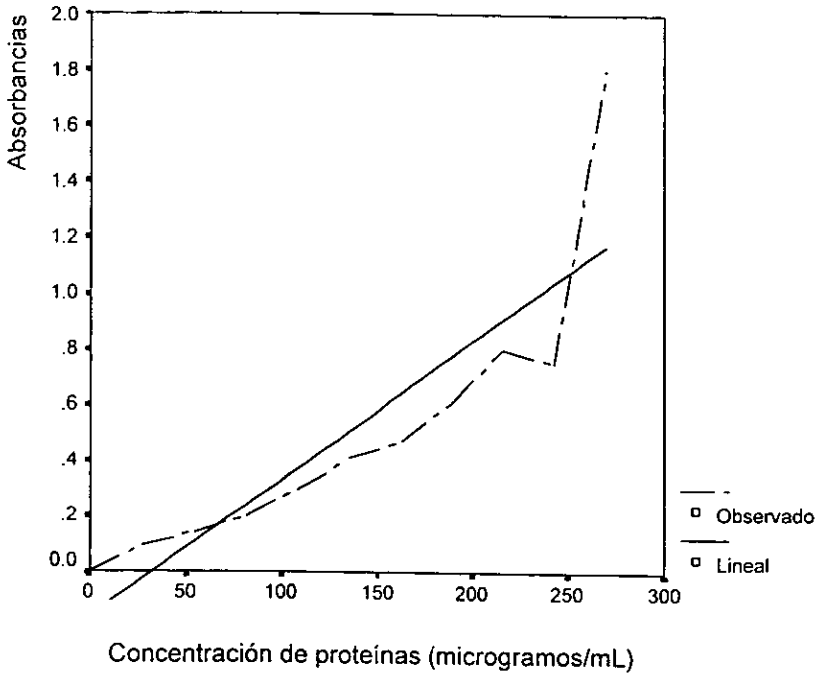
Tabla 6. Para la preparación de la curva estándar de proteínas (ovoalbúmina).

	Absorbancia	Factor de dilución	Concentración
Problema	0.09	250	10.61211 mg/mL

Tabla 7. Resultados para la concentración de proteína del Antígeno I/II, determinado por el método de Lowry.

$r$	$r^2$	$r^2$ ajustada	Error estándar de la estimación	Significancia de F	a	b
0.965	0.931	0.924	0.1002	0.000	-0.07590	0.00039

Tabla 8. Resultados del análisis estadístico por regresión lineal de la curva estándar de proteínas (ovoalbúmina)

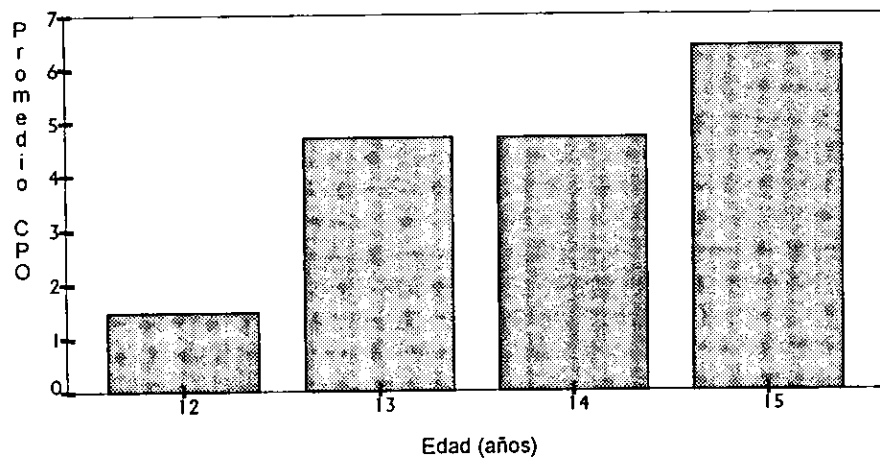


Gráfica 1. Curva estándar de proteínas (ovoalbúmina) de concentración de proteína (ovoalbúmina) en  $\mu\text{g/mL}$  contra absorbancia.

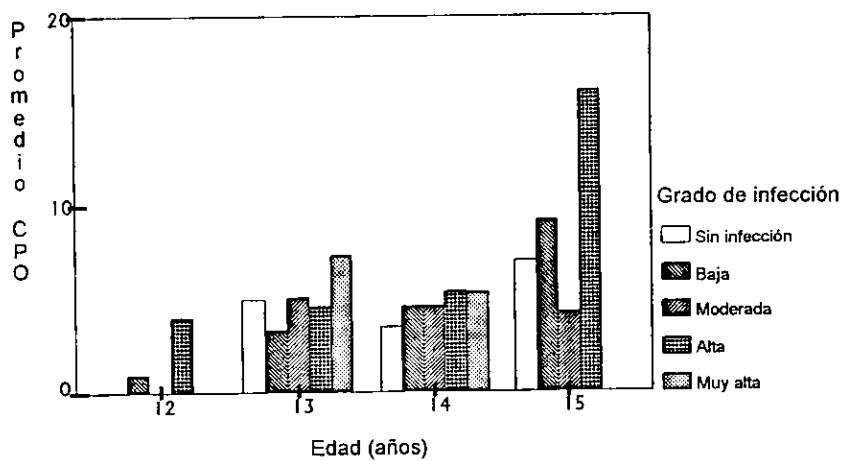
El título de anticuerpos IgA en saliva se determinaron por el método de ELISA, el índice CPO (o DMFT) se levanto por dos odontólogos.

Variable	Promedio	Desviación estándar	Casos
Edad	13.5362	0.7164	138
Dientes examinados	27.4604	1.5523	139
Dientes cariados	4.2086	4.8267	139
CPO	4.8058	4.7638	139
IgA	0.09696	0.13332	139

Tabla 9. Promedios y desviaciones estándar de edad, título de anticuerpos y para DMFT

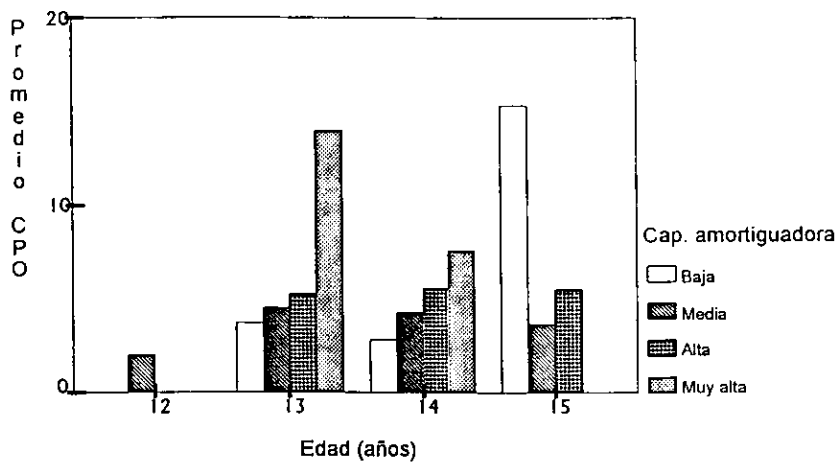


Gráfica 2. Promedio CPO por cada grupo de edad.

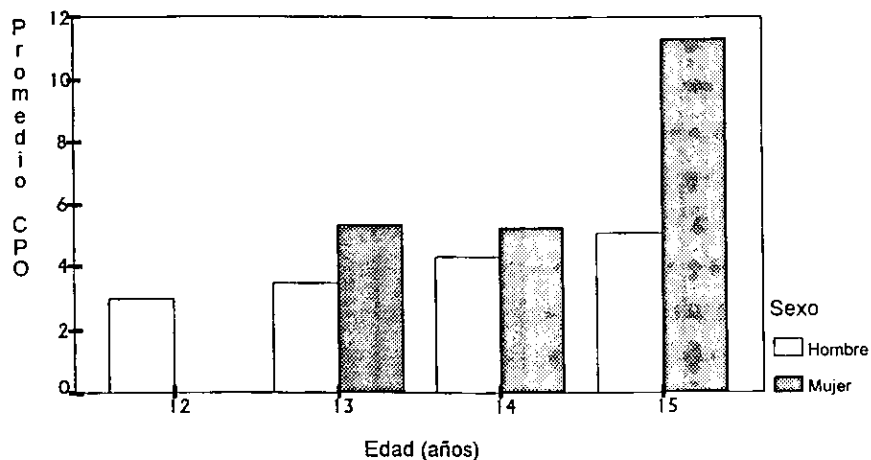


Gráfica 3. Promedio CPO por edad (agrupando por grado de infección)

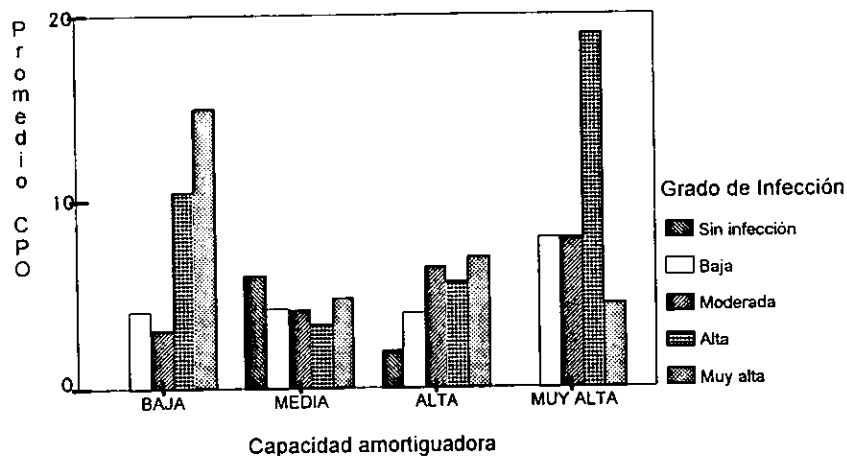




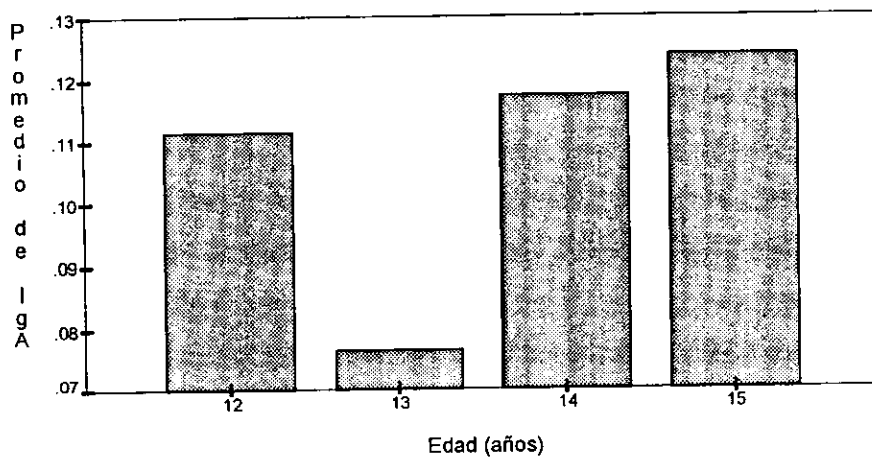
Gráfica 4. Promedio CPO por edad (agrupando por capacidad amortiguadora)



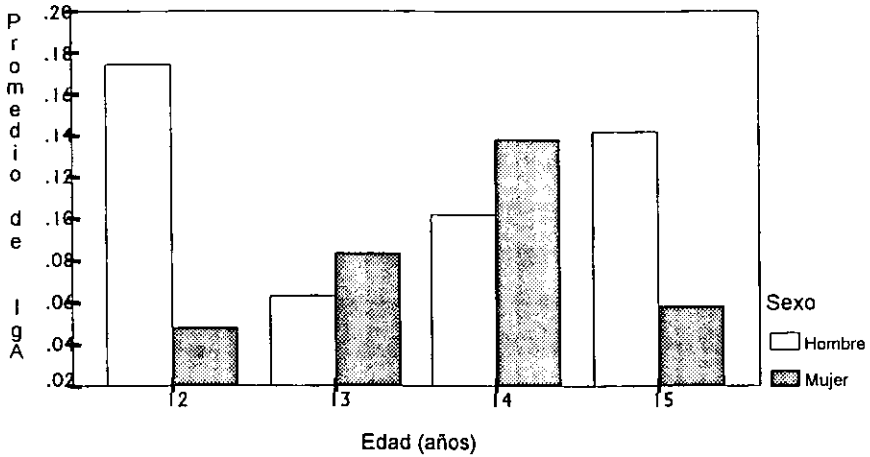
Gráfica 5. Promedio CPO por edad (agrupando por sexo)



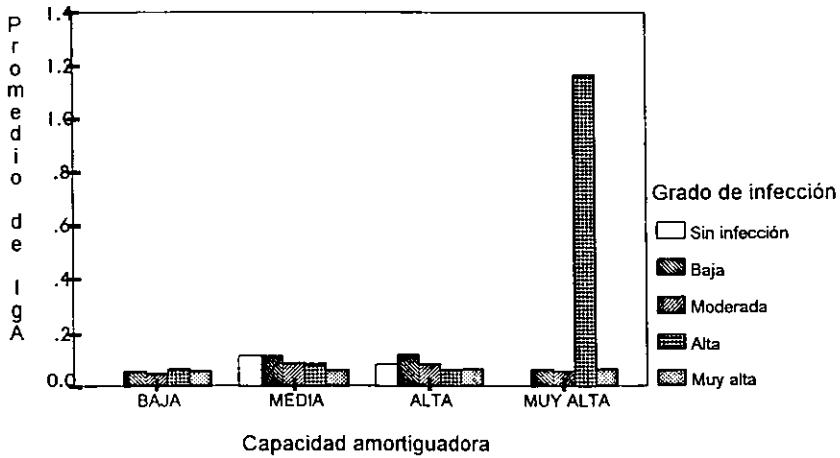
Gráfica 6. Promedio CPO por capacidad amortiguadora (agrupando por grado de infección)



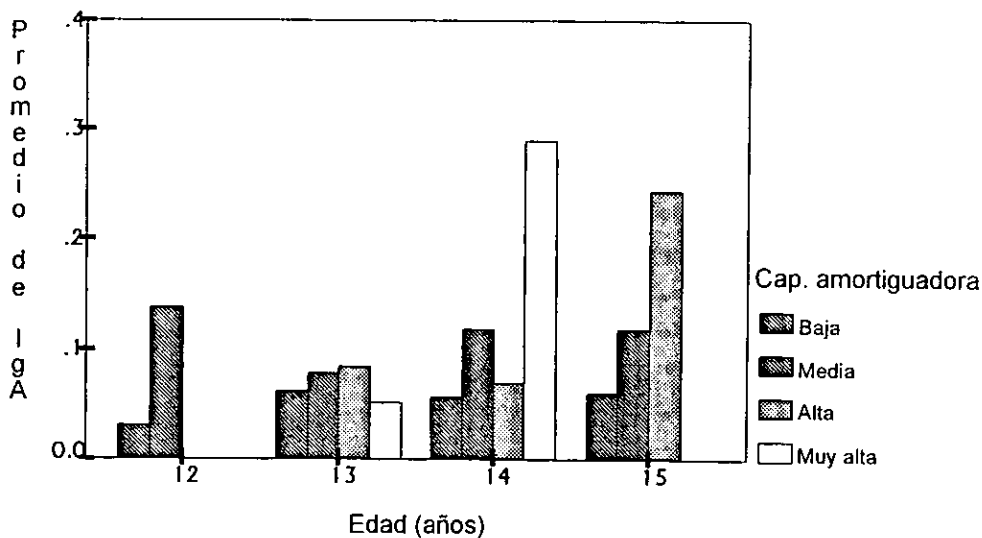
Gráfica 7. Promedio del título de anticuerpos por edad.



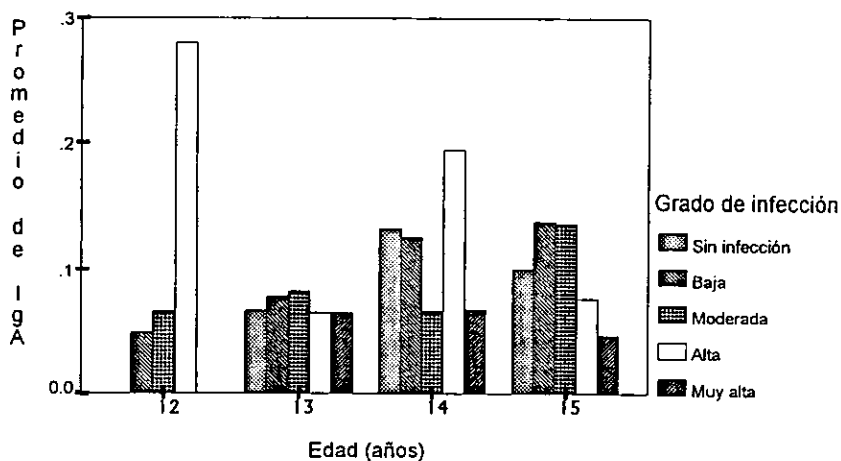
Gráfica 8. Promedio del título de anticuerpos por edad (agrupando por sexo)



Gráfica 9. Promedio del título de anticuerpos por capacidad amortiguadora (agrupando por grado de infección)



Gráfica 10. Promedio del título de anticuerpos por edad (agrupando por capacidad amortiguadora)



Gráfica 11. Promedio del título de IgA por edad (agrupando por grado de infección)

### Prueba H o prueba de Kruskal-Wallis

Se determinó el título de anticuerpos por el método de ELISA. Se realizó una correlación entre el índice CPO, para determinar si existían diferencias entre los grupos de edad, sexo, capacidad amortiguadora, grado de infección y título de IgAs. La capacidad amortiguadora y el grado de infección de la saliva se evaluó por el personal que levantó el índice CPO.

Correlación				
Variable	Grupo	$\chi^2$	G. L.	p
Capacidad amortiguadora	Edad	3.0542	3	0.3833
	Sexo	0.0858	1	0.7696
Grado de infección	Edad	1.1137	3	0.7738
	Sexo	0.1439	1	0.7044
CPO	Edad	3.9330	3	0.2688
	Sexo	1.5938	1	0.2068
IgA	Edad	0.6125	3	0.8936
	Sexo	0.2189	1	0.6399

Tabla 10. Correlación entre variables asociadas con el desarrollo de caries dental (Capacidad amortiguadora, grado de infección, título de anticuerpos) y la prevalencia de caries dental (CPO) por edad y sexo.

Correlación				
Variable	Grupo	$\chi^2$	G. L.	p
CPO	Capacidad amortiguadora	4.0212	3	0.2592
	Grado de infección	3.0257	4	0.5535
IgA	Capacidad amortiguadora	8.6477	3	0.0344
	Grado de infección	3.2626	4	0.5149

Tabla 11. Correlación entre el índice CPO y el título de anticuerpos por la edad y la capacidad amortiguadora.

Correlación				
Variable	Grupo	$\chi^2$	G. L.	p
Grado de infección	Capacidad amortiguadora	2.9639	3	0.3972
	IgA	63.748	69	0.656
CPO	IgA	77.905	69	0.217

Tabla 12. Correlación entre el grado de infección por la capacidad amortiguadora y el título de anticuerpos, correlación entre el índice CPO y el título de anticuerpos.

Un valor de p mayor a 0.05 se considera como no significativo.

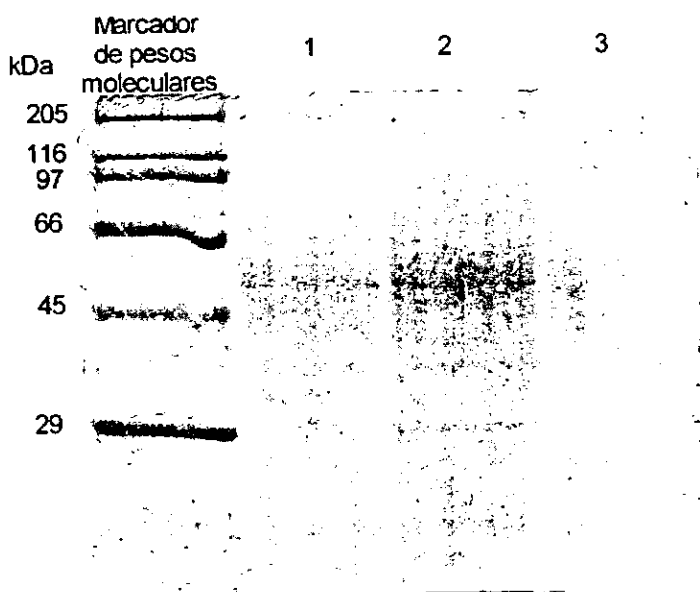


Fig. 21. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del antígeno I/II purificado en DEAE-celulosa.

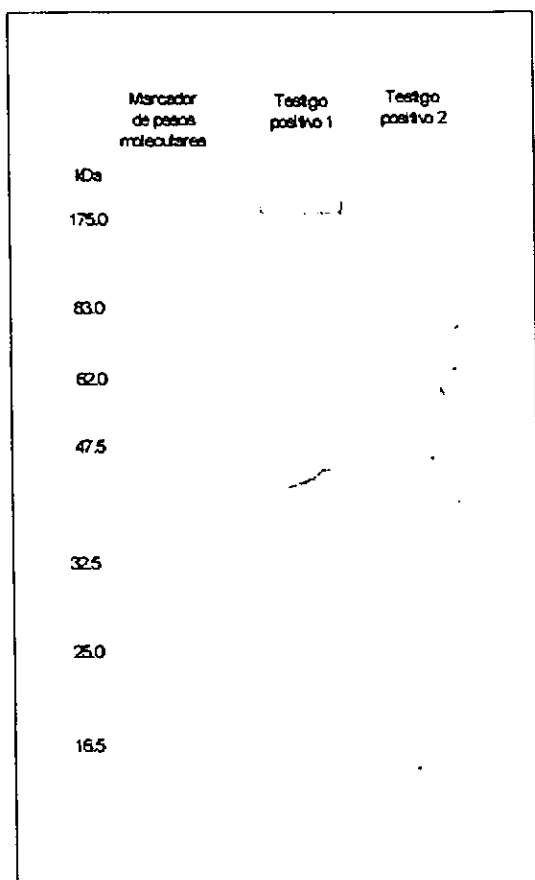


Fig. 22. Resultados de la inmunoelectrotransferencia para dos testigos (adultos) positivos a la infección con *Streptococcus mutans*.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

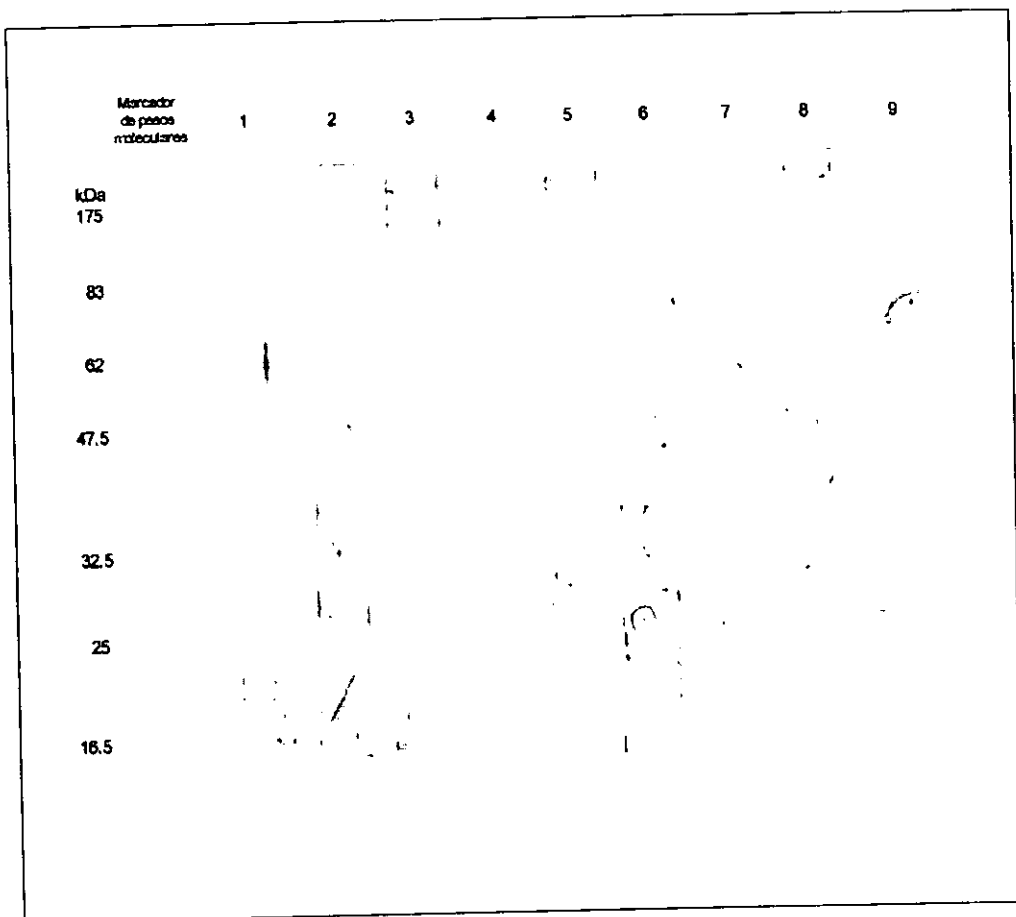


Fig. 23. Resultados de la inmunoelectrotransferencia para las muestras que presentaron títulos de anticuerpos altos contra *Streptococcus mutans* determinados por la técnica ELISA indirecto.



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal de éste trabajo fue determinar el título de anticuerpos IgA contra el antígeno I/II de *S. mutans*, y su influencia en el desarrollo y prevalencia de caries dental expresada como índice CPO (o DMFT), para llevarlo a cabo, se desarrollo un método efectivo para la purificación del antígeno I/II de *S. mutans*, estandarización del método de ELISA y la inmunoelctrotransferencia, además de la cuantificación IgA contra Ag I/II, en un grupo de adolescentes.

La estandarización de la técnica de ELISA y la inmunoelctrotransferencia se realizó con el antígeno purificado en el protocolo establecido, pues no se contaba con un estándar comercial, como testigos se utilizaron las salivas de dos adultos (un hombre y una mujer) infectados con *Streptococcus mutans*.

Se registró el estado de dentición de 139 adolescentes con edades entre 12 y 15 años, se calculó el índice CPO, se determinó la capacidad amortiguadora de la saliva y el grado de infección de *S. mutans*, además, se cuantificó el título de anticuerpos IgAs contra el Antígeno I/II de *S. mutans*, por el método de ELISA.

Los resultados obtenidos en las determinaciones anteriores se correlacionaron con la prueba de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia de 0.05, un valor mayor al nivel de significancia indica que no existe diferencia significativa debida a los grupos, contra la hipótesis de que sí existe diferencia significativa asociada a los grupos.

Para determinar como influyen las distintas variables en la prevalencia de caries dental, se consideró dentro de la correlación la edad, el sexo, la capacidad amortiguadora, el grado de infección de *S. mutans*, el título de anticuerpos IgAs contra el Ag I/II y CPO. Los resultados que se obtuvieron fueron:

- ❖ La correlación entre la capacidad amortiguadora y la edad, mostró que no existe diferencia significativa entre los grupos.
- ❖ La correlación entre la capacidad amortiguadora y el sexo no muestra diferencia significativa entre los grupos.
- ❖ La correlación entre el grado de infección de *S. mutans* determinado por el método de Matsubo y la edad no son estadísticamente diferentes.
- ❖ El título de anticuerpos IgAs determinados por el método de ELISA correlacionados con la edad, muestra que no es estadísticamente diferente en los grupos de edad.

- ❖ El título de IgA contra *S. mutans* no es estadísticamente diferente entre hombres y mujeres.
- ❖ La correlación entre el CPO y la edad no muestran diferencia estadística significativa.
- ❖ La correlación entre el CPO y el sexo no mostraron diferencia estadísticamente significativa.

La siguiente fase del análisis estadístico incluyó la correlación entre la prevalencia de caries dental y el título de IgAs contra el Ag I/II en función de la capacidad amortiguadora y el grado de infección de *S. mutans*, de aquí se observó:

- ❖ El grado de infección de *S. mutans* no es estadísticamente diferente en función de la capacidad amortiguadora.

Otras correlaciones de mucha importancia son como influyen la capacidad amortiguadora y el grado de infección en el desarrollo de caries dental y el título de anticuerpos IgAs contra el Ag I/II.

- ❖ El índice CPO no es influido por la capacidad amortiguadora y el grado de infección de *S. mutans*.
- ❖ Cuando se correlacionó el título de anticuerpos IgAs con la capacidad amortiguadora, se observó que si existe diferencia significativa en los grupos.
- ❖ De igual forma se observó que el título de anticuerpos IgAs contra el Antígeno I/II de *S. mutans* es diferente estadísticamente en función al grado de infección de *S. mutans*.
- ❖ La hipótesis que se planteó al inicio del proyecto suponía que la incidencia de caries, medida por el índice CPO, se modificaba en función del título de anticuerpos IgAs, sin embargo, la correlación no se encontró diferencia significativa entre la prevalencia de caries y el título de IgAs contra el Ag I/II.
- ❖ Además, podría suponerse que la presencia de anticuerpos IgAs contra el antígeno I/II de *S. mutans* disminuirían de manera sustancial el grado de infección, actuando como una especie de regulador, no obstante, la correlación no indica diferencia significativa entre el grado de infección de *S. mutans* y el título de anticuerpos IgAs contra el Ag I/II.

La técnica de ELISA, es muy específica en las reacciones antígeno-anticuerpo, sin embargo, para determinar la especificidad, se utilizó la inmunoelectrotransferencia, sólo para las muestras de saliva con títulos de anticuerpos de 0.2 en adelante determinados por ELISA se someterían al análisis (la elección fue arbitraria), resultando en el

tratamiento de 9 *blots*, de los cuales, las muestras que mostraron especificidad a la proteína de 185 kDa (Ag I/II) fueron: 3, 4, 5, 6, 8 y 9, mientras que la muestra 1 reaccionó a una proteína de aproximadamente 62 kDa, presentes en la purificación; las muestras 2, 7 y 9 presentan reacción a una proteína de aproximadamente 28.5 kDa.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, puede considerarse que:

La capacidad amortiguadora, el grado de infección de *S. mutans*, el título de anticuerpos IgAs contra el Ag I/II y el índice CPO no son diferentes con respecto a la edad, tampoco se encuentran variaciones significativas entre hombres y mujeres.

La capacidad amortiguadora no tiene influencia sobre el grado de infección de *S. mutans*, ni el índice CPO, sin embargo, el título de anticuerpos IgAs si es función de la capacidad amortiguadora, que puede atribuirse a la conservación de la molécula de IgAs. El título de anticuerpos IgAs es función del grado de infección con *S. mutans*.

Los parámetros como el grado de infección de *S. mutans* y la capacidad amortiguadora no predicen efectivamente la prevalencia de caries.

El desarrollo de caries dental y el grado de infección con *S. mutans*, no disminuyen significativamente cuando el título de anticuerpos IgAs aumenta.

El título de anticuerpos IgA contra el antígeno I/II de *S. mutans*, no predice efectivamente el estado de la dentición, por lo tanto, no es posible indicar si después de un proceso carioso, un individuo se encuentra protegido efectivamente contra recolonizaciones posteriores.

Puede afirmarse que la IgAs dirigida contra el antígeno I/II de *Streptococcus mutans* no tiene efecto protector por sí misma, contra la prevalencia de caries dental.

Los resultados para la inmunoelctrotransferencia indicaron que la respuesta en la mayoría de los casos es específica para el Antígeno I/II de *Streptococcus mutans*, sin embargo, existe reacción a proteínas de menor peso molecular presentes en el antígeno, aunque estas reacciones son menos frecuentes.

Es probable, que debido a los cambios fisiológicos presentes en la adolescencia, no se obtuvieran los resultados esperados; en esta etapa puede observarse que algunos individuos no han concluido el proceso de dentición; existen además varios cambios en aspectos higiénicos y alimenticios; que alteren notablemente el conteo de *S. mutans* y por lo tanto el título de anticuerpos IgAs.

Con los resultados obtenidos no puede concluirse definitivamente, que la IgA proteja contra los procesos cariosos.

## PROPUESTAS

Como se ha establecido previamente la caries dental es una enfermedad multifactorial, asociada a la presencia de varios microorganismos, en particular, *Streptococcus mutans*; una dieta rica en sacarosa, e higiene dental deficiente.

Investigaciones relacionadas, proponen que los grupos de estudio deben ser niños entre 5 a 7 años y adultos de 20 años en adelante, debido, a la dificultad en la interpretación de los resultados.

Ciertos investigadores<sup>30</sup> proponen obtener el título de anticuerpos IgG contra el antígeno I/II de *Streptococcus mutans* en suero, esto implica un problema extra, pues, pocos voluntarios estarían dispuestos a ser sangrados.

Se ha reportado el efecto protector de IgAs contra el establecimiento de *S. mutans* y el desarrollo de caries dental, por lo tanto, es necesario buscar las condiciones en que esta protección se da.

Las propuestas que ayudarían a mejorar este proyecto son:

- ❖ Debe considerarse la dieta, hábitos de higiene bucal y si se recibió tratamiento previo con antibióticos, que tiempo tiene.
- ❖ Realizar investigaciones por separado en grupos de niños y de adultos.
- ❖ Determinar cuando sea posible el título de IgG sérica contra *S. mutans*.
- ❖ Es posible que el verdadero efecto protector contra la caries dental se de en la infancia, por eso, es necesario contar con el estado de la dentición durante la niñez.

## ANEXO

Características bioquímicas y requerimientos nutricionales de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Manitol	+
Sorbitol	+
Glucosa	+
Salicina	+
Lactosa	+
Sacarosa	+
Trehalosa	+
Rafinosa	+
Manosa	+
Inulina	+
Maltosa	+
Glicerol	-
Arabinosa	-
Xilosa	-
Almidón	-

Tabla 13. Fermentación de carbohidratos por *Streptococcus mutans* ATCC 25175<sup>11</sup>.

PRUEBA	RESULTADOS
Leche Tornasol	Producción de coágulo y acidificación del medio
RM	Negativo
VP	Producción de acetoina Positiva
Hidrólisis de arginina	Negativa, solo hay acidificación del medio
Hidrólisis de urea	Negativa
Catalasa	Negativa
Resistencia a la bacitracina	Resistente
Sensibilidad a la optoquina	Resistente
Producción de glucano a partir de caldo sacarosa al 5%	Se forman acúmulos de bacterias alrededor del vidrio, apariencia de vidrio glaseado
Hemólisis	$\alpha$ (Solo hemólisis parcial, "hemólisis verdosa")
Hidrólisis de hipurato	Negativa
Hidrólisis de esculina	Negativa
Crecimiento en NaCl al 6.5%	Negativo
Crecimiento a 22 y 45 ° C	Negativo

Tabla 14. Otras pruebas bioquímicas para *Streptococcus mutans* ATCC 25175<sup>11</sup>.

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

### Solución salina 0.14 M fisiológica

Pesar por litro de cloruro de sodio

NaCl	8.5 g
------	-------

Diluir a 1 L con agua destilada para obtener una concentración 10X y diluir cuando se requiera.

Estérilizar en autoclave

### Amortiguador de Tris-HCl [Tris (hidroximetil)aminometano]

Tris	12.1 g
------	--------

HCl 1 M	cbp
---------	-----

Disolver Tris en 100 mL de agua destilada para preparar una solución stock 1.0 M. Titular al pH deseado con HCl, entonces diluir a la molaridad requerida.

### Amortiguador de barbituratos

Barbiturato de sodio	0.1 M	500.5 mL
----------------------	-------	----------

HCl	0.1 M	149.5 mL
-----	-------	----------

H <sub>2</sub> O destilada		350.0 mL
----------------------------	--	----------

Deberá añadirse merthiolate a una concentración final de 1:10,000. ( o azida de sodio al %)

## SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

REACTIVO A: Disolver 2.0 g de carbonato de sodio, 0.02 g de tartrato de sodio y potasio, disolver con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta 100 mL.

REACTIVO B: Pesar 0.5 g de sulfato cúprico y disolverlo a 100 mL con agua.

REACTIVO C: Mezclar 50 mL de A y 1 mL de B.

REACTIVO D: Reactivo de fenol Folin-Ciocalteu

## SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR EL MÉTODO DE ELISA

### Amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato pH 9.6)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59 g
---------------------------------	--------

NaHCO <sub>3</sub>	2.93 g
--------------------	--------

Llevarlo a 1 litro de agua bidestilada. Puede almacenarse a 4 °C por no más de dos semanas.

### PBS (amortiguador de fosfatos pH 7.4)

NaCl	8.0 g
------	-------

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
---------------------------------	-------

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O	2.9 g
---	-------

KCl	0.2 g
-----	-------

Disolver hasta completar a 1 litro con agua bidestilada, el pH es de 7.4, almacenar a 4 °C.

### PBS-tween. Solución de lavado (amortiguador de fosfatos-tween pH 7.4)

NaCl	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	2.9 g
KCl	0.2 g
Tween 20	0.5 mL

Disolver hasta completar a 1 litro con agua bidestilada, el pH es de 7.4, almacenar a 4 °C.

**ANTÍGENO:** Para sensibilizar la placa (a una concentración de 1.0 mg/mL en solución salina).

**NOTA:** Para cada sistema se debe probar la concentración óptima, haciendo diluciones)

Solución de bloqueo para ELISA (albúmina sérica bovina al 3%)

Disolver 3.0 g de albúmina sérica bovina en 100 mL de PBS, agitar suavemente evitando la formación de burbujas.

Buffer de sustrato para peroxidasa de rábano (pH 5.0)

Ácido cítrico 0.1 M	24.3 mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.2 M	25.7 mL

Esté amortiguador se prepara justo antes de su uso.

Sustrato para peroxidasa de rábano

Buffer de sustrato	100 mL
o-fenilendiamina	40.0 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	40.0 µL

**NOTA:** Debido a que el sustrato es sensible a la luz se prepara justo antes de su uso.

## ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Solución A. Solución de monómeros (30%)

Acrilamida	29.0 g
Bisacrilamida	1.0 g

Disolver en 50 mL de agua bidestilada y aforar a 100 mL. Almacenar a 4 °C en la oscuridad en un frasco ámbar.

Solución B. Regulador para el gel de corrimiento 4X (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8)

Tris	36.3 g
------	--------

Disolver en un volumen pequeño ajustar el pH a 8.8 con HCl aforar a 200 mL con agua bidestilada.

Solución C. Regulador para el gel de empaquetamiento 4X (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8)

Tris	3.0 g
------	-------

Disolver en un volumen pequeño ajustar el pH a 6.8 con HCl aforar a 200 mL con agua bidestilada.

Solución D. SDS (dodecilsulfato de sodio) al 10%

SDS	50.0 g
-----	--------

Disolver con agua bidestilada hasta completar un volumen de 500 mL



Solución E. Iniciador Persulfato de amonio (APS)

Persulfato de amonio	0.5 g
----------------------	-------

Diluir en 5 mL de agua bidestilada.

**NOTA:** Se recomienda preparar en el momento de uso, es ideal pesar 100 mg y diluir en 1 mL de agua bidestilada.

Solución F. Sobrecapa para el gel de corrimiento (Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%)

Tris	25 mL de la solución B
SDS	1 mL de la solución D

Diluir con agua bidestilada hasta completar 100 mL.

Solución G. Regulador para tratamiento (Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS al 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol al 10%)

Tris	2.5 mL de la solución C
SDS	4.0 mL de la solución D
Glicerol	2.0 mL
2-mercaptoetanol	1.0 mL

Diluir con agua bidestilada hasta completar un volumen de 10 mL.

Solución H. Regulador de desarrollo (Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%)

Tris	12.0 g
Glicina	57.6 g
SDS	40 mL de la solución D

Completar el volumen hasta 4 L con agua bidestilada.

Solución I. Colorante (Azul de Coomassie R-250 al 1%)

Azul de Coomassie R-250	
-------------------------	--

Disolver con agua bidestilada hasta completar 200 mL.

Solución J. Colorante (Azul de Coomassie R-250, 0.125%, metanol 50%, ácido acético 10%)

Azul de Coomassie R-250	62.5 mL de la solución I
Metanol	250 mL
Ácido acético	50 mL

Disolver hasta completar un volumen de 500 mL con agua bidestilada.

Solución K. Solución decolorante 1 (metanol 50%, ácido acético 10%)

Metanol	500 mL
Ácido acético	100 mL

Completar el volumen con agua bidestilada hasta completar 1000 mL.

Solución L. Solución decolorante 2 (metanol 5%, ácido acético 7%)

Metanol	700 mL
Ácido acético	500 mL

Disolver con agua bidestilada hasta completar 10 L.

## INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

**Buffer de transferencia** (para proteínas de peso molecular entre 20,000-400,000 kDa)

	Concentración	para 1000 mL
Tris	50 mM	5.8 g
Glicina	380 mM	29.0 g
SDS	0.1% (p/v)	1.0 g
Metanol	20.0 %	200 mL

Se lleva hasta 1000 mL (o 1 L) con agua bidestilada.

**Solución colorante.** Solución concentrada al 2% de Rojo de Ponceau (Solución stock)

Rojo de Ponceau	2.0 g
Ácido tricloroacético	30.0 mL
Ácido sulfosalicílico	30.0 g

Completar el volumen hasta completar 100 mL con agua bidestilada.

**NOTA:** Para preparar la solución de trabajo realizar una dilución 1:10 hasta el momento de su uso.

**Buffer de detección:** 3,3'-diaminobencidina (DBA)

3,3'-diaminobencidina	6.0 mg
PBS	10.0 mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30 %	10.0 µL

**NOTA:** Esta solución se prepara hasta el momento de su uso. Eliminar lo que no se utilizó.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA**  
**HOJA DE REGISTRO PARA INDICES CPO, CPOS, Ceo y Ceos**

Fecha \_\_\_\_\_ Nombre \_\_\_\_\_  
 Escuela \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_  
 Grado \_\_\_\_\_ Grupo \_\_\_\_\_ Sexo (M=1, F=2) \_\_\_\_\_  
 Examinador \_\_\_\_\_ Número de registro \_\_\_\_\_  
 Grado de infección \_\_\_\_\_ Capacidad amortiguadora \_\_\_\_\_

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	
DERECHO	55	54	53	52	51	61	62	63	64	65	IZQUIERDO				
	85	84	83	82	81	71	72	73	74	75					
	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	

Código:

- 0 Sano
- 1 Cariado
- 2 Obturado con caries
- 3 Obturado
- 4 Perdido por caries
- 5 Perdido por otras razones
- 6 Sellador
- 7 Prótesis
- 8 No erupcionado
- 9 Excluido

## REFERENCIAS

1. Abramovich A. Histología y embriología dentaria. Ed. Mundi. Argentina: 1984: 1-15, 90-91
2. Diamond A. Anatomía dental. 2a edición. LIMUSA. México: 1992: 1-4, 34,39-48
3. Mjör I A, Fejerskov O. Embriología e histología oral humana. Salvat Editores. México 1990. 43-47, 84
4. Gorlin R J, Goldman H M. Patología oral. Salvat Editores. Barcelona: 1979: 64-266
5. Takahashi I, Okahashi N, Matsushita K, Tokuda M, Kanamoto T, Munekata E, Russell M W, Koga T. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. J Immunol 1991; 146:332-336
6. Hamada S, Slade H D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44:331-384.
7. Aaltonen A S, Tenovuo J, Lehtonen O P. Antibodies to the oral bacterium *Streptococcus mutans* and the development of caries in children in relation to maternal dental treatment during pregnancy. Arch Oral Biol 1988; 33(1):33-39
8. Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico de Salud Bucal, México: Jefatura de Servicios de Medicina Familiar, Subdirección General de Médica 1984.
9. Loesche W J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986; 50:353-380.
10. Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Okahashi N, Koga T. Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype c. J Gen Microbiol 1989; 135: 335-344
11. Coykendal A L. Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status, based on their molecular composition. Int J Syst Bacteriol 1977; 27(1): 26-30
12. Tenovuo J, Lehtonen O P, Aaltonen A S. Caries development in children in relation to the presence of mutans streptococci in dental plaque and of serum antibodies against whole cells and protein antigen I/II of *Streptococcus mutans*. Caries Res 1990; 24:59-64
13. Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutans of *Streptococcus mutans* serotype c. Infect Immunol 1990; 58: 289-296
14. Oho T, Shimazaki Y, Mitoma M, Yoshimura M, Yamashita Y, Okano K, Nakano Y, Kawagoe H, Fukuyama M, Fujihara N, Koga T. Bovine milk antibodies against cell surface protein antigen PAc-Glucosyltransferase fusion protein suppress cell adhesion and alter glucan of *Streptococcus mutans*. J Nutr 1999; 129: 1836-1841
15. Borgström M K, Sullivan A, Granath L, Nilsson G. On the pH-lowering potential of lactobacilli and mutans streptococci from dental plaque related to the prevalence of caries. Community Dent Oral Epidemiol 1997; 25: 165-169

31. Paul W E. Fundamental immunology. 2nd edition. New York: Raven Press Ltd, 1989: 209-233
32. Roitt I. Fundamental immunology. 8th edition. London: Blackwell Scientific Publications, 1994.
33. Rose N R. El laboratorio en inmunología clínica, 2ª edición, Ed. Médica-Panamericana. Buenos Aires: 1984: 414-421
34. Harlow E, Lane E. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1988, USA, 471-501, 637-657
35. World Health Organization: Oral health surveys, basic methods. Geneva: WHO, 1997
36. Slots J, Taubman M A. Contemporary oral microbiology and immunology. St Louis: Mosby Year Book. 1992: 524-532
37. Torres A R, et al. Stationary phase for the purification of protein by ion-exchange displacement chromatography. Anal Biochem 1985; 144:469-473
38. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. J Biol Chem 1951; 193:265-
39. Matsubo. A semiquantitative determination of *Streptococcus mutans* using its adherent ability in a selective medium. Caries Res 1981; 14:40-45
40. Matsushita K, Nisizawa T, Nagaoka S, Kawagoe M, Koga T. Identification of antigenic epitopes in a surface protein antigen of *Streptococcus mutans* in humans. Infect Immun 1994; 62(9): 4034-4042
41. Burnette W N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 1981; 112: 195-203
42. Dunbar B S. Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques. New York. Plenum Press, 1987: 67-76
43. Freund J E, Simon G A. Estadística elemental. 8ª edición. Prentice Hall, México 1994:494-495
44. Gómez del Río I. Dental caries and mutans streptococci in select groups of urban and native indian schoolchildren in Mexico. Community Dent Oral Epidemiol 1991; 19:98-100
45. Koga T, Asakawa H, Okahashi N, Takahashi I. Effect of subculturing on expression of a cell-surface protein antigen by *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 1989; 135:3199-3207
46. Koneman E W, y cols. Diagnóstico microbiológico. 3a. edición. Médica-Panamericana. Buenos Aires: 1992: 259-261
47. Russell M W, Challacombe S J, Lehner T. Specificity of antibodies induced by *Streptococcus mutans* during immunization against dental caries. Immunology 1980; 40: 97-106
48. Schaeken M J M, Van Der Hoeven J S, Franken H C M. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. J Dent Res 1986; 65(6): 906-908
49. Skerman V B D, McGowan V, Sneath P H A. Approved lists of bacterial names. Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420