



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Uso de la saliva para diagnóstico
de enfermedades sistemicas

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

Hernández Piña José Luis

Directora : Mtra. Beatriz C. Aldape Barrios

México, D.F.

Abril 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

A mis padres,

Por su fe, su amor y por enseñarme el difícil hábito de hacer mucho con poco

Para Agustín

Por su presencia invisible en todo lo visible de mi vida

A mis primos, por ser mis mejores amigos

Para Alexis, por la alegría de su presencia y por ser mi mejor amigo

A Laura García, por su gran amistad y su risa

A Carla Alfallo, por nunca dejarme caer

A Mirna Baltasar, por los buenos momentos y compartir el mismo sueño

Al Seminario de Patología Bucal, por su invaluable ayuda en la recta final

A la UNAM, por hacer de mi el hombre que soy.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Herrera Diana Jose
Luis

FECHA: 12/04/04

FIRMA: Kelvy Pérez Es-Lis.

Índice

Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	2
1.1 Saliva y diagnóstico.....	3
1.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	4
1.3 Inmunofluorescencia.....	8
1.4 Prueba de detección de anticuerpos.....	10
1.5 Justificación.....	14
1.6 Planteamiento del problema.....	15
2. Diagnóstico de caries.....	16
2.1 Saliva y su relación con gingivitis.....	17
2.2 Citometría de flujo para determinar gingivitis.....	18
2.3 Determinación de <i>Helicobacter pylori</i>	19
2.4 Diagnóstico de enfermedad de Chagas.....	20
2.5 Diagnóstico de Dengue.....	24
2.6 Diagnóstico de VIH.....	26
2.7 Diagnóstico de cólera.....	28
2.8 Diagnóstico de parotiditis.....	30
2.9 Saliva para detectar factores criogénicos.....	33
2.10 Detección de virus del herpes tipo 8.....	34
2.11 Detección del virus Epstein-Barr.....	35
2.12 Detección del virus de la hepatitis C.....	37
2.13 Diagnóstico de síndrome de Sjögren.....	39
2.14 Uso de cromatografía de flujo para determinar la relación de cáncer Bucal y la nuez de areca.....	41
2.15 Uso del sensor amperométrico de flujo para el diagnóstico.....	43
2.16 Uso de la cromatografía líquida para determinar ácido úrico.....	44
3. Conclusiones.....	46
4. Referencias.....	47



Introducción

En los últimos veinte años se ha demostrado cómo la saliva ha tomado un papel relevante en la investigación. Actualmente gracias a nuevas técnicas micro analíticas, es posible utilizar la saliva no solo como un auxiliar de diagnostico clínico, sino también en el monitoreo de drogas y fármacos.

Reconociendo la importancia de la misma como un fluido de diagnostico, la industria privada, apoya y recomienda maximizar el potencial de este fluido para el uso de la investigación, a fin de extender la investigación en saliva.

No obstante, hay que considerar que las variaciones en el flujo y la composición de la saliva total se han estudiado por muchos años, en un intento auxiliar en el diagnostico de enfermedades sistémicas y de glándulas salivales.

Se ha comprobado la existencia de factores que influyen en la variación del mismo, como las características individuales de cada sujeto: genero, edad, la nutrición, los hábitos, o los factores genéticos; todos ellos influyen de forma importante.

Las modificaciones en el flujo salival de la población se pueden asociar a factores socioeconómicos, situación geográfica y racial, así como otros factores no controlables como emocionales y psicológicos.

Hoy en día, cuando nuevas técnicas micro analíticas cuantitativas y cualitativas se han vuelto disponibles, se han aumentado la información que sugiere que los estudios del flujo y la composición salival serán de gran utilidad no solo en el diagnostico y pronostico, para el mejor entendimiento de otras enfermedades sistémicas y su tratamiento.¹



1. Antecedentes

La saliva es una secreción importante en el mantenimiento de las homeostasis de la cavidad bucal se requiere para: mantener sanos los tejidos duros y blandos de la boca, en la regulación de la flora bacteriana bucal y para realización de funciones como masticar y deglutir.

La importancia de este fluido en el mantenimiento de la cavidad bucal es mejor apreciada si se consideran la variedad y la complejidad de sus funciones.

La primera y más conocida es la de lubricación ya que al cubrir las mucosas protege contra la irritación térmica, mecánica y química, ayuda a hablar, deglutir, formar el bolo alimenticio y permitir que éste se desplace fácilmente a través del sistema digestivo con una mínima fricción.²

La saliva es secretada por tres glándulas mayores, que son la glándula parotida, sublingual y submaxilar; por una gran cantidad de glándulas salivales menores, que son las linguales, las labiales, bucales y palatinas, cuyas secreciones difieren en composición y cuyas contribuciones a la mezcla de la saliva presente en la boca varía según su composición.^{3,4}

La saliva participa en el mantenimiento de las mucosas debido a que la mucina que contiene posee propiedades como: baja solubilidad, viscosidad, elasticidad y adhesividad, que permite que se concentre sobre las superficies de las mucosas proporcionando una barrera efectiva contra la desecación y los factores ambientales.^{5,6}

La saliva cuenta con acciones antimicrobianas, antimicóticos y antivirales debido a que contiene proteínas como inmunoglobulinas (IgA); lactoperoxidasa, lisosoma, lactoferrina que esta fija en hierro y es bacteriostática ayudando al control de la microflora bucal.



Participa en la digestión debido a la presencia de las enzimas como la amilasa y lipasa, interviene en la sensación gustativa al actuar como solvente y interacciona los alimentos con las papilas gustativas.^{2, 6}



Fig.1 glándula submandibular

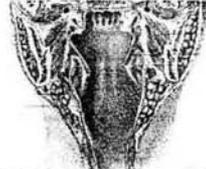


Fig.1- 2. Glándula parotida, pared posterior de la faringe

Fuente: Velayos J. Anatomía de la Cabeza. Ed. Panamericana.1998

1.1 Saliva y diagnóstico

La saliva humana es fluido corporal ideal, consiste en una mezcla de fluidos que incluye secreciones de las glándulas salivales, junto con los elementos de origen no salivales derivados del fluido crevicular gingival, secreciones pulmonares, bacterias, productos bacteriales, virus y restos de alimentos, la composición de la saliva refleja los niveles de fluido tisular, hormonal y moléculas inmunológicas. Por lo tanto, la saliva humana tiene un gran potencial como fluido de diagnóstico para la detección de diferentes componentes biológicos tales como electrolitos, enzimas, hormonas drogas y anticuerpos en humanos y en veterinaria.

Los componentes de la saliva puede actuar para medir cuantitativamente las exposiciones químicas y las dosis biológicas efectivas, cuando hay signos de advertencia tempranos, de un efecto biológico y pueden ser usados en evaluar la contribución de tóxicos en problemas de salud severos, incluyendo, asma y otras enfermedades respiratorias, desarrollo neurotóxico, cáncer infantil y alteraciones endocrinas.

La saliva es un espécimen apropiado en psicología, medicina del deporte, farmacología, pediatría, medicina y otros campos de la ciencia, por lo tanto



analizar los componentes de la saliva y el papel que juegan en la salud y la enfermedad son esenciales para desarrollar una prueba de diagnóstico salival que sea precisa. La estrategia obvia para mejorar el potencial de diagnóstico preciso en una prueba, es crear una relación funcional entre los componentes de la saliva y la actividad de una enfermedad, la área más prometedora en la investigación de la saliva es la aplicación de tecnología portable de diagnóstico para detectar y analizar diferentes moléculas analíticas de la misma.⁷

1.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Desde que Watson y Crick publicaron el modelo de la doble hélice de ácido desoxirribonucleico (ADN), se ha producido una verdadera revolución que a llevado a crear rama de la ciencia, la Biología Molecular, cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros y se exprese en los nuevos individuos, es decir, aquellos procesos celulares en los que participan los ácidos nucleicos, por lo tanto utiliza varias herramientas y técnicas para su estudio.

Los ácidos nucleicos son el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), se consideran como polímeros de alto peso molecular, y se localizan principalmente en el núcleo de las células.

Están constituidos por nucleótidos formados por una molécula de azúcar (ribosa para el ARN y desoxirribosa para el ADN), una base orgánica nitrogenada (adenina, guanina, citosina y timina para el ADN y adenina, guanina, citosina y uracilo para el ARN), y un grupo fosfato, el ADN es una estructura de forma helicoidal constituida por dos cadenas complementarias entre si; en la parte externa se localizan las moléculas de azúcar-fosfato y en la parte central se encuentran las bases orgánicas nitrogenadas unidas las de una cadena con las de la otra, a través de puentes de hidrogeno, lo que da así estabilidad a la doble hélice.



El ADN regula la naturaleza y composición de las células, transmite la información hereditaria, determina la estructura de las proteínas y a través de enzimas controla el resto de las funciones celulares.

Estas actividades las llevan a cabo al realizarse una copia del fragmento de la molécula o de toda, ya sea que requiera las síntesis de una proteína o la transmisión de la información genética de la célula.

Para que ambas situaciones se lleven a cabo eficientemente, las dos cadenas de ADN deben separarse, todas las enfermedades genéticas y algunas no heredadas se asocian a cambios en la molécula de ADN; estos padecimientos se pueden analizar en términos moleculares, con que, eventualmente, algunas podrán ser tratadas o curadas al detectarse el defecto que exista.

La reacción en cadena de polimerasa o PCR (de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), fue descubierta en 1985 por Kary Mullis en el laboratorio de Cetus Corporación, California, USA, lo que le representó el premio Nobel en 1993, su nombre lo debe a que la actividad de la enzima ADN polimerasa permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente.

Es una técnica empleada en biología molecular que permite la copia "in vitro" de fragmentos específicos de ADN; consiste en la separación por calor de las dos cadenas de ADN conocidos como cebadores (primers o iniciadores), que están constituidos de 10 a 30 nucleótidos e indican el inicio y el final del fragmento a duplicar.

Mediante la acción de una enzima denominada ADN polimerasa, se van agregando en forma complementaria los nucleótidos necesarios para obtener una réplica exacta de la cadena original, este procedimiento se repite varias veces y se obtienen múltiples copias del fragmento de ADN escogido.



Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio (adenina, guanina, citosina y timina), cebadores, ADN original y la enzima DNA polimerasa.

Debido a que para el desarrollo de la técnica se emplean temperaturas mayores de 70°, se requiere de una enzima que no se inactive a temperaturas elevadas, por lo que se emplea la DNA polimerasa de la bacteria "thermus aquaticus" que vive en aguas termales y cuya enzima puede trabajar a altas temperaturas.

La reacción en cadena de polimerasa se desarrolla en tres etapas:

1ª. Desnaturalización de ADN. Por medio de la aplicación de calor a 94°C, se produce la separación de las dos cadenas de la molécula de DNA que se quiere amplificar. Al romperse los enlaces de hidrógeno, cada cadena actúa como molde para fabricar su complementaria.

2ª Hibridación con cebadores: La temperatura se disminuye rápidamente a 55° C, para lograr que los cebadores o primers "reconozcan" sus secuencias complementarias en las cadenas de DNA correspondientes y se unan con ellas. Los primers no deben ser complementarios entre sí y deben corresponder a los extremos del fragmento del DNA que se quiere amplificar.

3ª. Extensión con Taq polimerasa.: para esta etapa, la temperatura se eleva a 72° C, con lo que la taq polimerasa agrega los diferentes nucleótidos complementarios siguiendo el orden de la cadena que sirve de molde.

El proceso se repite un número determinado de veces o ciclos, generalmente 30, y se consigue un aumento o amplificación exponencial del número de copias del fragmento de ADN que sirvió como molde. Una ventaja de la técnica es que amplifica únicamente el fragmento de ADN que se requiere, aunque esté en cantidades mínimas (alta sensibilidad) o en presencia de grandes cantidades de ADN semejantes (alta especificidad), la reacción es eficaz incluso si se parte de



muestras de ADN muy poco purificadas, es decir, que se encuentran en presencia de otros componentes, una vez amplificada la molécula del DNA que se desea, se coloca la muestra en gel de poliacrilamida, en el que se agrega azul de bromofenol que nos permitirá visualizar cómo la muestra corre a través del gel, para lo que se emplea corriente eléctrica a 100 mV, durante 30 a 40 minutos. De acuerdo con el tamaño de la molécula de ADN, será la distancia que correrá en el gel; posteriormente este se tiñe con bromuro de etidio que permite visualizar la extensión en forma de bandas con el empleo de luz ultravioleta.

La banda obtenida se compara con un marcador de peso molecular para poder establecer su tamaño y así verificar si corresponde al fragmento que se busca o se puede correr al mismo tiempo que un control conocido y establecer comparaciones entre ambas bandas. El material biológico a partir del cual se pueden obtener muestras para el análisis del DNA es múltiple e incluye sangre, saliva, piel, semen, cabellos, material de biopsia, o puede conseguirse a partir de los instrumentos utilizados para la recolección de las muestras como son cotonetes o cepillos.

La PCR se aplicó inicialmente como una técnica de laboratorio de investigación, pero su gran especificidad y sensibilidad ha permitido el desarrollo de técnicas específicas basadas en ella con aplicación en muchos campos de la investigación y el análisis.

Así, se ha convertido en una herramienta fundamental en campos tan diversos como la investigación (clonación de genes, detección de clones recombinantes, estudio de ADN de fósiles), medicina forense y criminalística (determinación de paternidad, identificación de individuos y de sospechosos, así como en el análisis de la evidencia en casos de asesinato, violación, etc.), sanidad animal y mejora genética (detección de enfermedades genéticas e infecciosas, pureza de razas, etc.) y medicina (diagnóstico de enfermedades), en esta última, la PCR se encuentra en un amplio campo de investigación y desarrollo, por lo que se ha empleado en la exploración de enfermedades genéticas como en casos de



anemia de células falciformes, fibrosis quística, distrofia miotónica y el Síndrome del cromosoma X frágil, además se ha utilizado para el diagnóstico prenatal, creación de mapas genéticos y en el esperma aneuploide.

También se ha utilizado para realizar la subtipificación de neoplasias, para vigilar la respuesta al tratamiento y en la detección de las recurrencias o de recaídas tempranas (se menciona que tiene una sensibilidad para detectar una sola célula tumoral entre un millón de células sanas), lo que permite establecerán pronóstico de la enfermedad.

Dentro de este campo, también se ha utilizado para el estudio de la estructura y expresión de los oncogenes, y para detectar el reordenamiento de tumores humanos con anomalías del cariotipo, así como de anomalías de la expresión genética en ausencia de alteraciones del cariotipo. La técnica de la PCR presenta ventajas sobre las técnicas convencionales de diagnóstico debido a que tiene una mayor sensibilidad y especificidad, presenta un menor número de falsos positivos y negativos, emplea un tiempo mucho menor para obtener los resultados y puede utilizarse en todas las ramas de la medicina.⁸

1.3 Inmunofluorecencia

El empleo de la inmunofluorecencia indirecta para la determinación de anticuerpos séricos o el reconocimiento de inmunoglobulinas en tejidos ha sido internacionalmente aceptado.

La presencia de anticuerpos contra distintos componentes nucleares ha sido encontrada en enfermedades del tejido conectivo como Lupus Eritematoso Sistémico (95%), Esclerodermia (73%), Sjögren (50%), Artritis Reumatoide (20%), Hepatitis Crónica Autoinmune (50%), Cirrosis Biliar Primaria, los primeros hallazgos de anticuerpos anti-DNA (ácido desoxirribonucleico, ADN) nativo doble cadena (nDNA), presentes en el suero de los pacientes con LES (Lupus Eritematoso Sistémico) se produjeron en 1957.



Desde ese momento se ha acumulado una cantidad de evidencias que demuestran que los anticuerpos anti-nDNA son prácticamente específicos de LES en actividad, generalmente con compromiso renal, se supone que los complejos inmunes producidos por los autoanticuerpos anti nDNA están involucrados en la patogenia de los casos graves de LES, se ha determinado que los anticuerpos anti-nDNA ocurren en el 66% de los pacientes con LES, generalmente asociados a fases agudas de la enfermedad.

Los anticuerpos anti-nDNA no tienen especificidad de especie o de órgano, el equipo de inmunofluorescencia nDNA utiliza como sustrato improntas de "Crithidia luciliae" que poseen un quinoplasto (mitocondrion), este hemoflagelado presenta una importante cantidad de DNA nativo, doble cadena, concentrado en el quinoplasto, que normalmente se ubica entre el núcleo y la base del flagelo. Este método fue desarrollado por Aarden en 1975 se basa en la alta concentración de nDNA que contiene el kinetoplasto de la C. luciliae. Estudios de Deegan. (1978) permitieron comparar la técnica IFI con la técnica de RIA.

Tanto el RIA como el ELISA brindan resultados reproducibles y cuantitativos, sin embargo presentan problemas de interpretación ya que reconocen anticuerpos de baja avidéz, que no son específicos del LES en actividad. La técnica de IFI es más específica ya que no detecta los anticuerpos de baja avidéz, permitiendo detectar el LES en actividad, la titulación de los anticuerpos anti-DNA es muy útil en el seguimiento de los pacientes con LES ya que permite el monitoreo de la respuesta de los pacientes a la terapia.

El equipo IFIFLUOR MULTITEST nDNA (Crithidia luciliae) emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de auto-anticuerpos séricos dirigidos contra el nDNA. El suero del paciente en una dilución adecuada, se enfrenta con las improntas que contienen el parásito. Los anticuerpos específicos, si están presentes, se unen al sustrato antigénico, particularmente en la zona del kinetoplasto (mitocondrion) del parásito, luego de lavar para



eliminar los componentes no unidos, los anticuerpos unidos reaccionan con la antigamma globulina marcada con FITC, un segundo lavado elimina los elementos no unidos. Finalmente, luego de montados y cubiertos con cubreobjetos, se observa la fluorescencia bajo microscopio de fluorescencia.

Limitaciones

-No usar los reactivos contenidos en el equipo después de la fecha de vencimiento impresa en el equipo.

-Todas las incubaciones deben realizarse en cámara húmeda o en una placa de Petri que contenga papel de filtro humedecido para evitar la evaporación de los reactivos.

-Se deben mantener húmedas las áreas reactivas durante toda la técnica (evitar cualquier técnica de secado artificial como: secado al aire, con estufa y/o secadores), después de los pasos de lavado, se recomienda remover el exceso de humedad con papel absorbente; secar los bordes laterales externos del porta objetos y secar con cuidado entre las áreas, sin tocar las áreas reactivas. Algunos de los componentes de este equipo contienen sodio como conservante, el de sodio puede reaccionar con el plomo o el cobre de las cañerías, formando azidas metálicas explosivas, cuando se descarten los reactivos, dejar fluir abundante agua para evitar la formación de compuestos.⁹

1.4 Prueba de detección anticuerpos ELISA

Las pruebas de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de detección de anticuerpos dirigidos contra el VIH a llegado a ser de aplicación rutinaria. Estas pruebas se utilizan para estudios de detección de donantes de sangre, estudios seroepidemiológicos y con fines de diagnóstico.

Un resultado positivo ante dos pruebas ELISA con fundamentos distintos precisa una ratificación por un segundo análisis serológico, generalmente con una prueba de Western blot, la utilización de antígenos sintéticos tanto par las



pruebas ELISA de detección como para las de ratificación, así como una técnica fiable de cuantificación de la antigemia, constituyen adelantos técnicos que se están evaluando.

Metodología

El reactivo antigénico de las pruebas ELISA está representado por una preparación de virus destruidos, obtenidos mediante cultivos titulares, los antígenos virales se fijan en una fase sólida (bolitas de poli estireno, pocillos de una placa de micro titulación de plástico).

La muestra a analizar se incuba con estos antígenos virales. Si la muestra contiene anticuerpos anti VIH por ejemplo, estos se fijaran con los anfgenos y con un segundo anticuerpo (antinmunoglobulina) de especificidad anti IgG, marcado con una enzima (conjugada), descubrirá su presencia, la reacción enzimática que se obtiene mediante la adición del sustrato de la enzima permite demostrar los complejos antígeno-anticuerpo. A partir de este principio, la fase sólida de captura y el conjugado enzimático puede utilizarse según tres esquemas de reacción.

Prueba indirecta

En primer lugar se lleva a cabo una primera incubación entre el suero a analizar y los antígenos virales de la fase sólida, luego se requiere una segunda incubación tras añadir el conjugado, se consigue revelar la reacción mediante la adición del sustrato cromógeno específico de la enzima que marca la antinmunoglobulina, lo cual origina una tinción que un fotómetro traduce en densidad óptica.

En este tipo de reacción, la densidad óptica obtenida es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos antiviral existentes en el suero analizado, esta reacción posee una gran sensibilidad, pero a costa de una



perdida de especificidad. Es necesario evitar la fijación en la fase sólida de anticuerpos humanos carentes de actividad antiviral, prediluyendo los sueros a analizar en una solución que contenga un detergente. Por lo contrario, la prueba indirecta permite detectar todos los anticuerpos antivirales con la independencia de su especificidad, el uso de una fase sólida mixta permite incluso la detección simultánea de anticuerpos.

Elisa tipo competitivo

En esta prueba se reaccionan simultáneamente con los antígenos virales fijados en la fase sólida (antígenos virales inmovilizados) y, tras la adición del sustrato de la enzima, aparece una coloración. A la inversa, la presencia de anticuerpos antivirales en el suero analizado bloquea la fijación de los anticuerpos marcados, lo que se traduce como ausencia de coloración.

Por lo tanto, la densidad óptica que se obtiene es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos antivirales existentes en la muestra analizada, la prueba de tipo competitivo no solo da lugar a menos reacciones falsamente positivas (valoradas en aproximadamente el 0,1%), sino que además es el más sencillo de realizar: una sola etapa sin dilución previa de los sueros.

Sin embargo no permite descubrir con la misma sensibilidad todos los tipos de anticuerpos presentes en el suero de una persona infectada, la elección, para la preparación del trazador, de anticuerpos dirigidos sobre todo contra las glucoproteínas de la envoltura viral favorece la detección de los anticuerpos correspondientes en detrimento de los anticuerpos específicos de las proteínas internas, lo que puede ser perjudicial en controles de algunos sueros obtenidos poco después de la contaminación, al principio de la seroconversión.

Dadas las características técnicas, la prueba ELISA es el análisis serológico que más se utiliza para la detección de anticuerpos antivirales, la positividad de una prueba de ELISA de detección en un paciente traduce no solo la existencia



de una infección previa, sino también el riesgo de transmisión de la infección a través de la sangre o por contacto sexual.

La prueba de ELISA se ha concebido para ser sensible, ya que su primer objetivo es detectar las unidades de sangre contaminada con un virus, en el laboratorio las muestras se analizan inicialmente en una prueba única; si el resultado es positivo se realiza una prueba "en duplicado" (doble), en esta misma muestra. Si una de las pruebas es positiva, se considera la prueba positiva en ELISA y si la muestra es negativa se considera la muestra negativa.

De este modo la positividad de un individuo en ELISA corresponde a una reacción positiva de la misma muestra de suero en dos de las tres pruebas efectuadas, sin embargo, hay que señalar que entre los antígenos presentes en los pocillos se encuentra también antígenos de las líneas celulares (H9 o CEM) que se emplean para el cultivo de virus, así como otros reactivos que pueden inducir una reacción inespecífica que conduzca a un resultado falsamente positivo de la prueba.

Por ejemplo, el virus VIH precisa la ratificación de la positividad de la prueba ELISA con una técnica más específica (generalmente Western Blot), pero que no es adecuada para una detección masiva.

El fundamento de la prueba de ELISA permite destacar los anticuerpos antiVIH, pero no los antígenos virales, de tal manera que con esta prueba es imposible detectar una infección por VIH en su estadio inicial, es decir, antes de que se formen anticuerpos.

Si bien la sensibilidad de ELISA es buena en la infección declarada, es reducida en la fase precoz de producción de anticuerpos, se debe señalar que el porcentaje de error que conduce a un falso positivo se estima en el 5% al 6%: así pues, las pruebas de ELISA pueden plantearse solamente como pruebas de detección, si son positivas, deben ser ratificadas por.¹⁰



1.5 Justificación

La saliva constituye una muestra biológica de fácil obtención, de bajo costo, indolora y sin el uso de técnicas invasivas, cuya composición puede reflejar, en gran medida, ciertos acontecimientos patológicos de manifestación sistémica.

En el presente trabajo pretende realizar una revisión de las diferentes posibilidades diagnósticas que ofrece la saliva en el estudio de diversas patologías sistémicas e infecciosas y por lo tanto contar con herramientas que ayuden a realizar diagnósticos más rápidos y precisos y así fomentar la medicina preventiva, que es una de las estrategias más eficaces y baratas para muchas enfermedades, ya que la gran mayoría de estas son de fácil diagnóstico si se cuentan con herramientas auxiliares, que por desgracia son ignoradas y llegan a tener consecuencias graves.

Este tipo de medidas sanitarias son poco practicadas, muchas veces por la falta de información y de recursos de diagnóstico confiables e inmediatos y que puedan ser de fácil transportación a poblaciones aisladas y de bajos recursos que dificultan enormemente su aplicación siendo estas comunidades las más afectadas, especialmente en nuestro país.

Por estas razones la búsqueda de información y de tecnologías de este tipo, es muy importante para, modificar la calidad de vida y de salud.

En base a la información se puede afirmar que la saliva representa un medio de diagnóstico de credibilidad y utilidad que podría beneficiar a una gran cantidad de personas que no cuentan con recursos, rápidos, baratos y fáciles de usar.

Por lo tanto el uso de la saliva, debe ser considerada de manera importante como una nueva tecnología de diagnóstico oportuno, de confirmación, prevención y para poder dar una terapéutica mucho más precisa y adecuada.



1.6 Planteamiento del problema

La saliva representa un medio de creciente utilidad para el diagnóstico de diferentes enfermedades sistémicas, además con el uso de estas nuevas técnicas el tiempo de estudio y de resultados son rápidos, no se necesita de una gran infraestructura y existe la posibilidad de detectarlas con controles preventivos, que se pueden efectuar "in situ" es decir en el mismo lugar donde se realice el control preventivo.

Desafortunadamente aun, no se dispone de suficientes métodos comerciales para el uso de este fluido, lo que dificulta su uso generalizado, por otra parte, se tiene poca información de estas técnicas de diagnóstico, lo que limita las posibilidades de detectar enfermedades sistémicas o infecciosas.¹

Por lo tanto, es importante considerar los usos clínicos de la saliva como un medio valuable como auxiliar de diagnóstico ya que su uso permitiría la práctica de la medicina preventiva y poder actuar de una forma oportuna y rápida ante un padecimiento que pudiera ser desconocido para el individuo o población específica.

El uso de la saliva debe ser considerado de gran importancia en la investigación clínica en la área de odontología, por su contacto tan cotidiano y cercano que se tiene con este fluido, donde el extender y profundizar, es fundamental para la aplicación de tratamientos más específicos y seguros para el paciente.

Aplicando estos conocimientos el área médica y odontológica podría tener la posibilidad de monitorear poblaciones específicas, como escuelas, centros de trabajo, espacios recreativos y de servicios en general, de forma constante, permitiendo bajar porcentaje de incidencia de enfermedades contagiosas.



2. Diagnostico de caries

Respecto a los análisis microbiológicos de saliva, los mismos tiene gran utilidad como medio de diagnostico preventivo para la detección precoz del riesgo de presentar caries dental. El odontólogo dispone de análisis que le permiten controlar la presencia de *Streptococos mutans* y de *lactobacillus* en saliva de sus pacientes. Por otra parte los altos índices de *Estreptococos mutans* en saliva también indican la presencia masiva de sarro dental.

Estudios realizados en permitieron demostrar que los niños con índices elevados *Estreptococos mutans* y de *lactobacillus* en saliva desarrollaron, al cabo de 2 años, una media de cuatro superficies afectadas con caries nuevas. Se constato además, una correlación positiva entre los valores de *S. mutans* en saliva y la placa proximal, la indicación de los análisis de saliva abarco a los pacientes inicialmente sanos o tratados adecuadamente. El grado de importancia que tiene el odontólogo con los hallazgo bacteriológicos salivales se reflejaron en un diagnostico y tratamiento precisó y adecuado.

En los países escandinavos y también suizos estos análisis se han consolidado en los servicios de salud pública como exploraciones preventivas para la detección precoz del riesgo individual de presentar caries dental.

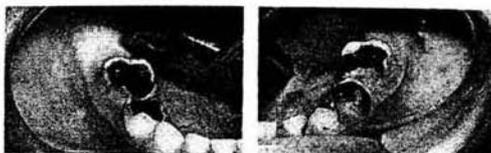


Fig.2. Caries Rampante

Fuente: Gómez Herrera B. Examen Clínico Integral en Estomatopediatria. Ed. Amolca. 2003

Mediante a los análisis realizados se pretendió evidenciar, como detectar a partir de los resultados de placa dental y de saliva, a los niños con riesgo de caries dental sin que ello constituya un gasto excesivo de laboratorio.



Los hallazgos bacterianos en saliva tuvieron una sensibilidad superior que la deducción clínica y de hecho, predijeron la enfermedad con un acierto superior en un 10-20 %, estos análisis de saliva estarán indicados en este grupo de niños como control preventivo y de motivación.¹

2.1 Saliva y su relación a gingivitis

La patogénesis de la enfermedad periodontal es una secuencia de procesos desde salud hasta presentación de lesiones características, incluidas la formación de la bolsa periodontal, pérdida de las inserciones de la encía y el tejido conectivo periodontal y el hueso alveolar que soporta a los dientes.

Se define a la infección como el proceso mediante el cual microorganismos patógenos penetran e invaden los tejidos u órganos del cuerpo y causan daños seguidos de un fenómeno reactivo, las bacterias son los agentes causales primarios de la gingivitis y de diversas formas de periodontitis.

Las bacterias que se acumulan en el margen gingival y que provienen de la placa dental causan gingivitis incipiente y quizás también periodontitis de evolución progresiva moderada.

Los primeros cambios detectados clínicamente en la gingivitis, son manifestaciones vasculitis en el plexo de los vasos laterales al epitelio de unión y el surco gingival, hay presencia de macrófagos y linfocitos, pérdida de colágena del 60 al 70% en esta zona y el epitelio de unión es invadido por células inflamatorias.

En este tipo de lesiones las células linfoides, principalmente linfocitos integran hasta un 75 % del total del infiltrado del tejido conectivo gingival, la mayor parte de los linfocitos son T; alrededor del 5 % al 10 % se identifican como linfocitos B, se encuentran muy pocas células plasmáticas.



En la gingivitis se caracteriza también por el incremento del líquido gingival con la migración de leucocitos al surco, en su mayor parte neutrofilos, el epitelio de unión desarrolla espacios intercelulares más amplios que son infiltrados por neutrofilos y cantidades pequeñas de células mononucleares en especial de monocitos.⁸

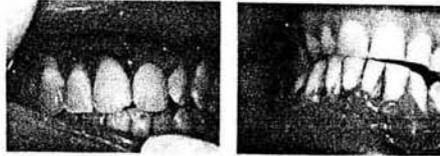


Fig. 3. Gingivitis

Fuente: Sapp J. Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. Ed. Mosby. 2001

2.2 Citometria de flujo para determinar gingivitis

La Universidad de Ghent, Bélgica y su departamento de odontopediatria y cuidados especiales, realizaron un estudio donde utilizaron un nuevo método de estudio, la citometria de flujo, para cuantificar el contenido celular en saliva humana y su relación a gingivitis.

El estudio se realizó con muestras de saliva estimulada, con tabletas de parafina de 112 hombres y 146 mujeres, esta saliva fue estimulada por tres minutos, posteriormente fue recolectada en recipientes de plástico estériles y llevadas al laboratorio a una temperatura de 18°C y la recolección de saliva fue hecha entre 9 a.m. y las 4 p. m. donde fueron analizadas por el UF-100, citometria de flujo.

EL sysmex UF100 es un aparato diseñado en Japón, que es utilizado para determinar la composición celular con un láser de Argon. Como resultados del estudio, el conteo de leucocitos salivales fue considerado como un potencial predecible para que un individuo tenga gingivitis.

Como conclusiones el uso del Sysmex UF-100 citometria de flujo es una forma rápida y fácil para determinar la composición celular de la saliva.



La citometría de flujo puede ser útil en evaluación de presencia de gingivitis en un individuo, el conteo de leucocitos salivales es un parámetro distinguible para gingivitis. La citometría de flujo sin embargo no debería ser usada para evaluar caries o riesgos individuales de la misma.

Para futuras investigaciones es necesario determinar y evaluar otras aplicaciones de la citometría de flujo salivales para predecir y distinguir parámetros para enfermedades Bucales o infecciones, tales como tonsilitis y periodontitis.¹¹

2.3 Determinación de *Helicobacter pylori*

Se sabe que el *Helicobacter pylori* es el agente etiológico del 90 % de las gastritis crónicas, 85-90% de las úlceras duodenales, 70-75 % de las úlceras gástricas, y por estar asociado con la evolución de *metaplasia* a cáncer gástrico. En 1994 fue clasificado por la OMS como carcinógeno tipo I.

Aun no existe consenso sobre la vía más importante de transmisión de la infección por *H. Pylori*. Entre las vías propuestas la de mayor relevancia es la interpersonal esta incluye la vía oral-oral, en la cual la cavidad Bucal juega un papel preponderante como reservorio de la bacteria (placa dental) y la vía fecal-oral.

Otras rutas de transmisión propuestas son: alimentaria-Bucal, zoonótica, vectorial, ambiental y la vía iatrogénica. Siendo la cavidad Bucal un posible reservorio de *H. pylori* uno de ellos es la determinación radio métrica en saliva, dicha técnica resulta rápida, sencilla, económica, además de controlar la evaluación de los pacientes luego del tratamiento de erradicación, por lo consiguiente la valoración de la actividad ureásica e saliva a distintos tiempos, puede ser como un buen marcador de colonización oral y también permite evaluar si existe una relación entre la colonización oral y la infección gástrica por *H. pylori*. Se resume que mediante esta técnica se ha podido correlacionar



el estado de contaminación de la boca por el *H pylori* con el grado de infección gástrica por dicho agente patógeno, permitiendo lograr una mejor evaluación para la infección.

Por su parte la valorización de la actividad de la ureasa en saliva puede ser considerada como un buen marcador de colonización oral por *H pylori* a través de estas observaciones se presume que pueden resultar de importancia para el éxito del tratamiento y erradicación de la infección.¹

2.4 Diagnostico de enfermedad de Chagas

El *Trypanosoma cruzi* es un protozooario quinetoplástido, intracelular, que produce la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, la causa mas frecuente de insuficiencia cardiaca en brasil y en los países latinoamericanos vecinos. El *T. Cruzi* se transmite de persona a persona a través de "chinchas besadoras" (triatómidos), que viven en grietas de las casas viejas, se alimentan de su habitantes mientras duermen y elimina parásitos contagiosos por las heces; estos últimos penetran en el huésped a través de la piel lesionada o de las mucosas.

En el punto de entrada puede haber un nódulo eritematoso transitorio llamado chagoma, el *Trypanosoma cruzi* tiene en su superficie un homologo de la proteína reguladora de complemento humano, el factor acelerador FAD. Igual que el FAD humano, el homologo parasitario se une a través de un glicosilfosfatidilinositol. Al menos dos proteínas diferentes de la superficie de *T. Cruzi* participan en la penetración del parásito en los macrófagos y otras células.

La primera, una traslasi-dasa parasitaria, elimina los residuos de ácido sálico de la célula del huésped y los transfiere a la proteína de la superficie del parásito, que se une a las células del huésped, la segunda una proteína llamada penetrina en la superficie del *T. Cruzi*, se une a las proteínas de la



matriz extracelular, heparina, hepararsulfato y colágena que participa en la invasión por los parásitos a las células del huésped. *T. Cruzi* evita la destrucción por los macrófagos a través de un desplazamiento rápido desde el lisosoma al citosol de la célula huésped.

En la enfermedad de Chagas aguda, que en la mayor parte de los individuos es leve, la lesión cardíaca se produce por invasión directa de las células miocárdicas por los microorganismos con las consiguientes alteraciones inflamatorias y en raras ocasiones, los pacientes con enfermedad de Chagas aguda presentan parasitemia importante, fiebre o dilatación cardíaca con insuficiencia cardíaca y adenopatías.

En la enfermedad de Chagas crónica, que se produce en el 20% de los pacientes infectados 5 a 15 años después de la infección inicial, las lesiones cardíacas y digestivas parecen ser el resultado de la respuesta autoinmunitaria inducida por *T. Cruzi*, en este momento no se puede detectar parasitemia, pero existe una llamativa infiltración inflamatoria del miocardio. Los pacientes tienen anticuerpos y células T que reaccionan con las proteínas del parásito y también tiene reacciones cruzadas con las células miocárdicas y nerviosas del huésped, linfocitos y proteínas extracelulares.

La lesión de las células miocárdicas y de las vías de conducción ocasionan una miocardiopatía dilatada y arritmia cardíacas, mientras que las lesiones del plexo linfoenterico producen una dilatación del colon y el esófago.

La infección del *Tripanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas ocurre en un estimado de 16-18 millones de personas en latino América y es la mayor causas de enfermedades crónicas del corazón en varios países.

El corazón típicamente se encuentra dilatado, redondeado y aumentado de tamaño y peso, con frecuencia hay trombos murales que, en la mitad de las autopsias, dan lugar a émbolos o infartos pulmonares o sistémicos.



Histológicamente, el infiltrado inflamatorio intersticial y perivascular está formado por linfocitos, células plasmáticas y monocitos y macrófagos es mas intenso en la rama derecha del sistema de conducción cardiaca, existen focos aislados de necrosis de células miocárdicas y fibrosis intersticial, especialmente en la punta del ventrículo izquierdo, que puede dar lugar a dilatación aneurismática, la mitad de los pacientes brasileños, con carditis letal tiene también dilatación del esófago o colon, aparentemente relacionados con la afectación de la innervación intrínseca de estos órganos.¹²

Las respuestas inmunológicas a la infección del *T. cruzi* son particularmente complejas debido al alto grado de polimorfismo entre las cepas del *T. cruzi* y sus clones. Cuando una enfermedad de Chagas resulta, manifiesta una diversidad de rasgos clínicos. La relevancia de la infección de *T. cruzi* en humanos a estimulado investigaciones en la investigación de antígenos parasitarios y anticuerpos específicos, además ha sido reportado que es el inmuno responsable que juega el mayor rol en el curso en modelos experimentales y humanos.

Varios anfigenos *T. cruzi* han sido identificados y caracterizados pero un mejor entendimiento de las moléculas de inmune respuesta es necesario, muchas enfermedades infecciosas pueden ser diagnosticadas por la detección de inmunoglobulinas específicas en serum pero la colección de sangre es invasiva es tardada y demanda personal especializado y entrenado.

Anticuerpos específicos de diferente clase han sido manifestados anteriormente en saliva de pacientes con infecciones de toxoplasmosis aguda, schistosomiasis crónica, e infecciones virales. En orden de la investigación en el uso de anticuerpos específicos salivales de detección, para estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas se desarrollan en saliva, hacia un prueba específica de IgG en una amplia población con individuos infectados con *T. cruzi*. Un total de 114 pacientes entre 30 y 60 años con infección



crónica de *T cruzi* fueron atendidos en la clínica de enfermedades cardiacas de la Universidad Federal de Río de Janeiro Brasil.

El diagnostico de enfermedad de Chagas fue basada con una prueba estándar de serología de inmunoflorescencia y una eliminación clínica, todos los pacientes tenían una disfunción cardiaca revelada por una examinación detallada que incluía electrocardiograma, radiografía de tórax, eco cardiografía bidimensional Doppler, ejercicios en bicicleta y una prueba cardiopulmonar de esfuerzo, posteriormente se recolecto la saliva en tubos de plástico, se centrifugaron para eliminar todo tipo de restos de alimento y se congelo a 20°C, para usarse mas adelante.

Antígeno tripanosoma cruzi

Los epimastigotes de la cepa Y crecieron a 28°C en un medio de infusión de hígado por periodos en serie cada 5 o 7 días y la cosecha fue lavada tres veces con una solución 150 mM buffer de fosfato salino (PBS) esta fue resuspendida in PBS con N-Tosil- L-phenylaninechloromethyl quetone en una concentración final 1 mM de inhibidor de proteasa. El material fue sometido a 10 ciclos de congelamiento y descongelamiento y entonces separado por ultra centrifugación a 100 000 x g por 8 horas a 4°C, la fracción soluble fue usada en la prueba de ELISA. La cuantificación de proteínas fue realizada de acuerdo al método de Lowry.

Esta prueba fue modificada del método descrito por Lewis, la concentración de antígeno contenido fue determinada en experimentos secuenciales, el análisis del anticuerpo específico por el procedimiento de ELISA fue hecho con micro placas cubiertas con 100 microlitos de antígeno soluble de *T. Cruzi* diluido a 12 microgramos por mililitro en 0.05 M de bicarbonato amortiguador de pH 9.6 y incubado por la noche a 4°C, el antígeno desunido fue desecho y bloqueado por 30 minutos a 37°C con 200 microlitos de PBS-0.05 y 10% de leche descremada (solución descremada), después de tres lavados con 200



microlitos de PBS al 0.05 %, 100 microlitos de la muestra de saliva diluida fue añadida y duplicada, todas las muestras fueron diluidas en la solución bloqueadora. Las placas fueron incubadas por 3 horas a 37°C con 200 microlitos de PBS al 0.05%.

El anticuerpo unido fue detectado con 100 microlitos de fosfatasa alcalina conjugada con IgG anti-humano diluido 1:1000 en solución bloqueadora. Después de una hora de incubación las placas fueron lavadas en PBS al 0.05% y la reacción desarrollada por la adición de 100 microlitos de nitrofenil fosfato diluido en glicerina amortiguador con pH 10.4.

Después de la incubación en un cuarto de temperatura la reacción fue detenida por adición de 50 microlitos de 3 m NaOH, el uso de otras técnicas para diagnosticar *T. Cruzi* como la inmunofluorescencia reporto una sensibilidad del 82.8 de 100% a diez antígenos.

La inmunofluorescencia presento 98-99% de sensibilidad y la prueba de ELISA presento un 99 % de sensibilidad. En conclusión tenemos muestras que la detección de *T. cruzi* específico en IgG salival, proporciona una simple, barata pero efectiva herramienta de diagnostico de prueba, para establecer la enfermedad de chagas.¹³

2.5 Diagnostico de Dengue

Después de 63 años se ha demostrado la ausencia de actividad del virus del dengue, el tipo 1 fue el primero en ser aislado en 1986, Cuatro años después otro tipo de virus de dengue tipo 2 también fue introducido.

Desde entonces ambos tipos han causado destrozos y grandes epidemias en varios estados brasileños, principalmente durante la temporada de lluvia.



El monitoreo preciso del progreso de la enfermedad requiere una intensiva labor de laboratorio para confirmar los casos, la detección del virus por un anticuerpo específico la inmunoglobulina M (IgM) en muestras de suero ha sido usada con éxito para el diagnóstico de infecciones de dengue.

Sin embargo el requerimiento de toma de muestras de sangre es poco práctico, caro y limita la escala de investigación de laboratorio principalmente en niños. Un método no invasivo para confirmar infección de dengue podría ser de considerable importancia para estudios epidemiológicos y clínicos.

Muestras de saliva y sangre fueron colectadas al mismo tiempo de pacientes con sospecha de fiebre de dengue, atendidos en el Departamento de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal Fluminense, Río de Janeiro Brasil, un aparato comercial fue usado para coleccionar la saliva.

La muestra fue refrigerada durante la transportación al laboratorio. La saliva fue extraída de los paquetes contenedores y centrifugada a 250 rpm por 15 minutos y almacenada a -20°C antes de la prueba, el contenido de IgG en la saliva fue verificado para determinar si era adecuado para el espécimen, usando una enzima (EIA). El IgG total indicaba que los componentes de saliva mostraban que tenían una alta concentración de inmunoglobulinas.

Se usaron micro placas cubiertas con 100 microlitros de IgG anti-humano diluido en 1:500 en 0.05 de carbonato amortiguador con pH 9.6.

Después de la incubación por 18 horas en un cuarto de temperatura las micro placas fueron lavadas con fosfato salino como amortiguador con pH de 7.2 al 0.05%, diez microlitros de la muestra de saliva diluida fueron incubadas a 37°C . Cincuenta seis pares de muestras de saliva y sangre tomadas de 1 a 33 días después del comienzo de la enfermedad obtenidos de 38 casos de fiebre de dengue.



En ocho pacientes una segunda muestra de saliva fue obtenida unos días después, el dengue específico IgM fue detectado en todos los especímenes de suero probados.

Todos los pacientes presentaron diversos tipos de síntomas de la fiebre de dengue ninguno de ellos fueron admitidos al hospital debido a las complicaciones del dengue, la edad de los pacientes con fiebre de dengue fue de 5-58 años, el total del IgM específico dengue fue detectado en 25/38 (65.8%) en muestras de saliva de pacientes con IgM específico dengue en suero. Después de 5 días del comienzo de la enfermedad se observó un positivo 82% y 10 días después se obtuvo el 100% de detección.

Este estudio demostró que por primera vez el IgM específico dengue puede ser detectado en muestras de saliva de pacientes con una infección reciente de dengue, la prueba MAC-ELISA fue del 80% de sensibilidad en muestras de saliva coleccionadas 5 días después de empezar la enfermedad y 90% desensibilizada en especímenes coleccionados 10 días después, la especificidad de las pruebas de saliva MAC-ELISA fue del 100%.¹⁴

2.6 Diagnostico de VIH

La saliva como medio de diagnóstico nos permite reconocer las concentraciones de una serie de componentes tanto endógenos como exógenos en el organismo. Gracias a los anticuerpos presentes en la saliva se pueden aplicar las nuevas tecnologías biomédicas en el diagnóstico del síndrome de inmunodeficiencia humana causada por el VIH, este novedoso método posee numerosas ventajas con respecto a la prueba de sangre.

Las pruebas serológicas que usan muestras de sangre para el diagnóstico de la infección del virus de inmunodeficiencia humana VIH son las más comunes y se han usado de forma rutinaria por casi dos décadas, recientemente el uso de la saliva como un fluido con múltiples fines diagnóstico, en la última década los



beneficios del uso de la saliva para determinar la presencia de una amplia variedad de sustancias, incluyendo drogas terapéuticas, sustancias de abuso, anticuerpos y hormonas, han ido adquiriendo una mayor atención.

Los avances científicos y tecnológicos están produciendo mejoras continuas en aspectos como la determinación de los componentes salivales la obtención de muestras comparativas y el aumento de la especificidad y la sensibilidad de los procedimientos utilizados, estos procedimientos apuntan hacia una nueva era, en la que tendrá gran importancia el diagnóstico molecular de la cavidad bucal.

La Facultad de Estomatología de Ciencias Médicas de la Habana Cuba ha realizado hasta la fecha estudios relativos de la capacidad de diagnóstico de la saliva.

Uno de los estudios estuvo constituido por pacientes que acudieron a consulta externa de cirugía maxilofacial de los hospitales "Comandante Manuel Fajardo" y "Salvador Allende" de Ciudad de la Habana, en el periodo que comprendía entre febrero y abril de 1999.

Los criterios de inclusión comprendían, pacientes que portaban alguna afección de la cavidad bucal relacionadas con enfermedades mitóticas, bacterianas, virales, traumas, neoplasias, pacientes que no se hubieran realizado pruebas de VIH y pacientes voluntarios con deseos de participar en el estudio, a cada paciente se le explicó las características del estudio para continuar con la toma de muestras.

Después de analizarlas y procesadas las muestras se obtuvo los valores de fluorescencia (n) que mide la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra de estudio, en estudios nacionales realizados en la población se estableció que el valor de n para determinar la infección de VIH es de $N=0.3$, de esta forma los pacientes con $N > 0.3$ serían considerados portadores del VIH y los pacientes con $N < 0.3$ estarían libres de la infección, se estudió un total de 48 pacientes de los cuales 25 eran masculinos y 23 femeninos.



Los grupos se dividieron en grupos por edades, de 18 a 40 años, de 41 a 60 y mayores de 60 años se tomaron muestras de saliva, sangre y orina, para la toma de saliva se dispuso del sistema Omni-Sal (Saliva Diagnostics System Vancouver, USA) que consiste de una torunda de material absorbente (colocada al fina de un mango corto, que cambia de color al completarse su capacidad de absorción) en un tubo de ensayo con líquido estabilizante.

Este recogía la muestra entre la mucosa yugal y la encía a nivel del primer molar derecho, hasta que el extremo del mango cambie a color azul. Los exámenes de laboratorio se realizan en el centro de inmunoensayo, las muestras se procesaron según el método de UMEELISA específico a VIH, el diagnóstico realizado a partir de la muestras de la saliva nos permite afirmar que ninguno de los pacientes se encuentra infectado por el VIH, lo cual se corrobora con los valores de sangre.

La presencia de anticuerpos en saliva para VIH (IgG,IgA,), si es constante en los pacientes infectados se puede realizar la prueba de infección utilizando fluidos Bucales.¹⁵

2.7 Diagnóstico de cólera

El cólera es una infección aguda del tracto gastrointestinal, "*Vibrio cholerae*", que se caracteriza, en los casos graves, por la aparición brusca de diarreas acuosas no sanguinolentas y abundantes, vómitos, deshidratación rápida, desequilibrio electrolítico, acidosis metabólica e insuficiencia cardiaca, en los casos no tratados se produce la muerte, la infección se desmanera por la vía fecal-oral.

Los mecanismos inmunes relacionados con el cólera comprenden una inmunidad antitóxica y antibacteriana, estas respuestas ocurren fundamentalmente a nivel de la mucosa y son mediados por anticuerpos de



clase IgA el cual neutralizan la colonización intestinal, así como la unión de la subunidad B de la toxina colérica a su receptor específico, se ha determinado que el lipopolisacárido (LPS) es que induce mejor respuesta de anticuerpos y que estos se correlacionan con la protección.

La IgA anti LPS puede prevenir la enfermedad por: alutación de *Vibrio* y atropamiento en la mucosa, inhibición de la movilidad, prevenir la adherencia al epitelio y potenciar la acción antibacteriana de la lactoferrina y la lactoperoxidasa. Por ser el *Vibrio Cholerae* un microorganismo no invasivo, el cual genera una respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal y que la propia enfermedad confiere protección duradera, preparar una vacuna contra la enfermedad debe ser Bucal, preferiblemente con una bacteria viva o que, en el proceso de producción, conserve en lo posible su estructura nativa.

Recientemente el Centro Nacional de Investigaciones Científicas y el Instituto Finlay, obtuvieron un grupo de cepas atenuadas de *V.Cholerae*, entre ellas se encuentra el cepas del biotipo serotipo Ogawa. La protección en humano de un candidato vacunal se realiza mediante *Vibrio* parentales no atenuados, no obstante el vibriocida sérico y el ELISPOT en sangre periférica son las técnicas más aceptadas para correlacionar con la inducción de una buena inmunogenicidad y protección.

Estas requieren de la toma de muestras de sangre seriadas en el caso de vibriocida y de gran volumen en el caso del ELISPOT, además el vibriocida mide la respuesta de IgG e IgM sérica y no la IgA que es la de más interés, por su parte el ELISPOT es una técnica costosa y, a pesar de medir IgA, es en nivel de sangre y no a nivel efector, mucoso.

Por ello se propuso la estandarización de un ELISA cualitativo en saliva para determinar la inducción de IgA anti-LPS Ogawa en voluntarios inoculados por vía oral y valorar la aparición IgA específica, así como estudiar el efecto de la dosis y la cinética en la respuesta inducida.



EL Departamento de Inmunidad Básica del Instituto Finlay, La Habana, Cuba realizo un estudio donde doscientos ochenta voluntarios cubanos sanos entre 18 y 40 años de edad, sin antecedentes de vivir en zonas endémicas de cólera y no haber sido vacunados contra esta enfermedad, formaron parte del estudio.

Ciento diez fueron empleados para determinar el valor de corte del ELISA y el resto constituyo el grupo experimental del ensayo clínico vacunal, las muestras de saliva fueron tomadas de forma seriada, al los 0, 7, 8, 9,10 y 14 días post-inoculación.

Estas se obtuvieron por estimulación masticatoria para garantizar que provengan de las glándulas parotidas donde se ha reportado que las concentraciones de IgG son mayores.

Dichas muestras fueron inactivadas a 56°C por 15 minutos centrifugadas a 9000 g y conservadas a 20° C hasta su uso, los resultados de ELISA se compararon con el ELISPOT y con los grupos experimentales. Se obtuvieron sensibilidades de 90.3, 92.85 y 93.3%; especificidades de 86.9, 89.5 y 96%; 96.0% valores predictivos positivos 95.0, 96.2 y 98.2 % y eficiencia 89.4, 90.2 y 94.1% respectivamente.

Se demostró la precencia de IgG anti-LPS en saliva de los individuos inoculados con el candidato vacunal y se obtuvo la máxima positividad en 9 días, el uso del ELISA desarrollado permitió la detección de IgG Anti-LPS en saliva con una alta sensibilidad y especificidad y valores predictivos.¹⁶

2.8 Diagnostico de parotiditis

La parotiditis crónica recurrente infantil (PCRI) esta definida como una inflamación parótidea, asociada generalmente a una sialictasia obstructiva de la glándula parótida.



Esta enfermedad se caracteriza por el aumento de volumen uni o bilateral, con dolor de intensidad variable en la glándula, existe una disminución del flujo salival que puede ser mucoso o purulento, lo cual facilita la formación de tapones mucosos constituidos por acúmulos de células, moco y pus a nivel de los conductos.



Fig. 4. Tapón Mucoso en parotiditis crónica

Fuente: Landeta M. Revista Chilena de Pediatría. 2003

Esta es una patología poco frecuente y cuyo origen no es claro, a este cuadro es necesario hacer el diagnóstico diferencial con parotiditis bacteriana, parotiditis viral y con síndrome de Sjögren.

En Chile se estudiaron 50 pacientes con diagnóstico de PCRI que ingresaron en el Hospital San Borja Arriarán entre septiembre 1998 y marzo 2001, el diagnóstico se basó en criterios clínicos que incluyeron el aumento de volumen parotídeo, presentación al menos de 3 episodios previos de aumento de volumen en la misma glándula, duración del episodio agudo de 2 a 10 días y ausencia de enfermedad sistémica.

Los casos fueron confirmados mediante sialografía convencional. Se además estudiaron 20 pacientes controles que consultaron por otro tipo de patología en el servicio máxilo facial y no presentaban antecedentes de parotidomegalia, el estudio microbiológico de los pacientes y de los controles se realizó en muestras de saliva obtenidas por aspiración a nivel del conducto parotídeo postmasaje glandular y previa antisepsia de la zona.

Se evaluaron muestras de saliva y faringe provenientes de 50 pacientes, y 25 muestras de saliva y frotis faringeo de las recurrencias de 11 pacientes. Se estudiaron 20 muestras de saliva y frotis faringeo de los controles, se realizó



cultivo de saliva para microorganismos anaerobios facultativos capnofilicos en saliva. De los 50 niños con parotiditis estudiados; 29 son masculinos y 21 femeninos y el rango de edad de 11 meses y 12 años con un promedio de 5,6 años, el grupo control incluyo 20 niños, 11 hombres y 9 mujeres con edades de 2.6 y 14 años con promedio de 6 años.

En el examen físico, 33 pacientes presentaron saliva purulenta, en 40 de los 50 pacientes (80%), el cultivo de saliva de origen parotídeo del episodio que motivo la consulta fue positivo, 7 negativos y en 3 con desarrollo de flora escasa que en la practica se considero negativos, el cultivo en los 40 casos con resultados positivos fue monomicrobiano en 36 (90%) y poli microbiano en 4 (10%). *S. Pneumoniae* se identifico en 19 en cultivo monomicrobiano (47.5%). *H. Influenzae* en 9 (22.5%) en los 4 casos con cultivos poli microbianos correspondieron a la asociación de *S. pseudmoniae* y *H. Influenzae*.

En 11 casos que presentaron recurrencias posteriores con un total de 24 episodios, en 20 se observa bacteriología positiva (83.4%), en los 11 casos, ya sea una o mas recurrencia se cultiva la misma especie bacteriana (100%). Al analizar el total de 74 episodios de cultivo de saliva paratoídea, sólo en 12 (16,2%) se identifica simultáneamente la misma especie en faringe y saliva parotídea, los casos de PCRI presentaron una edad 5 y 6 años promedio, sin diferencia de género.

El 100 % de los casos presento dolor y 72 % fiebre. En 49 de los 50 casos hubo asociación a infección respiratoria, en el 66% la saliva fue purulenta, asilándose, *S. pseudmoniae* en 38 % de los casos y *H Influenzae* en 18% de los casos, en el 20% no se identifico agente etiológico, en el 48% de *S, pseudmoniae* se confirmo resistencia a la penicilina, el tratamiento con lavados intraglandular con sustancia yodada hidrosoluble, fue eficaz, con remisión de 3 a 14 días y desaparición de signos clínicos.¹⁷



2.9 Saliva para detectar factores carcinogénicos

En cavidad oral, las células epiteliales son frecuentemente removidas y exfoliadas y pueden ser detectadas en saliva, la recurrencia y la naturaleza multifocal son las características más importantes del cáncer oral, la identificación de alteraciones genéticas como la mutación p53 en saliva como un alto riesgo, sugiere la posibilidad de una futura técnica no invasiva para detectar cáncer Bucal.

En un estudio realizado por el Instituto de Oncología, Otorinolaringología y Cirugía Maxilofacial de San Sebastián, España, se analizaron dos grupos de pacientes con riesgo de desarrollar una recurrencia de carcinoma Bucal, un grupo tenía leucoplasia por primera vez (20 individuos) y el otro grupo tenía leucoplasia y uno o dos previos carcinomas Bucales (20 individuos).

Las muestras coleccionadas de cada paciente fueron: cabello con raíz, saliva, y un cepillado con una torunda de la lesión de leucoplasia. DNA fue extraído de células de estas muestras y 4-8 genes p53 fueron amplificados que fueron analizadas por PCR que tenía una gran posibilidad de contener material mutado y que posteriormente fue confirmado y localizada la mutación.

Se identificó p53 en saliva y en citología de cepillado de paciente con un alto riesgo de desarrollar un carcinoma Bucal, 11 de 40 pacientes evaluados tenían una o dos mutaciones en el gen p53, 7 de 20 pacientes con previos carcinomas mostraron mutaciones que se presentaron en ambas en saliva y en el cepillado, las mutaciones de P53 también fueron observadas en 4 de 20 pacientes sin previos carcinomas pero solo se presentó en la citología de cepillado, las mutaciones detectadas en saliva y el cepillado correspondían al primer grupo, en pacientes con riesgo a un carcinoma Bucal primario las mutaciones solamente fueron detectadas en la citología de cepillado.



Los resultados sugieren la inactivación del p53 puede detectar usando especímenes de citología de pacientes con leucoplasia anteriores a lesiones malignas aparentes clínicamente, la presencia de la mutación del p53 en saliva sugeriría recurrencia, la técnica es sin dolor rápida y puede ser usada para el seguimiento de pacientes con riesgo a desarrollar carcinomas orales.¹⁸

2.10 Detección del virus del herpes tipo 8

Se sabe que el virus del herpes tipo 8 esta asociado con el sarcoma de Kaposi y es virus del herpes que mas recientemente se ha descubierto y es fuertemente asociado a varias formas del sarcoma de Kaposi.

El sarcoma de Kaposi asociado al virus del sida, en zonas endémicas de África y trasplantes ha contribuido al conciente incremento y demanda para el diagnostico de virus del herpes tipo 8, el diagnostico del virus del herpes tipo 8 es basado frecuentemente en pruebas de serología, detectando anticuerpos hacia un número de antígenos en un ciclo latente.

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades, en Atlanta, USA, utilizo micro placas en PCR para ampliar la sensibilidad de detección y poder compararlo con otro método (Southern blot).

Muestras de saliva y sangre se usaron para el estudio que fueron colectadas en Atlanta de una sección de estudio de cruce de 46 sujetos de alto riesgo por Sarcoma de Kaposi (VIH positivos) y 39 sujetos de bajo o de no riesgo por sarcoma de Kaposi.

El DNA fue depurado de células blanca de sangre en saliva de pacientes infectados con VIH con y sin sarcoma de Kaposi y en solo paso la PCR se encargo de leer un primer conjunto especifico de glicoproteinas realizada en 40 especímenes seguida por la prueba de Southern blot.



Fig. 5. Sarcoma de Kaposi

Fuente: Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. Ed. Mosby. 2001

El resultado de los dos métodos de detección fueron casi idénticos la detección del virus de herpes tipo 8 por el amplificador PCR es sensitivo y especifico y el método Southern blot es mucho mas rápido en tiempos alternados el costo es comparable y utiliza un equipo de laboratorio común.

2.11 Detección del virus Epstein-Barr

La mononucleosis infecciosa (MI) es una enfermedad linfoproliferativa autolimitada, benigna producida por el virus Epstein-Barr (VEB), un herpes virus del grupo gamma, se caracteriza por fiebre, adenopatías generalizadas, esplenomegalia, dolor de garganta, y la aparición en sangre periférica de linfocitos T activados atípicos (células de mononucleosis), algunos pacientes desarrollan hepatitis, meningoencefalitis y neumonitis.

La MI afecta fundamentalmente a adolescentes y adultos jóvenes de países desarrollados, en el resto del mundo la primoinfección por VEB se produce durante la infancia, habitualmente es sintomático y confiere inmunidad frente a posteriores reinfecciones. El VEB se transmite por contacto humano estrecho, frecuentemente a través de la saliva durante el beso, una glucoproteína de la cubierta de VEB se une a la proteína CD21 presente en las células epiteliales.

El virus penetra el citoplasma de las células epiteliales por fusión directa con la membrana plasmática y en las células B. Inicialmente, el virus penetra en las células epiteliales de nasofaringe, orofaringe y glándulas salivales.



Simultáneamente se extiende al tejido linfoide subyacente y, más específicamente a los linfocitos B.

Aunque clásicamente la MI se presenta con fiebre, odinofagia, adenopatías y otras manifestaciones, con mucha frecuencia tiene una clínica atípica con o sin fiebre y únicamente con un ligero malestar, fatiga y linfadenopatías que alcanzan el tamaño de una leucemia-linfoma; como una fiebre de origen desconocido sin adenopatías llamativas u otros signos de localización; como una hepatitis difícil de diferenciar de los síndromes virales hepatotropos o como una exantema febril parecida al sarampión. En la gran mayoría de los pacientes, la MI se resuelve entre 4 a 6 semanas pero en ocasiones la astenia dura más tiempo.²⁰



Fig.6. Mononucleosis infecciosa

Fuente: Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. Ed. Mosby. 2001

El virus VEB es una gama del virus del herpes que causa infecciones de por vida en humanos, las primeras infecciones de VEB son usualmente sintomáticas durante la infancia pero la infecciones empiezan clínicamente te retrasan hasta la adolescencia, las replicas del VEB se encuentran el glándulas salivales, membranas de la mucosa oral y epitelios nasofaringes y puede ser excretada constantemente en regiones orales. Sin embargo el receptor VEB, CD21 en Linfocitos B, no es definido en el epitelio, Bucal y como el VEB infecta células del epitelio no se puede determinar.

El VEB es asociado con varias enfermedades con malignidad. Como el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo. Recientes reportes muestra la asociación del VEB con algunos carcinomas gástricos, el VEB es el 7% de los carcinomas gástricos en Japón.



La incidencia de VEB en excreciones en regiones Bucales se analizo usando, reacción en cadena de polimerasa (PCR) para evaluar la prevalencia de infecciones de VEB en personas sanas en Japón.

La Facultad de Medicina de la Universidad Tottori en Japón realizo un estudio donde se obtuvieron muestras de saliva de 93 niños saludables de 0-6 años y lavados de garganta que se obtuvieron de 48 adultos saludables de 21-47 años ,que se realizaron haciendo gárgaras con 10ml de fosfato salino, como buffer.

La sensibilidad de la PCR fue suficiente para poder detectar cinco copias del genoma VEB en la muestra. Se detecto DNA del VEB en 43 (90%) de los 48 lavados de garganta de los adultos sanos y en 35 (38%) muestra de saliva de 93 de niños sanos, los resultados demostraron la incidencia del VEB en excreciones de regiones Bucales de personas sanas en Japón.²⁰

2.12 Detección del virus de la hepatitis C

Se sabe que la hepatitis de transmisión parenteral, causa el 90 al 95 % de los casos de hepatitis asociada a transfusiones, la larga búsqueda del agente causal fue recompensada en 1989 con la clonación del virus de la hepatitis C (VHC). Los métodos serológicos han establecido hoy día que el VHC es la principal causa de la enfermedad hepática en todo el mundo, las vías principales de transmisión son las inoculaciones y las transfusiones sanguíneas. Se ha documentado la transmisión vertical; la transmisión por contacto sexual parece ser extremadamente baja.

El VHC es un virus ARN pequeño, monocatenario y recubierto, con un diámetro de 30 a 60 nm y similitudes con los *flavos virus* y *pestitivirus*, el genoma codifica un polipéptido único de aproximadamente 3010 aminoácidos. Se han implicado tanto a la replicación citocida del VHC como acontecimientos mediados por mecanismos inmunológicos.



EL periodo de incubación para la hepatitis por VHC varía entre 2 y 26 semanas con una media de 6 y 12 semanas, el ARN del VHC se detecta en la sangre durante 1 a 3 semanas, coincidiendo con las elevaciones en las transaminasas séricas, el ARN circulante persiste en muchos pacientes a pesar de la presencia de anticuerpos neutralizantes, incluyendo a más de 90% de los pacientes con enfermedad crónica.

El curso clínico de la hepatitis aguda por VHC probablemente sea más leve que el de VHB, pero puede existir casos concretos más graves e indistinguibles de la hepatitis por VHA y VHB. Un rasgo clínico bastante característico del VHC son las elevaciones episódicas en las transaminasas séricas, con periodos intercurrentes normales o cercanos a la normalidad.

Por otra parte las transaminasas pueden estar elevadas de forma persistente o permanecer normales, la cirrosis puede estar presente en el momento del diagnóstico o puede desarrollarse a los 5 a 10 años, los hallazgos elevados de IgG anti VHC tras una infección activa no parecen conferir una inmunidad efectiva a una infección posterior por VHC.¹²

El virus de la hepatitis C es transmitido por contacto de sangre contaminada, uso de jeringas o equipo contaminado que se usa en hospitales tiene un papel importante en la transmisión del virus en varios países, la transmisión sexual y de madre a hijo también han sido descritas, aunque se ha sugerido que el virus de la hepatitis C no debiera ser considerado una infección de transmisión sexual. Quedan un gran número de vías de transmisión de la hepatitis C que sus rutas de infección no se pueden identificar.

El Instituto de Ciencias de la salud, el departamento de Medicina Interna de Hospital Juan Conalejo, de la Coruña España, realizaron un estudio donde se seleccionaron 74 pacientes con diagnóstico de hepatitis C y se utilizó un amplificador PCR para confirmar presencia de RNA de el virus de la hepatitis c en plasma.



Un total de saliva estimulada fue recolectada entre las 10:00 y las 12:00 horas los donadores se abstuvieron de comer, beber, fumar 90 minutos antes de la recolección de saliva, las muestras de saliva fueron colectadas en contenedores estériles y almacenadas a -80°C . Nueve muestras donde macroscópicamente se observó que contenían sangre y otras cuatro muestras fueron desechadas durante el proceso, el grupo de estudio comprendía, 54 hombres (73%) y 20 mujeres (27%), los factores de riesgo fueron identificados en 55.8 % de los pacientes.

El uso de fármacos inyectables fue la principal forma de transmisión (45.9%) seguida por las transfusiones (8.1%), el RNA del virus de la hepatitis C fue detectado en 32 de 61 especímenes de saliva (52.4%) en la detección no se encontró correlación entre el virus de la hepatitis C, la edad y el género. Hemoglobina fue detectada en 14 de 61 muestras de saliva (22%) pero su presencia no es un predictor de RNA de hepatitis C en saliva. En conclusión el RNA del virus de la hepatitis C a menudo se presenta en saliva de pacientes infectados con hepatitis C.²¹

2.13 Diagnóstico de síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad crónica auto inmune caracterizada por queratoconjunctivitis y xerostomía que es el resultado de una infiltración linfocítica de glándulas exocrinas (glándulas menores y glándulas lagrimales) que sustituyen el epitelio funcional. El SS puede ocurrir solo o acompañado con otros trastornos autoinmunes bien definidos como el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y esclerodermia. Muchas pruebas de diagnóstico son usadas pero ninguna es patognomónica para SS.

Diferentes combinaciones de criterios de prueba sean propuestas para diagnosticar el SS, incluyendo hallazgos clínicos serológicos, radiológicos e histopatológicos. Sin embargo varios de estas pruebas se dificultan para llevarse a cabo por que requieren de equipo complejo.



Varias y diferentes alteraciones del flujo en la composición de la saliva han sido reportadas en pacientes con SS en controles de salud y con pacientes con condiciones semejantes.

Por lo tanto la sialometría y la sialoquímica han sido propuestas para diagnosticar SS y otras enfermedades que involucran glándulas salivares primarias, hay varios atractivos métodos para diagnosticar SS como es la sialometría que es no invasivo, barato y no necesita de equipo específico.

Por otra parte la determinación de micro globulinas B2 en saliva y en lagrimas ha sido sugerida como un instrumento útil no solo por el diagnóstico y la cuantificación de la extensión de la inflamación de las glándulas salivares y lagrimales pero también para el seguimiento de la enfermedad y los efectos de su tratamiento.

Aunque muchos otros cambios han sido detectados en varios constituyentes de saliva en pacientes con SS (electrolitos, enzimas, anticuerpos, prostaglandinas, etc.) no hay una prueba única que demuestre sensibilidad específica suficiente para diagnosticar SS, pero con el uso de niveles micro globulinas B2 y gamma glutamil transferasa es posible diagnosticar S.S. y diferenciar pacientes con SS primario, secundario y lupus eritematoso sistémico.

Esta investigación se desarrolló en 1999 por el Hospital Universitario "Virgen de las Nieves y el Hospital Universitario Virgen del Rocío en Granada y Sevilla, España, donde se observaron tres grupos de pacientes: A) 19 pacientes con SS primario, B) 15 pacientes con SS secundario y C) 25 pacientes con lupus eritematoso sin SS y finalmente un grupo control con 30 sujetos sanos fueron incluidos.

Por medio de un modelo matemático el grupo A) tuvo, 84%, B) un 85.7% y C) 87.0 % de sensibilidad, la sialometría es una fácil, segura y fiable prueba, la determinada combinación de B2 m y la gamma glutamyl transferasa en saliva



y serum fue útil para diferenciar los pacientes con SS de los sujetos normales, pero no es excesivamente buena para diferenciar a los pacientes de SS primario y SS secundario.²²

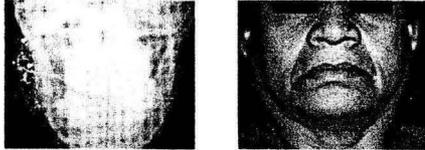


Fig.7. paciente con síndrome de Sjögren

Fuente: Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. Ed. Mosby. 2001

2.14 Uso de cromatografía de flujo para determinar la relación de cáncer bucal y la nuez de areca

Mas de 200 millones de personas en el mundo mastican las nuez de areca principalmente en el pacifico y países del sureste de Asia, numerosos estudios epidemiológicos han mostrado la asociación de masticar nuez de areca con el desarrollo de cáncer bucal y el desarrollo de leucoplaquia y fibrosis submucosa.

El arecoline es un alcaloide que se encuentra en la nuez de areca. Es tal un estimulador del sistema nervioso, simpático y parasimpático, tranquiliza los músculos del tracto intestinal y músculos bronquiales es un potente diaforético, causa nauseas, vomito e hipo.

El arecoline estimulas las glándulas, gástricas, pancreáticas e intestinales y las células mucosas del tracto respiratorio.

Diferentes componentes se han identificado en la nuez de areca pero el arecoline se muestra con mas implicación en la patogénesis de la enfermedad por ser genotoxico, mutagénico y tener potencial carcinogénico.



Por lo tanto es importante para determinar las concentraciones de arecoline en saliva y es capaz de dar indicaciones de concentración de arecoline en keratinocitos y fibroblastos en mucosa.

El Instituto de Investigación Médica y Patología Clínica del Hospital Westmead, Sydney, Australia. Realizó una investigación para determinar arecoline en saliva humana utilizando la cromatografía de líquidos.

La saliva fue colectada de individuos con un hábito regular y semi-regular de masticar nuez de areca y un grupo control sin hábitos de masticar nuez de areca, después de masticar la nuez, la saliva fue colectada en tubos polietileno y las muestras fueron almacenadas a -80°C .

La examinación incluía 0.5 ml de saliva mezclada con 0.5 ml de alcohol isoamyl al 1% en hexano y 0.2 g de NaCl, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm y congeladas. Después del congelamiento, la solución de hexano fue decayendo en el vaso del cronógrafo de líquidos y evaporado bajo nitrógeno.

Las muestras fueron reconstituidas en 100 microlitos de una fase móvil y analizadas en el cromatógrafo, la óptima onda fue establecida por el escaneo de la absorción de rayos UV encima del rango de 190-360 NM en la fase móvil y en la fase móvil del arecoline.

Mostró que la onda óptima es de 215 de 215 NM, el método mostró ser fácil y confiable para determinar concentraciones de arecoline en saliva, la sensibilidad, especificidad, precisión fueron demostradas ser satisfactorias por los niveles de arecoline.

La cromatografía de flujo también ha sido usada con éxito para determinar el ritonavir (fármaco anti-retroviral) inhibidor del Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en plasma, fluidos cerebro espinal y saliva para analizar su comportamiento.²³



2.15 Uso del sensor amperometrico de flujo para diagnostico.

El método amperometrico para cuantificar y determinar hormonas es basado principalmente en un sándwich formado entre la hormona para ser detectada y un anticuerpo específico.

El principio inmunológico de la prueba de ELISA no resta cambios excepto el factor electro activo del producto de la reacción enzimática que es inyectada en la punta del capilar y detectada amperometricamente en el electrodo que trabaja en la superficie del sensor.

El potencial de la aplicación del sensor para diagnosticar enfermedades dentales, periodontales y el riesgo que tiene una a persona a desarrollarlas es una importante tarea que tiene este método.

Se colecciono muestra de líquido crevicular de 17 pacientes elegidos aleatoriamente con una periodontitis avanzada, 17 personas con gingivitis y un grupo control que se mostraba libre de enfermedad periodontal o de otros indicativos de inflamación o infección. Se encontró en el grupo con salud periodontal que mostraba bajos niveles de peroxido en saliva 01 micro g/ml, la muestra de periodontitis mostraron niveles altos de peroxidasa 0.8 micro g/ml y la gingivitis tuvo niveles de 0.4 micro g /ml.

La razón probable es que durante situaciones inflamatorias, la peroxidasa se encuentra relacionada en un medio extracelular y es depositada en depósitos bacterianos (placa dental). Otros estudios indican que los tejidos orales pueden ser afectados durante el embarazo, el embarazo no es una causa de gingivitis pero si puede ser el iniciador del desarrollo de caries y erosión.

En este respecto es posible ser valorado un estudio de concentración de peroxidasa en saliva durante el ciclo menstrual, se investigo niveles de



peroxidadas en pacientes femeninas durante varias fases del ciclo menstrual. Muestras de saliva de 5 pacientes saludables de 20 a 39 años con ciclos menstruales regulares fue colectada durante dos ciclos completos.

Para la detección electroquímica el líquido es inyectado en el tubo capilar de la cámara del sensor y la señal analítica es detectada por el pico detector, el sensor puede ser aplicado para encontrar peroxidasa y hormona gonotropina córica. En conclusión el sensor puede ser una herramienta para estudio físicos no invasivos y estrategias de diagnóstico.⁷

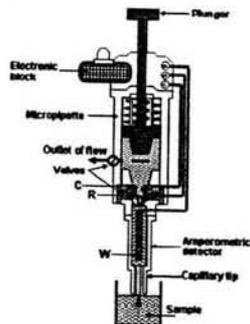


Fig. 8. Esquema del sensor amperométrico de flujo

Fuente: Inoue K. Determination of Uric Acid in Human Saliva by High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric electrochemical Detection. Journal of chromatography. 2004

2.16 Uso de la cromatografía de flujo para determinar ácido úrico

El ácido úrico es el mayor componente de nitrógeno en orina, es el producto de la purificación metabólica en el cuerpo humano, la presencia de elevados niveles de ácido úrico es un signo de Hiperuricemia y gota.

Niveles elevados de ácido úrico se pueden encontrar similares en un incremento en el consumo de alcohol, obesidad, diabetes, colesterol, enfermedades del corazón y en enfermedades del riñón.



El Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Hashi, Japón, realizó un estudio para establecer un método para determinar ácido úrico en saliva humana, el método es usado actualmente para la cuantificación de ácido úrico en muestras biológicas es un método directo.

La separación y la detección de ácido úrico en muestras biológicas humanas fueron logradas por la cromatografía de líquidos de alto rendimiento, naturalmente la mayoría de las muestras como blancos biológicos son la sangre y la orina. Recientemente se ha reportado la detección de niveles de ácido úrico en saliva humana que son muy similares a los de orina y sangre.

La cuantificación de ácido úrico fue comparada con un detector ultravioleta (UV) para detectar su eficiencia, las muestras fueron recolectadas de seis voluntarios, (cuatro hombres y dos mujeres) ninguno sufre de alguna enfermedad sistémica o de las glándulas salivares que pudieran afectar la saliva.

La saliva fue retirada dos horas antes con un pH en el rango de 7.0 a 8.0 en todos los sujetos, la saliva fue recolectada de la boca mientras masticaban una esponja de poliéster posteriormente la muestra fue centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos para remover los elementos celulares, el fluido limpio fue almacenado a -20°C antes del análisis.

La cromatografía de líquidos consiste de una bomba, un horno de columna un auto inyector y un detector ultravioleta en una onda de 284 NM en un tiempo de 10 minutos, después la inyección de cada muestra contenía 10 nM de hidróxido de potasio fue inyectada y analizada.

Como resultado la recuperación de ácido úrico en saliva fue del 95 % por lo tanto el método puede ser usado en el diagnóstico rutinario de ácido úrico en saliva.²⁴



3. Conclusiones

Por muchos años han sido estudiadas las variaciones en el porcentaje de flujo salival, la composición y síntesis de proteínas que forman la saliva total, en un intento por determinar y auxiliar en el diagnóstico de alteraciones sistémicas y de las glándulas salivales.

La saliva representa un medio de creciente utilidad para el diagnóstico de diferentes enfermedades sistémicas como las que se han descrito, en las cuales se observan alteraciones en la cantidad y composición de la saliva.

No obstante existen otras enfermedades reumáticas, fibrosis quísticas, hipertensión, malnutrición, disfunciones hormonales y Enfermedades neurológicas, que pueden ser diagnosticadas por medio de este fluido biológico.

Por lo tanto, es importante considerar los usos clínicos de la saliva como un medio valuable para el diagnóstico de enfermedades bucales y sistémicas.

Se Considera que la investigación básica y clínico-básica en el área de la odontología debe extenderse y profundizarse, ya que es fundamental para la aplicación y el estudio de nuevos conocimientos.

Los resultados son muy alentadores para realizar futuros estudios con éstas y otro tipo de entidades patológicas, tanto bucales como sistémicas, con el propósito de utilizar la saliva como un auxiliar de diagnóstico clínico, por lo cual podemos concluir lo siguiente: Se demostró que pueden existir correlaciones entre proteínas componentes salivales y anticuerpos, que podrían ser indicadores de situaciones clínicas específicas.

Aplicando estos datos en situaciones clínicas, la saliva podrá ser utilizada como un medio de diagnóstico confiable y de bajo costo.



4. Referencias

1. Medina M. Utilidad de la saliva como fluido de diagnostico (disponible en <http://www.odontocat.com>)
2. Mendel I.D. The functions of saliva . J. Dent Res 1987:623-627
3. Cansen Van Rensburg. Oral Biology. Ed. Quintessence. EU:(1995).469-479
4. Jenkins N. Fisiología y Bioquímica Bucal. Ed. Limaza (1985) 301-331
5. Mendel I.D. The role de saliva in maintaining oral homeostasis. JADA 1989; 298,304.
6. Hay DI, . The functions of salivary proteins. British Dental Association; 1996. 105-122
7. Ivniiski D. Hand-held amperometric sensor for saliva and other oral fluid-based diagnostic. Analytica Chimica Acta. 2003. 265-269
8. Ramírez Rivera N. Reacción en Cadena de Polimerasa. Revista Medica de la Universidad Veracruzana.. Vol. 3 num 1.2003.
9. Laboratorio IFI. Manual de uso. Disponible en (<http://www.google.com>)
- 10 Cassuto J.P. Manual de Sida e Infección por VIH. E.d. Masson.1991.49-56
11. Johan K.M. Flow cytometry as a new method to quantify the cellular content of human saliva and relación to gingivitis. Clinical Chimica Acta.202. 35-41
12. Robbins S. Patología Estructural y funcional. Ed. Mcgraw Hill.1997. 387-390,412-414,936-937,
- 13 Pinho R.T. Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas disease in endemic areas. Acta Trópica .1999.31-38
14. Artimos de Oliveira S. Diagnosis of dengue infección by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples. J. of Virological Methods.1999.81-86
15. Medina Madrid R. La saliva como medio de diagnostico de VIH. Rev . Cubana Estomatol. 2000. 146-157.
16. Del Campo J. ELISA Cualitativo de IgA Anti-liposacarido de Vibrio Cholerae en saliva de humanos. (Disponible en <http://www.yahoo.com>.)



17. Landeta M. Aspectos clínicos, etiología microbiana y manejo terapéutico de la parotiditis crónica recurrente infantil. *Revista chilena de pediatría*. 2003. 269-276.
18. Martines de Pancorbo M. Detection of p53 gene alterations in saliva and brush cytological specimens from. Oral carcinoma risk patients. (disponible en <http://www.elsevier.com>).
19. Stamey F.R. Comparasion of microtiter plate system to Southern blot for detección of human herpesvirus 8 DNA amplified from. Blod and saliva. *Journal of Virological Methods*. 203. 189-193
20. Ikuta K.. Detection of Epstein-Barr virus in saliva and trota washings in healthy adults and children. *Microbes and infección*. 2000. 115-
21. Hermida M. Detección of HVC RNA in saliva of patients whit hepatitis C virus infección by using a highly sensitive test. *Journal of Virological Methods*. 2002. 29-35.
22. Castro J. Salivary and serum B2-microglobulin and gamma-glutamyl-transférase in patients whit primary Sjögren syndrome and Sjögren syndrome secón dari to .systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta*. 2003. 225-231.
23. Cox S. High-performance liquid chromatographic determinación of arecoline in human saliva. *Journal of chromatography A*. 2004. 2-3
24. Inoue K. Determination of uric acid in human saliv bay high-permormance liquid chromatograpy whit amperometric electrochemical detección. *Journal of chomatography B*. 2003. 57-63.