



Índice CPOD, capacidad amortiguadora salival, niveles salivales de *Streptococcus mutans* y anticuerpos IgA, en escolares de la ciudad de México

CD Patricia Meneses Huerta,*
 CD Alfredo Salvador Sánchez Figueroa,* CD María Teresa de Jesús Zaragoza Meneses,* QFB Eunice Galaviz Espinoza,** Mtra. Yolanda Flores Cabrera,** MC Maurilio Flores Pimentel,** M en C Claudia Fabiola Martínez Rodríguez,** Dr. en C Rubén Marroquín Segura**

* Laboratorio en Investigación en Odontología. Campus I FES Zaragoza, UNAM.

** Laboratorio de Microbiología e Inmunología L 313 Campus II FES Zaragoza, UNAM.

Resumen

A 139 estudiantes de 12 a 15 años de edad, se les levantó el índice CPOD y en sus salivas se determinó: la capacidad amortiguadora, cantidad de colonias de *Streptococcus mutans* como un grado de infección, la respuesta de anticuerpos de tipo IgA salival contra los antígenos I/II de *Streptococcus mutans* mediante ELISA, y la especificidad de esta reacción se corroboró mediante inmunoelectrotransferencia (western blot). El índice CPOD presentó una mediana de 4, la capacidad amortiguadora de la saliva mostró una mediana de 2, que correspondió a una capacidad amortiguadora media, la prevalencia de la infección por el microorganismo mencionado fue de 94.2%, la mediana del grado de infección fue de 2, lo que indica una infección moderada en la población de estudio y el título de anticuerpos de tipo IgA salival contra antígenos I/II de *S. mutans* mostró una mediana de 0.170. Al realizar una correlación bivariada de Spearman entre la capacidad amortiguadora y título de anticuerpos IgA salivales contra *Streptococcus mutans*, se observó una correlación positiva ($r = 0.126$, $P = 0.042$). No se encontró correlación estadísticamente significativa entre el resto de variables. **Conclusión:** En la población estudiada el índice CPOD mostró una mediana de 4, con respecto a la saliva: se encontró una alta prevalencia de la presencia de *S. mutans*, observándose un moderado grado de infección, una capacidad amortiguadora media y se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre la capacidad amortiguadora y el título de anticuerpos IgA salivales contra antígenos I/II de *Streptococcus mutans* que resultó específica al determinarla mediante inmunoelectrotransferencia.

Palabras clave: CPOD, *Streptococcus mutans*, anticuerpos salivales, IgA salival, ELISA, inmunoelectrotransferencia.

Abstract

Method: 139, 12 to 15 years students were screened for DMFT index, their saliva for; buffer capacity, colony counts of mutans streptococci as a degree of infection, salivary IgA antibody response to antigens I/II of *Streptococcus mutans* determined by ELISA, the reaction specificity was corroborated by immunolectrotransference (western blot). **Results:** The mean DMFT index median was 4, the saliva buffer capacity median was 2 which corresponded to an average buffer capacity. The prevalence of infection by *S. mutans* was 94.2%, the median of the degree of infection was 2 which indicates a moderate infection in the sample studied, the title for antibodies salivary type IgA vs *S. mutans* antigen I/II presented a median of 0.170. The Spearman bivariate correlation between the buffer capacity and salivary IgA antibody to *S. mutans* a positive correlation ($r = 0.126$, $P = 0.042$) no statistical significance was found among the other variables. **Conclusion:** In the studied population the median DMFT was 4. Saliva was found with a high presence of *S. mutans*, observing a moderate

Recibido para publicación: 10-Febrero-05

degree of infection, median buffer capacity and was observed a positive correlation being statistically significant between the buffer capacity and salivary IgA antibodies vs antigen I/II of *S. mutans* which resulted specific by the immunolectrotransference determination.

Key words: DMFT, *Streptococcus mutans*, salivary antibodies, salivary IgA, ELISA, immunolectrotransference.

Introducción

El desarrollo de caries dental en humanos y animales de experimentación se atribuye a la presencia de microorganismos asociados con los llamados comúnmente estreptococos del grupo mutans: *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.¹ Varios autores coinciden en que *S. mutans* serotipos c, e y f, así como *S. sobrinus* serotipos d, g y h son dos de los principales agentes causales del desarrollo de la biopelícula bucal en humanos y otros mamíferos.^{1,2} Estos microorganismos poseen varios determinantes antigenicos de pared celular, tales como peptidoglicanos antigenicos, polisacáridos y ácido lipoteicoico.² *S. mutans* posee gran cantidad de sustancias antigenicas en su superficie celular, de los cuales se ha caracterizado en particular, una proteína de 185 kD que ha sido designada por varios autores como antígenos I/II (3), B, IF, P1, SR, Pac^{4,5} y MSL-1.⁶

El antígeno I/II tiene un peso molecular estimado por SDS-PAGE de 185 kD, pertenece a un grupo de proteínas fibrilares de la familia de las adhesinas,⁷ la cual participa en la unión de los estreptococos a la película adquirida en las superficies dentales,⁸ 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 210 kD llamada SpaA, de *S. sobrinus*.¹ El grupo de las glucosiltransferasas (GTF) se encuentra involucrado en la producción de glucanos insolubles en agua a partir de sacarosa con la consecuente acumulación de *S. mutans*.⁹

Material y métodos

Se realizó un estudio de tipo observacional, transversal en 139 adolescentes voluntarios, de entre 12 y 15 años de edad pertenecientes a la Escuela Secundaria Diurna Librado Rivera Godínez N° 274 del Distrito Federal, se les levantó el índice CPOD (dientes cariados, perdidos y obturados) y se les solicitó de 3 a 5 mL de saliva en tubos estériles que se mantuvieron en hielo para procesarse el mismo día. Se excluyeron del estudio aquellos alumnos que refirieron estar bajo tratamiento con antibióticos.

Aislamiento de los antígenos I/II

Para la purificación de los antígenos I/II se siguió la metodología de Russell.¹⁰ Brevemente: 15 mL de cultivo de caldo de Todd-Hewitt fue inoculado con *S. mutans* ATCC 25175 incubado a 37° C por 30 h, la biomasa se separó por centrifugación en frío a 25,000 g por 1 h, el sobrenadante se concentró por medio de centrifugación y vacío a congelación en un speedvac, se dializó contra agua bdestilada y se precipitó con sulfato de amonio al 75% de saturación, el precipitado se resuspendió en solución salina fosfatos PBS pH 8.0 y se dializó en el mismo amortiguador hasta eliminar el sulfato de amonio. El dializado se purificó en un baño de DEAE celulosa equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos de pH 8.0, el sobrenadante se concentró a volumen equivalente a 1/10 del original por medio de centrifugación y vacío a congelación en un Speedvac. Para la purificación de los antígenos I/II se usó una columna calibrada de sephadex G 200 y se colectó la fracción que correspondió al peso reportado de los antígenos I/II, se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (protease inhibitor cocktail Sigma Chemical Company cat P2714). A la muestra obtenida se le realizó una electroforesis en poliacrilamida al 10% y apareció una banda bien definida que correspondió a los 185 KD. Se determinaron proteínas por el método de Lowry,¹¹ los antígenos se separaron en alícuotas de 0.5 mL y congelaron a -20° C hasta su uso.

Para la cuantificación de *S. mutans* en saliva se utilizó la técnica de Matsukubo y cols. modificada.¹² Tubos de 13 x 100 mm estériles con 2 mL de caldo mitis-salivarius, telurito de potasio al 0.01% y 0.2 UI/mL de bacitracina, se inocularon con 100 µL de saliva de cada muestra, se incubaron a 37° C durante 24 h, (los tubos se inclinaron a 45° para permitir la adherencia de los microorganismos al tubo), transcurridas las 24 h, se vació el contenido de los tubos en un recipiente con fenol al 5%, se realizó el recuento de *S. mutans* con una fuente de luz adecuada (previa intercalibración del revisor) y de acuerdo al número de colonias que se adhirieron al tubo se dio un valor con base en los siguientes criterios.

- 0 si no aparecen colonias en la pared del tubo.
- + 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 colonias observándose un aspecto de cristal nevado.

De acuerdo al valor asignado, la correspondencia del grado de infección se dio como sigue:

0 corresponde a no infectado.

+ corresponde a infección leve.

++ corresponde a infección moderada.

+++ corresponde a infección severa.

++++ corresponde a infección muy severa.

El resto de las muestras de saliva se filtraron, empleando una jeringa con filtros de algodón estéril, colectando en tubos estériles. Esta saliva se utilizó para la determinación de la capacidad amortiguadora y la determinación del título de anticuerpos por el método de ELISA y su especificidad mediante inmunoelectrotransferencia. Las muestras de saliva se mantuvieron en congelación a -20° C hasta su uso.

Determinación de la capacidad amortiguadora de saliva por la técnica del Dr. Rodríguez Miró,¹³ consistió en determinar la capacidad de 300 μ L de saliva, para neutralizar ácido clorhídrico 0.03N agregándolo gota a gota utilizando como indicador púrpura de bromocresol.

Criterios:

0 a 3 gotas..... baja

4 a 6 gotas..... media

7 a 9 gotas..... alta

10 o más gotas..... muy alta

Estandarización de la técnica de ELISA y western blot

Para la estandarización de la técnica de ELISA, se utilizaron placas Nunc de alta adherencia con 96 pozos (Denmark) y se irradiaron con luz UV por 30 minutos para aumentar su adhesividad.¹⁴ Se usó un amortiguador de carbonatos para pegar el antígeno, y se siguió un esquema de tablero de ajedrez para encontrar la concentración adecuada de antígenos I/II y la dilución adecuada de anticuerpos en saliva,¹⁵ el bloqueo se realizó con albúmina de huevo al 1% y gelatina al 1%. Se utilizó un conjugado anti IgA humana obtenido en cabra y unido a peroxidasa de rábano (Sigma Chemical Company Cat A 0295), la concentración de antígeno I/II que resultó adecuada fue de 4 μ g/mL, la dilución de la saliva usada 1:80 y la del conjugado 1:500. Las lecturas de las placas se realizaron a 450 nm en un lector de ELISA Dynatech 250 R. A las

muestras con lecturas de más de 0.30 en la técnica de ELISA, se les realizó una inmunoelectrotransferencia (western blot), con la idea de determinar si la reacción fue específica; para esta técnica se preparó un gel de poliacrilamida al 10% y se usaron marcadores de peso molecular con un rango de 16.5 a 175 KDa New England Biolabs, las salivas se diluyeron 1:10 y el conjugado anti IgA humana 1:100.^{16,17}

Las pruebas estadísticas paramétricas se seleccionaron de acuerdo a la distribución de datos y homogeneidad de varianzas ($P \leq 0.05$ por la prueba de Bartlett) y que los datos mostraran una distribución normal; mientras que las pruebas no paramétricas se aplicaron cuando las varianzas no mostraron homogeneidad ($P \leq 0.05$ por la prueba de Bartlett) y que los datos no siguieran una distribución normal.¹⁸

Debido a que los datos no cumplen con el supuesto de normalidad, se calculó la mediana y para la correlación bivariada se realizó la prueba de Spearman. Para la realización de las pruebas se usó el paquete estadístico SPSS versión 10 para ambiente Windows.¹⁹

Resultados

La prevalencia de infecciones por *Streptococcus mutans* nos mostró que el 94.4% de la población se encuentra infectada por este microorganismo y que la frecuencia

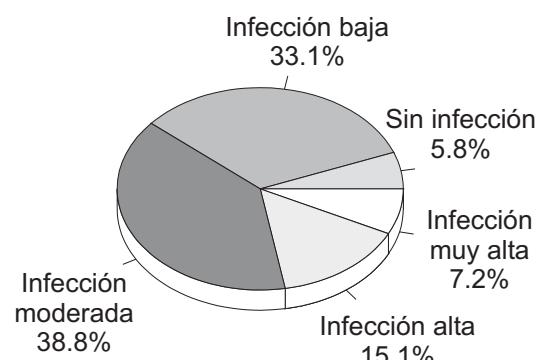


Figura 1. Porcentaje de infección por *Streptococcus mutans*. Técnica de Matsukubo et al.

Cuadro I. Valores de las medianas de las diferentes pruebas realizadas en saliva.

Prueba	Medianas
ELISA (IgA contra antígenos I/II)	0.170
Capacidad amortiguadora de saliva	2
CPOD	4
Grado de infección	2

Cuadro II. Correlación bivariada de Spearman.

Pruebas de correlación	Correlación	Significancia
Grado de infección -capacidad amortiguadora	$r = 0.125$	$P = 0.071$
Grado de infección- título IgA anti antígenos I/II	$r = -0.059$	$P = 0.244$
Grado de infección-CPOD	$r = 0.120$	$P = 0.080$
Capacidad amortiguadora-título IgA anti antígenos I/II	$r = 0.147$	$P = 0.042^*$
Capacidad amortiguadora-CPOD	$r = 0.126$	$P = 0.070$
Título IgA anti antígenos I/II-CPOD	$r = 0.089$	$P = 0.149$

*Correlación significativa a un nivel de 0.05.

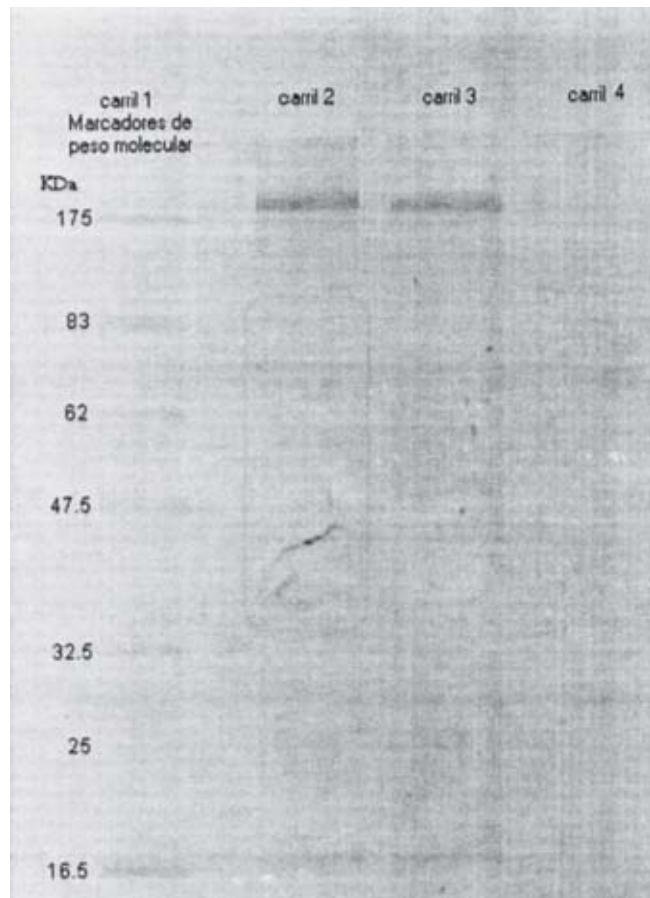


Figura 2. Inmunoelectrotransferencia. El carril 1 son marcadores de peso molecular. Los carriles 2 y 3 son ejemplos de salivas que dieron absorbencias altas, de más de 0.3, mientras que el carril 4 es un ejemplo de una saliva que dio una absorbencia muy baja, en ELISA.

mayor está asociada a una infección moderada, como se aprecia en la figura 1. Los resultados de los índices CPOD, la capacidad amortiguadora, el grado de infección medido por la cuenta de colonias de *S. mutans* y el título de anticuerpos IgA secretores contra antígenos I/II de *S.*

mutans determinado por ELISA se muestran en el cuadro I. Se realizó una correlación bivariada de Spearman entre diferentes binomios que se muestra en el cuadro II. De las muestras de saliva que dieron valores en ELISA por arriba de 0.3 se les realizó una inmunoelectrotransferencia, las salivas probadas mostraron manchas en los 185 KD que correspondieron a los antígenos I/II (Figura 2).

Discusión

El 94.4% de la población estudiada presentó infección por *S. mutans*, sólo el 5.6% no mostró en ese momento presencia de *S. mutans*, y la mediana con un valor de 2 que corresponde a una infección moderada, mientras que el índice CPOD presentó una mediana de 4, los valores de estos parámetros nos indica un estado de salud bucal deficiente. Estos resultados son comparables a los reportados en un estudio realizado en una zona urbana de la Ciudad de México donde encontraron la presencia de *S. mutans* en el 95% y el índice CPOD de 3.57 en la población estudiada.²⁰ El resultado del índice CPOD con una mediana de 4 encontrado en la población estudiada, cae dentro del rango de 2.5-5.1 para niños de 12 años, reportado en 1991-1992 para México.²¹ La correlación bivariada de Spearman entre el grado de infección y el CPOD fue de $r = 0.120$ con una $P = 0.080$, la falta de correlación se puede explicar en función de que en la etiología de la caries es multifactorial y no exclusiva de *S. mutans*, o bien la falta de correlación se debió probablemente a que el índice de dientes cariados perdidos y obturados pueden tener una historia lejana y la medición del grado de infección es actual. Se observó que la correlación entre la capacidad amortiguadora y el título de anticuerpos anti-antígenos I/II fue de $r = 0.147$ y una significancia de $P = 0.042$, lo cual nos indica que a mayor capacidad amortiguadora en la saliva el título de anticuerpos anti-antígenos I/II fue mayor, esto pudiera ser debido a que los anticuerpos funcionan mejor en pH cercano a la neutralidad. El título de anticuerpos contra antígenos I/II de *S. mu-*

tans fue específico como lo mostró la inmunoelectrotransferencia donde se presentaron manchas bien definidas alrededor de los 185 KD, peso molecular que corresponde a los antígenos I/II de *S. mutans*, también se observó una ligera banda cerca de los 17 KD que pudiera ser un producto de la degradación de los antígenos I/II o bien son otros péptidos con actividad antigénica descritos previamente.²²

Bibliografía

1. 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.
2. Hamada S, Slade H D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980; 44: 331-384.
3. Russell MW, Lehner T. Characterization of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. *Archs Oral Biol* 1978; 23: 7-15.
4. Tenovuo J, Lehtonen O P, Aaltonen AS. 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.
5. Forester H, Hunter N, Knox KW. Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* 1983; 129: 2779-2788.
6. Demuth DR, Golub EE, Malamud D. Streptococcal-host interactions: structural and functional analysis of a *Streptococcus sanguis* receptor for a human salivary glycoprotein. *J Biol Chem* 1990; 265: 7120-7126.
7. Jenkinson HF, Demuth DR. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol* 1997; 23: 183-190.
8. Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M. Surface hidrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutans of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immunol* 1990; 58: 289-296.
9. Hajishengalis G, Michalek SM. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 326-345.
10. Russell MW, Bergmeier LA, Zanders ED, Lehner T. Protein antigens of *Streptococcus mutans*: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. *Infect Immun* 1980; 28(2): 486-493.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
12. Matsukubo A. Semicuantitative determination of *Streptococcus mutans* using its adherent ability in a selective medium. *Caries Res* 1981; 14: 40-45.
13. Rodriguez-Miro M. *Avances en estomatología preventiva*. Mérida Talleres estudio Bassó, sa. Tomo 2. 1989: 19-20.
14. Boudet F. UV-treated polystyrene microtiter for use in ELL-SA to measure antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods* 1991; 142: 73-82.
15. Chapter 2. Rabin BS. Enzyme linked immunoassay. In: *Manual of clinical laboratory immunology*. 4th ed. Washington D.C. American Society for Microbiology. 1992: 2-9.
16. Dunbar BS. *Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques*. New York. Plenum Press, 1987: 67-76.
17. Burnette WN. 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.
18. Bethea RM, Duran BS, Bouillon TL. *Statistical methods, for Engineers and scientists*. New York, Marcel Dekker, Inc. 1975: 247-251.
19. Ferrán AM. *SPSS para windows. Programación y análisis estadístico*. Madrid, McGraw-Hill. 1996: 162-165.
20. Del Rio GI. Dental caries and mutans streptococci in selected groups of urban and native Indian schoolchildren in Mexico. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991; 19: 98-100.
21. Oral Health programme. *Division of noncommunicable diseases*. World Health Organization. 1997.
22. Russell MW, Challacombe SJ, Lehner T. Specificity of antibodies induced by *Streptococcus mutans* during immunization against dental caries. *Immunology* 1980; 40: 97-106.

Reimpresos:

Rubén Marroquín Segura,
Laboratorio de Microbiología e Inmunología L 313,
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Campus II Batalla 5 de Mayo s/n,
Col. Ejército de Oriente, 09230, México, D.F.,
Tel. 015556230758, Fax 015557736335.
E-mail: msr@puma2.zaragoza.unam.mx.
Este documento puede ser visto en:
www.medigraphic.com/adm