



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE ODONTOLÓGIA**  
**DEPARTAMENTO DE Cs. MORFOFUNCIONALES**

**ACTIVIDAD DE LA PEROXIDASA SALIVAL Y LA  
CAPACIDAD AMORTIGUADORA EN SALIVA DE  
PAROTIDA SOBRE LAS ENFERMEDADES  
BUCODENTARIAS EN NIÑOS EN EDAD ESCOLAR**

*PROF. Mariela Perez Dominguez*

*Prof. Angela Maria Villalobos G.*

**BARBULA, 2005**

## INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>i</b>
<b>ELPROBLEMA DE INVESTIGACION</b> .....	<b>1</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS`</b> .....	<b>5</b>
<b>JUSTIFICACION</b> .....	<b>5</b>
<b>MARCO TEORICO</b> .....	<b>7</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
<b>Bases teóricas</b> .....	<b>12</b>
<b>La saliva y sus propiedades</b> .....	<b>12</b>
<b>Peroxidasa Salival</b> .....	<b>20</b>
<b>Capacidad Amortiguadora</b> .....	<b>25</b>
<b>Enfermedades Bucodentarias: Caries dental y gingivitis.....</b>	<b>26</b>
<b>Definición de variables</b> .....	<b>31</b>
<b>Establecimiento de Hipótesis</b> .....	<b>32</b>
<b>MARCO METODOLOGICO</b> .....	<b>33</b>
<b>Tipo de estudio</b> .....	<b>33</b>
<b>Población y Muestra</b> .....	<b>33</b>
<b>Criterios para la selección de la Muestra</b> .....	<b>34</b>
<b>Técnicas para la recolección de Datos</b> .....	<b>34</b>
<b>Recolección y tratamiento de la Muestra</b> .....	<b>35</b>
<b>Actividad de la Peroxidasa en Saliva de Parótida</b> .....	<b>35</b>
<b>Proteínas Totales</b> .....	<b>36</b>
<b>Capacidad Buffer</b> .....	<b>36</b>
<b>Diagnostico de la caries dental en pacientes</b> .....	<b>37</b>
<b>Diagnóstico de la gingivitis en pacientes</b> .....	<b>38</b>
<b>Procesamiento de recolección y análisis de datos</b> .....	<b>39</b>
<b>RECURSOS</b> .....	<b>40</b>
<b>CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b> .....	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>43</b>

## INTRODUCCION

La saliva es el principal elemento para la homeostasis bucal, ya que modula el ecosistema de la cavidad bucal. Entre las funciones salivares destacan la protección contra virus, bacterias y hongos, su capacidad tampón, la protección y reparación de la mucosa bucal y remineralización dental.

Por ello, las alteraciones en la actividad enzimática, específicamente de la peroxidasa salival, así como, también de la capacidad amortiguadora de la saliva, pueden tener efectos adversos locales, tales como, caries, gingivitis, infecciones orales, y dificultades masticatorias (Liebana,2002).

El sistema de la peroxidasa salival contribuye de diversas formas al mantenimiento de una buena salud bucal. Este sistema regula la cantidad y distribución de especies de la microflora en la cavidad bucal, evitando la acumulación tóxica de peróxido de hidrógeno, e inactiva muchos compuestos carcinogénicos y mutagénicos (Tenovuo y col,1991 y Tenovuo, 2002).

La capacidad tampón de la saliva es un factor importante que influye en el pH salival y en el proceso de remineralización dental, siendo el bicarbonato su principal componente, además, esta capacidad se relaciona con el flujo salival y la actividad catalítica óptima de las enzimas salivales (Edgar y O`Mullane,1996).

El presente plan de trabajo corresponde con una investigación descriptiva siguiendo un diseño no experimental transeccional, en cual se desea determinar el comportamiento de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora de la saliva sobre los niños en edad escolar con caries dental y gingivitis, considerando este grupo etario de mayor riesgo según informe de la OMS ( OMS, 2004).El estudio se realizará en saliva estimulada de parótida por ser la glándula cuyo flujo salival representa más del 50% del total de saliva estimulada, además de presentar características anatómicas que permiten su accesible manipulación para la

obtención de la muestra. La población estará formada por los niños en edad escolar que asistan al área de Odontopediatría I durante el primer trimestre del presente año, que para todo el año lectivo anterior (2004-2005) fue de 407 niños, por lo que para la selección de la muestra será por un proceso sistemático probabilístico que garantice la escogencia el azar, el tamaño de la misma se definirá según la varianza y el error que se determine en una prueba piloto.

Las técnicas para la recolección de la información, se iniciarán con la obtención de la saliva de parótida de los niños en edad escolar, en la que posteriormente se determinará la actividad enzimática de la peroxidasa, a través de un método de espectrofotometría, utilizando el guayacol como sustrato de oxidación. La capacidad tampón será medida a través de la titulación de la saliva de parótida. La prevalencia de caries y la presencia de gingivitis, se diagnosticará a través de los índices de CPO (Cariados, perdidos y obturados en dientes permanentes) índice gingival, índice de placa e índice de sangramiento. Finalmente el análisis de los datos se realizará a través de la estadística descriptiva.

Finalmente, el estudio sobre la actividad de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora de la saliva podrían ser considerados indicadores bioquímicos de riesgos de caries dental y/o enfermedad gingival, cuya influencia repercutiría en la toma de decisiones en la terapéutica y tratamientos preventivos. Así como, el desarrollo y empleo de materiales dentales novedosos o suplementos dietéticos innovadores, que potencien la actividad antimicrobiana de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora de la saliva, lo cual llevaría a disminuir la susceptibilidad a patologías bucodentarias.

## **EL PROBLEMA DE INVESTIGACION**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La cavidad bucal está formada por tejidos blandos y tejidos duros, colonizados por mas de 20 especies de microorganismos asociados, aunque se han logrado aislar mas de 200 especies en un mismo paciente durante un tiempo determinado. Todos estos conforman un complejo y dinámico sistema ecológico, habitado por cocos grampositivos, cocos gramnegativos, bacilos grampositivos, bacilos gramnegativos, protozoos como *Trichomona tenax* y *Entamoeba gingivalis*, hongos de las especies *Micoplasma spp*, *Candida albicans* y virus, quienes se distribuyen en los diferentes ecosistemas primarios de la mucosa, del dorso de la lengua, de las superficies dentarias y del surco gingival, en un medio acuoso representado por la saliva, la cual es excretada por glándulas especializadas, como la parótida, la sublingual y la submaxilar y glándulas accesorias. En conjunto comprenden la flora bucal, la cual es regulada por un conjunto de factores; los fisicoquímicos, los de adhesión, agregación y congregación microbiana, los de las fuentes nutricionales, los factores protectores del huésped y los de antagonicos interbacterianos. (Liebana, 2002).

Estos factores intervienen en el desarrollo del tipo de microflora bucal, ya que favorecen la subsistencia de especies con rutas metabólicas específicas, ejemplo de lo descrito se observa, con la temperatura óptima de las enzimas y de las proteínas de los microorganismos, que debe ser similar a la corporal del huésped, con posibilidad de soportar cambios extremos de temperatura durante la ingesta de la dieta, sin llegar a desnaturalizarse. Así también, el pH ó grado de acidez o alcalinidad del ecosistema bucal que oscila entre 6,7 y 7,5, valores en los que se debe conservar la actividad biológica de proteínas, péptidos y enzimas de los microorganismos.

Sin embargo, los valores de pH pueden variar según la dieta del individuo y la capacidad amortiguadora de la saliva. Esta última, corresponde a la propiedad de la saliva para mantener la concentración de iones de hidrogeniones (pH), neutralizar los ácidos y los álcalis que se originan del metabolismo microbiano o que provienen de la dieta, es decir, que impide que disminuya el pH de la placa dentobacteriana. Es oportuno señalar que dicha función es atribuible al sistema bicarbonato-ácido carbónico, en especial durante la excreción de saliva estimulada, empero el ión fosfato tiene una participación importante durante el flujo salival no estimulado. (Lagerlof y Oliveby, 1994, Humphrey y Williamson, 2001).

Otro factor, que participa en el ecosistema bucal, es el potencial de óxido-reducción que condiciona según la región, valores entre +60 mV a +360 mV ó entre -200 mV hasta -360 mV, por lo cual el metabolismo aerobio estricto de microorganismos exige ambientes con oxígeno, y el de anaerobios estrictos, nichos con potencial redox muy reducidos. Precisamente, como producto de sistemas enzimáticos de óxido-reducción, se forman sustancias tóxicas como el peróxido de hidrógeno que afectan la integridad celular del huésped y de otros microorganismos, en este último actuando como antagonistas interbacterianos. En este sentido, la saliva presenta la peroxidasa salival o lactoperoxidasa que es una enzima que cataliza la oxidación de iones de tiocianato (SCN<sup>-</sup>), provenientes de la dieta, empleando el peróxido de hidrogeno como agente reductor, y generando como producto, el hipotiocianato y agua que son moléculas menos tóxicas para las células de la mucosa bucal (Lagerlof y Oliveby, 1994, Tenovuo, 2002).

Además, según el valor del pH del medio bucal, el producto catalítico de la peroxidasa salival puede ser el hipotiocianato (OSCN) a pH neutro, o el ácido hipotiocianato (HOSCN) a un pH ácido, estos productos inhiben enzimas como la hexoquinasa, gliceraldehído 3 fosfato, y otras enzimas claves de la glicólisis microbiana, así como también, actúa en la inhibición del sistema de transporte de azúcares, en la inhibición de transporte de aminoácidos como la lisina y ácido

glutámico, y altera el gradiente electroquímico de la pared bacteriana. (Tenovuo y Pruitt ,1984, Pruitt 1987, Liebana, 2002, ).

Con lo expuesto, una efectiva capacidad amortiguadora de la saliva permite mantener el pH entre, 6.5 y 7.0, de la Peroxidasa salival y por lo tanto conservar la actividad biológica para la desintoxicación de moléculas, como el peróxido de hidrogeno y moléculas carcinógenas, como productos nitrosados. Así como, la acción antimicrobiana, que resulta de inhibir temporalmente el crecimiento, respiración y metabolismo de algunas bacterias peroxigénicas y no peroxigénicas. Adicionalmente, el sistema buffer neutraliza los ácidos que son productos del metabolismo bacteriano de la ruta glicolítica (ácido pirúvico, ácido láctico o ácido acético), y los cetoácidos originados en la desaminación de aminoácidos (Rioboo, 1994, Humphrey y Williamson, 2001).

Otro evento a mencionarse, es aquel que se presenta en la placa dentobacteriana con predominio en la producción de polisacáridos extracelulares como glucanos y fructanos, específicamente de glucanos acuoin soluble, con enlaces  $\alpha 1,3$ , cuya estructura se caracteriza por ser tridimensional filamentosa y estable con microcanales, los cuales actúan disminuyendo la permeabilidad de metabolitos como los ácidos formado en la placa dentobacteriana, lo que permite que el pH bajo se mantenga sobre la superficie dentaria. (Takehara y col, citado por De Ugarte, 2002).

No obstante, en una placa dentobacteriana con una estructura que permita la movilización dinámica de iones como el bicarbonato y fosfato provenientes de la saliva a su interior, facilitarían la actividad buffer y se amortiguaría los ácidos formados en su interior impidiendo la disminución del pH por debajo de 5.1, considerado como critico porque aumenta la solubilidad del tejido mineralizado del diente. Asimismo, la difusión dinámica en su interior de metabolitos como tiocianato y enzimas como la peroxidasa salival beneficiarían con su función destoxificante y antimicrobiana evitando que los microorganismos de la placa

alcancen invadir tejidos del periodonto, los colonicen y se multiplique, lo que obviamente aumentaría su potencial de virulencia (Tenovuo y col.,1991, ob.cit).

Entonces, resulta interesante la pregunta ¿La actividad de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora de la saliva, se encuentran afectadas en pacientes con caries dental y gingivitis?

En consecuencia, la posibilidad de responder a la interrogante propuesta, se orienta a recordar que, entre las glándulas salivales, la parótida es la de mayor contribución representado 50% de la saliva estimulada excretada. Además anatómicamente es la de mayor tamaño y peso, con el conducto excretor que se abre en el interior de la cavidad bucal, visiblemente identificado, en una papila opuesta al primer molar superior (Humphrey y Williamson, 2001), y su composición incluye entre otras moléculas a la peroxidasa salival, al ión tiocianato, y al sistema buffer, los cuales desempeñan su función primeramente sobre los tejidos relacionados adyacentes, tales como, la mucosa yugal posterior, la encía del segundo premolar, del primer molar superior, y del segundo molar superior, y sus respectivas unidades dentarias.

Por lo tanto, se propone determinar la actividad de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora en la saliva de parótida, en niños escolares con caries dental y gingivitis en zonas adyacentes del conducto excretor de la parótida, considerándose a este grupo etario con mayor prevalencia de caries dental

#### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la actividad de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora de saliva de parótida, en niños en edades comprendidas entre los 9 y 12 años con

caries dental y gingivitis, que asisten al área de Odontopediatria I de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- Determinar la actividad enzimática de la peroxidasa de saliva de parótida en niños en edad escolar.
- Medir la capacidad amortiguadora de saliva de parótida en niños en edad escolar.
- Diagnosticar la prevalencia de caries dental en niños en edad escolar.
- Diagnosticar la presencia de gingivitis en niños en edad escolar.

### **JUSTIFICACION**

La capacidad amortiguadora de la saliva es principalmente regulada por la presencia del sistema bicarbonato - ácido carbónico, por el ión fosfato y las proteínas salivales, quienes les proporcionan al complejo ecosistema de la cavidad bucal una resistencia a los cambios de pH, después de la acción de ácidos y álcalis formados por microorganismos o provenientes de la dieta, lo cual mantiene el pH entre 6.7 y 7.5, evitando que se alcancen valores inferiores a 5, especialmente sobre las superficies dentarias que evidentemente favorecerían la disolución de los cristales de hidroxiapatita y por lo tanto, el desarrollo de la caries dental.(Edgar y O`Mullane,1996, Robinson y col, 2000)

Del mismo modo, el efecto buffer de la saliva contribuye a mantener la actividad de la peroxidasa salival la cual origina productos oxidados como el hipotiocianato y el ácido hipotiocianato que regulan el crecimiento y la respiración de la flora de la cavidad bucal, además, inactiva en su proceso catalítico moléculas como el peróxido de hidrógeno (originadas a partir del metabolismo microbiano) y componentes carcinogénicos y mutagénicos (provenientes de la dieta), inclusive la efectividad de la enzima puede evitar que

se desencadenen estímulos para la activación de los procesos inflamatorios de tejidos como el periodonto y la proliferación de microorganismos patógenos.(Tenovuo y col, 1981, Liébana, 2002).

Por lo anteriormente presentado, la determinación de la capacidad amortiguadora de la saliva y de la actividad catalítica de la peroxidasa salival, pueden constituir indicadores, para el diagnóstico de una condición de riesgo de enfermedades con tan alta prevalencia como la caries dental y la enfermedad periodontal, según la OMS, así como también, podría ser empleado en la odontología preventiva a través de novedosos materiales dentales que puedan potenciar estas propiedades de la saliva, o actuar de forma sinérgica para disminuir los riesgos de patologías bucales como la caries dental o enfermedades periodontales para el pronóstico y manejo terapéutico.

## **MARCO TEORICO**

### **Antecedentes**

El estudio de las funciones de la saliva, específicamente de la función antimicrobiana, proporcionada en gran parte por la enzima peroxidasa salival, es referido desde la década de los años cincuenta. Las primeras investigaciones fueron realizadas por Wolfe y Turner, en 1957 sobre la actividad de la peroxidasa salival, y Kraus y col ,en 1958 sobre la catalasa y peroxidasa salival en sujetos normales y en personas con enfermedades periodontales, ambos citados por Tenovuo, 1976. Los resultados encontrados, sugieren que los promedios de peroxidasa fueron significativamente mas altos en sujetos con enfermedades periodontales o caries extensas que en sujetos sanos. Sin embargo, otro estudio desarrollado posteriormente contradice a lo anterior, pues para 1967 en Tokyo, Kato y Nagatsu realizan un estudio sobre la actividad de la peroxidasa en humanos normales y con enfermedades orales, obteniendo como conclusión, que no existen diferencias en la actividad de la enzima entre los sujetos sanos y

aquellos con bajo grado de caries, aunque en pacientes con alto grado de caries, periodontopatías o estomatitis aftosa se observó, una disminución en los valores de peroxidasa salival (citado por Tenovuo, 1976).

En Finlandia en la década de los setenta, se desarrollaron trabajos como los presentados por Makinen , Tenovuo y Scheinin en 1976, en el que se estudió las propiedades bioquímicas de la peroxidasa salival, la placa y exudado gingival, sus conclusiones expresaron que no hubo diferencias claras en el potencial redox entre los grupos de azúcares, lo que se evidenció en la selectividad de varios azúcares en afectar la enzima y otros productos de las glándulas salivales, se observa además, que el grupo xilitol induce el incremento de la actividad de la lactoperoxidasa y las propiedades carioestáticas (que puede ser relacionada con un fenómeno dado por las propiedades de la lactoperoxidasa). En el mismo año, Tenovuo publicó un trabajo sobre las variaciones de la peroxidasa salival en personas con diferente salud oral, los experimentos se desarrollaron en una muestra de 18 sujetos a los que se le recolectó la saliva total y se estudió la actividad de la peroxidasa salival, las proteínas totales y los iones de tiocianato, así también los registros de caries y condición gingival, resultando que la actividad de la peroxidasa depende de la concentración de iones de tiocianato y del peróxido de hidrógeno, y que los pacientes con alta prevalencia de caries y gingivitis severa presentaron una alta actividad de peroxidasa salival.

También en 1976, Tenovuo y Valtakoski, estudiaron en Finlandia, la correlación entre la actividad de la peroxidasa salival, el flujo de tasa salival, y los potenciales de oxido- reducción de la saliva humana y suspensiones de placa dental. El trabajo se realizó en 18 sujetos y se concluyó que no existía correlación en la actividad de la peroxidasa, potenciales de oxido- reducción y flujo salival con los registros clínicos del grupo estudiado. Cinco años después, en los Estados Unidos, 1981, Tenovuo, y col, investigaron la inhibición de ácidos de la placa bacteriana por el sistema antimicrobiano de la lactoperoxidasa salival, el estudio se realizó en 11 sujetos con apariencia de salud bucal, reportando que la

producción de ácidos por la placa bacteriana, está inversamente proporcional a la concentración de hipotiocianato y que la suplementación con peróxido de hidrogeno y tiocianato, pueden producir una cercana inhibición total de la producción de ácidos de la placa bacteriana.

En 1982, Tenovuo, Pruitt y Thomas, publican en los Estados Unidos, niveles de hipotiocianato en saliva en reposo y estimulada, en el cual se observó, que la actividad antimicrobiana del sistema peroxidasa es proporcional a las concentraciones de hipotiocianato y es más efectivo en saliva en reposo, que estimulada. Otro estudio realizado por Pruitt , Mansson-Rahemtulla y Tenovuo (1983), se reportó, que en el conducto de stenson, hay concentraciones de hipotiocianato, similar al encontrado en saliva total, por lo cual existen cantidades de peróxido de hidrogeno, dentro de la glándula parótida, y el aumento de los niveles de hipotiocianato dependen en la saliva, de peróxido, pH y tiocianato. Posteriormente Mandel y col, en 1983, realizaron un trabajo en saliva de parótida y de glándula submandibular, en las cuales se determinaron concentraciones de lactoperoxidasa, tiocianato y el hipotiocianato preformado en la glándula, para los pacientes caries resistentes y los pacientes caries susceptibles, en el cual se reportó, que no existen diferencias importantes en los componentes de la saliva de cada grupo, aunque el tiocianato, fue más alto en la saliva no estimulada que en la estimulada para ambas glándulas y la tasa de flujo de saliva fue mayor en la glándula submandibular.

En 1984, en los Estados Unidos, Smith y col. ,reportaron un estudio realizado en 8 sujetos, a los que se les colocó durante 3 semanas un *Overlay* (estructura que cubren las caras de los dientes) y a los cuales se les sometió a ninguna higiene bucal. Durante el experimento, se observó un incremento en la actividad de la peroxidasa salival, la cual decreció posteriormente con la aplicación de higiene bucal. Otra publicación fue presentada por Tenuovo y Larjava en 1984, sobre el efecto protector de la peroxidasa, utilizando fibroblastos gingivales marcados con un isótopo, concluyendo que la formación de un

producto altamente oxidado como el hipotiocianato, formado a partir de peróxido de hidrogeno y tiocianato en presencia de la peroxidasa salival, no afecta a la célula, por lo que tiene un efecto protector ante la formación del peróxido de hidrogeno, además de exhibir una acción antimicrobiana frente a patógenos orales.

Un estudio realizado en 1985 por Rudney y col., reveló que las variaciones en los niveles de las proteínas se atribuyeron a variaciones en la tasa de flujo salival y a los estados de estimulación salival y en el caso de la inmunoglobulina A secretora, exhibió variaciones aparentemente debido a cambios térmicos cortos. En 1986, en U.S.A., Mansson-Rahemtulla y col, estudiaron la tasa de oxidación de la peroxidasa y mieloperoxidasa a través de espectofotometría, en el cual se encontró que la mieloperoxidasa cataliza la formación del ion cloruro y del ion tiocianato, a diferencia de la peroxidasa salival que solo este último. En 1988, Mansson-Rahemtulla y col., presentaron un estudio en el cual la peroxidasa salival fue purificada por inmutafinidad, intercambio cationico y afinidad cromatográfica, resultando que la lactoperoxidasa bovina y la peroxidasa salival presentan la misma composición de aminoácidos y solo difieren de la composición de carbohidratos, ya que la lactoperoxidasa bovina presenta 7% de carbohidratos y la peroxisada salival 4,6%, de los cuales la tasa de glucosamina a galactosamina fue para la lactoperoxidasa bovina 3:1 y la peroxidasa salival 3:1 y la cantidad de manosa, fucosa y galactosa fue para la lactoperoxidasa bovina 14.9 , 0.5, 1.0 y para la peroxidasa salival fue 1.5, 1.5, 1.0 respectivamente.

Finalizando la década de los ochenta, Rudney en 1989 realizo en Minesota, USA, un estudio en 198 sujetos que concluyó que la lisozima y la peroxidasa salival presentan variaciones comunes seguidas de la Ig A secretora. En el mismo año, se desarrollo un trabajo en niños, desarrollado por Hyypa y col. en una muestra de 33 niños en edad predentaria a edad dentaria, a la que se le analizó la saliva total cada factor, como lisozima, lactoperoxidasa, lactoferrina, mieloperoxidasa, tiocianato, hipotiocianato, IgA secretora Ig G, Ig M y proteínas

totales, se obtuvo como conclusión, que las sustancias antimicrobianas no se afectan por la erupción dentaria y con excepción del hipotiocianato y Ig M el sistema antimicrobiano en los niños es aún inmaduro.

En la década de los noventa, en U.S.A., Pruitt y col. estudiaron, las concentraciones de la lactoperoxidasa bovina, peroxidasa salival humana y mieloperoxidasa humana utilizando diferentes donadores de electrones como, pyrogallol, guaiacol, 2,2, azinobis y tiocianato, concluyendo que la peroxidación depende de las concentraciones de peróxido de hidrogeno. También al inicio de la década en 1991 Tenovuo, Lumikaru y Soukka, realizaron en Finlandia, demostraron que la combinación de la lisozima, lactoferrina, y peroxidasa salival, en la incorporación de productos de salud bucal, tienen efectos anticariogénicos que parecen ser prometedores.

Para 1995, Azcurra y col. desarrollaron una investigación en Argentina de tipo comparativo, en dos ciudades Sampacho con niveles de flúor de 9,05 mg/l y Porteña con niveles de flúor de 0,19 mg/l, se observó que los niveles de calcio, fosfato, tiocianato, proteínas totales e Ig A secretor, fue similar en ambas zonas y entre niños con experiencia de caries y sin experiencia de caries. Dos años después, es decir 1997, Dodds y col. demostraron en una muestra de 85 adultos jóvenes con caries activas y libres de caries, que no existen diferencias en el flujo salival o pH, pero la capacidad buffer presento diferencias entre hombres y mujeres de la muestra. La concentración de proteínas totales y proteínas individuales fue mayor en el sexo femenino, además el potasio y el cloruro se observaron con niveles más altos, en grupos de caries activa.

En 1999, en Alemania, Rocín, y col. estudiaron la actividad de la lisozima y peroxidasa salival en saliva total estimulada en relación con registros de placa y gingivitis en 140 jóvenes masculinos saludables, entre 18-30 años a los que se les determinó índice de placa, índice de sangramiento y fluido crevicular,

concluyendo que no existe correlación significativa entre la actividad de la peroxidasa salival y la lisozima y la condición de salud gingival de los pacientes.

En Moscú, Leont'ev y col. para el 2002, presentaron un trabajo en saliva total en 20 sujetos con edades comprendidas entre 16-20 años con diferentes tipos de caries, demostrando que existen diferencias significativas entre pH y densidad óptica. En pacientes con grandes caries, se evidenció, un bajo pH salival y una alta densidad óptica. Otra investigación realizada en Alemania por Jentsch, Beetke, y Gocke durante el año 2004 se llevo a cabo en un grupo de voluntarios, en un período de 4 años, a los cuales se les analizó el flujo salival, pH, lisozima, lactoferrina y tiocianato, IgA y proteínas totales, en muestras de saliva total, estimulada y no estimulada, para evaluar estas variables en el tiempo a un grupo en 4 años. Este estudio concluyó, que una baja incidencia a caries se debió, a un alto flujo salival y bajos niveles de lisozima y lactoferrina, en saliva no estimulada y la presión parcial de CO<sub>2</sub>, fue de gran importancia en la saliva estimulada.

En el 2005, Hu y Col, publicaron en USA un trabajo sobre las proteínas presentes en saliva humana a través de cromatografía de líquido/espectrofotometría de masas, y espectrofotometría bidimensional. En este trabajo se analizó el proteoma salival humano, en el que se catalogó 309 proteínas, entre las cuales se identificó a la peroxidasa salival.

## **BASES TEORICAS**

### **La saliva y sus propiedades:**

La saliva es un fluido hipotónico formado por las células acinares y células ductales de las glándulas salivales, las tres principales son la glándula parotida, la glándula sublingual y la glándula submandibular, además existen entre 600 y 1.000 glándulas salivales menores distribuidas en la cavidad bucal y la orofarínge. El promedio diario de saliva total varia entre 1 y 1,5 litros al día

durante el flujo no estimulado, el aporte de las principales glándulas salivales es de 20% por la parótida, 65% por la submandibular y 6-7% por la sublingual, sin embargo durante el flujo estimulado la parótida proporciona hasta el 50% de la excreción total (Humprey y Williamson, 2001).

La glándula salival parótida es la más grande y presenta una forma triangular, cuya base esta cubierta por la facial superficial y la cápsula parotídea, se ubica en la zona parotídea de la región anterolateral del cuello, frente a la oreja y detrás de la rama ascendente de la mandíbula, pesa aproximadamente entre 14 y 28 gramos, su conducto excretor emerge del borde anterior de la glándula conocido como el Stensen o Stenon, cuyo orificio de salida es a nivel del primer molar superior, aunque existe bibliografía que refiere la desembocadura de este en el segundo molar superior (Giglio, y Nicolosi, 2000). El desarrollo embriológico de la parótida se inicia entre la cuarta y sexta semana de vida embrionaria por la proliferación de un cordón celular desde el epitelio del estomodeo, dentro del ectomesénquima, donde se ramifica para dar origen a las células acinares y las células ductales de la glándula. Su inervación está asociada a las ramas periféricas del nervio facial y glossofaríngeo. El nervio glossofaríngeo vía del ganglio ótico, y la vía simpática post ganglionar del ganglio cervical.

La glándula submandibular tiene un peso promedio entre 10 y 15 gramos, se localiza en entre los vientres anterior y posterior del digástrico y borde inferior del cuerpo de la mandíbula, el conducto excretor se ubica en la parte anterior del piso de la boca por dentro de los conductos excretores de la glándula sublingual y se le denomina Warthon. El desarrollo embrionario es similar para todas las glándulas salivales, aunque para la submadibular es durante la sexta semana. Su inervación está dada por los nervios eferentes parasimpáticos del facial vía del ganglio submandibular.

La glándula salival sublingual es un agrupamiento de varias glándulas que se encuentra entre los limites de la fosita sublingual, la lengua, el músculo

milohioideo y la mucosa del piso de la boca, sus conductos son conocidos como de Walther, y el mas grande es el conducto excretor de Rivinus o de Bartholino, que desembocan en forma de papilas cercanas a las carúnculas sublinguales. El desarrollo embrionario ocurre durante las ocho y doce semanas de gestación, y su inervación está relacionada con los nervios facial y glossofaríngeo (Edgar y O'Mullane, 1996, Gómez y Campos, 2004).

El tejido glandular está formado por células epiteliales acinares, células mioepiteliales que rodean los acinos y se contraen durante la estimulación neural y las células epiteliales del sistema ductal, este último se clasifica como intercalares, representan el primer ducto y conecta las secreciones del acino al resto de la glándula, los conductos estriados son secundarios en la conexión y mantienen un dinámico intercambio iónico que modifica la composición final de electrolitos en la saliva y excretor o ducto final (Humphrey y Williamson, 2001).

La secreción del fluido y de las macromoléculas son procesos que ocurren por separado, y son controlados por el sistema nervioso autónomo, los nervios parasimpáticos que inervan los acinos glandulares, regulan la secreción del fluido y la secreción de electrolitos; los nervios del sistema simpático regulan a través de los receptores adrenérgicos la secreción de macromoléculas como las proteínas, las enzimas y los péptidos. (Edgar y O'Mullane, 1996)

El fluido y secreción de electrolitos se inicia con el estímulo de los receptores muscarínicos en la membrana de las células acinares donde se fija el neurotransmisor (acetilcolina), interacción que activa a la proteína G dependiente de GTP, que a su vez activa otras enzimas claves intracelularmente. Durante el acoplamiento de los receptores muscarínicos y la proteína G se activa la fosfolipasa C, que es una enzima localizada en la membrana celular, que cataliza la hidrólisis de un fosfolípido (fosfo-inositol-bifosfato) en inositol trifosfato y diacilglicerol. Este último con funciones en el citoplasma de la célula como segundo mensajero y el inositol trifosfato, que actúa en la movilización del calcio,

activando la liberación de calcio que abre los canales de cloruro de la célula acinar y eleva la secreción del fluido (ob cit).

En los acinos, el cloruro de sodio y el agua proceden de la sangre y por un sistema de transporte activo dependiente de la bomba sodio-potasio, el sodio y el cloro entran dentro de la célula. Cuando hay estimulación, el cloruro sale hacia el lumen por canales dependientes de la concentración del calcio intracelular y el sodio sale por un sistema de cotransporte secundario. Una vez que el sodio y el cloruro son transportados al lumen del acino (primera saliva hipertónica) inmediatamente se restablece el balance porque el agua llega de la sangre por osmosis, las concentraciones de esta no se modifican a lo largo del sistema ductal, lo que genera una saliva mas hipotónica que la sangre (ob cit).

El origen del bicarbonato presente en la composición de la saliva es del dióxido de carbono que proviene de la sangre y que intracelularmente es catalizado por la anhidrasa carbónica que da como producto final bicarbonato e ión hidrogenión, el cual vuelve a la sangre por un sistema de transporte dependiente del sodio, lo que contribuye a mantener el pH intracelular. Se piensa que el canal del cloruro es el mismo que el del bicarbonato y por lo tanto ambos actúan de forma competitiva por dicho canal (ob cit).

La secreción de las macromoléculas se presenta posteriormente a la síntesis y almacenamiento, que se inicia con la estimulación de los receptores adrenérgicos de la membrana celular de las células acinares, los cuales se ligan a la noradrenalina y se acoplan a la proteína G generando la activación de la adenilato ciclasa y la síntesis del AMPc que actúa como segundo mensajero activando la proteína K que fosforila las proteínas claves estimulando la transcripción de genes en las proteínas salivales y la modificación postranslacional de los péptidos y proteínas, estimula la maduración y transporte de las vesículas a la membrana apical de las células, además que permite la exocitosis. Sin embargo, la secreción de las proteínas pueden ser sin estimulación

por flujo continuo de las mismas hacia la membrana apical de la célula. Otra forma de secreción diferente a la estimulación adrenérgica o colinérgica son dadas por un polipéptido intestinal vasoactivo, que estimula la secreción por incrementos del AMPc. (ob cit).

La excreción salival tiene una tasa de flujo que varía entre las personas, que puede llegar hasta el 50% dependiendo del ritmo circadiano (Ferguson y col, citado por Chezzi, Lange y Ship, 2000). El flujo circadiano mas bajo es durante la noche que es cercano a cero (0), sin embargo, el rango promedio de tasa de flujo en la saliva no estimulada es 0,3 ml por minuto y en la saliva estimulada la tasa promedio es 7 ml por minuto. Aunque, para saliva no estimulada debe tener un valor por encima de 0,1 ml por minuto y en la estimulada el volumen mínimo es 0,2 ml por minuto. Se ha reportado que la saliva estimulada contribuye entre el 80% y 90% del promedio diario de saliva producida en un día (Humphrey y Williamson, 2001).

La disminución del flujo salival se le puede atribuir a diferentes causas como el consumo de drogas y medicamentos como analgésicos no narcóticos (ibuprofeno, fenoprofeno y piroxican) y analgésicos narcóticos (sulfato de morfina, clorhidrato de hidromorfina, oximorfina y fentanil), supresores del apetito entre los que se encuentran las anfetaminas, benzatamina y bifetamina y los no anfetaminas como ferfermina y fendimetrazina. También se ha observado disminución en la secreción salival de los pacientes que utilizan preparaciones anti-acné como isotretinoína, o ingieren antiespasmódicos como clorhidrato de oxibutina, clorhidrato de flavoxate, atropina , escopolamina, bromuro de clidino, clorhidrato de diclomina entre otros. Además, el consumo de antidiarreicos como loperamida, antiemeticos como difenidol, antihistaminicos, antihipertensivos, antiparkinsonianos como clorhidrato y lactato de biperide, diuréticos, psicotrópicos, y antimaníacos como el lítio. Otro factor que influye son las radiaciones ionizantes, ya que causan fibrosis, degeneración y necrosis celular en las glándulas salivales, se observan los síntomas después de la segunda semana de tratamiento con radiaciones, en especial en pacientes que recibieron 4000 rads.

Las enfermedades sistémicas igualmente influyen en la disminución del flujo salival, especialmente al existir una destrucción del parénquima de las glándulas salivales, como se experimenta en la enfermedad autoinmune como el síndrome de Sjogren, o las enfermedades del colágeno, tales como el lupus eritematoso sistémico. También, la cirrosis biliar y la tiroiditis autoinmune, o en las enfermedades endocrinas como la diabetes (Garroni, 1998).

Las consecuencias se evidencian en la disminución de las funciones de la saliva que obviamente afectan la digestión de los alimentos y el aumento a la susceptibilidad de los tejidos bucales a enfermedades. Se conocen 4 parámetros clínicos para diagnosticar la hiposecreción salival: labios secos, sequedad en la mucosa bucal, ausencia de salivación a la palpación de las glándulas y aumento de los registros de CPO (Humphrey y Williamson, 2001).

La saliva es mucoserosa, levemente acídica, especialmente cuando es no estimulada, presentando valores de pH entre 6 y 6,5, teniendo una concentración de bicarbonato de 1,3 mM y fosfato de 5mM pero, en condiciones de estimulación se alcanza un pH entre 7,5 y 8, presentando una concentración de bicarbonato elevada de 30-60 mM y de fosfato disminuida de 2mM. La composición de la saliva involucra a una variedad de iones cuyos valores son el sodio es 5-25 mM, el potasio 15-30 mM, el cloruro 15-30 mM, el calcio 1-2 mM, fósforo 2-20mM., el magnesio 0,2-0,5 mM. Así como, el tiocianato 0,1-2 mM, el bicarbonato 2-30 mM y la urea, 1-7 mM. La composición orgánica, en la cual los ácidos grasos alcanzan valores de 0,01 g/L, la glucosa de 0,05mM, los uratos de 0,2 mM, y su contenido de proteínas de 1,5-2,5g/L. Las mas proteínas abundantes son las glicoproteínas salivales o mucinas, las proteínas aniónicas, amilasa salival, cistatinas, anhidrasa carbónica, estaterina, peroxidasa salival, histatinas, inmunoglobulinas entre otras (Lozano y col, 2000).

Las funciones de la saliva pueden clasificarse en cinco categorías, la de lubricación de la mucosa, digestión y sabor, mantenimiento de la integridad de los

tejidos, propiedad buffer y propiedad amortiguadora. La lubricación y protección que evita que agentes irritantes como químicos exógenos y cigarro lesionen la mucosa, además, de disminuir la acción de enzimas proteolíticas provenientes de la placa bacteriana, y la desecación producto de la evaporación del agua de la cavidad bucal. Son las glicoproteínas las principales protagonistas de esta propiedad, se ha demostrado que en la saliva humana se han aislado dos tipos de mucinas genéticamente distintas MG1 y MG2 originadas de los genes MUC5B y MUC7 respectivamente, la MG2 tiene dos formas MG2a y MG2b, aun más, se han hallado en polimorfismo en el gen MUC7. Y la MG1 tiene tres diferentes formas dependiendo del ácido siálico y del sulfato que contenga.

Las mucinas tienen una estructura similar compuesta por monómeros de cadenas pesadas polipeptídicas altamente glucosiladas (mas de 20 residuos de carbohidratos heterogéneos) cuyo peso molecular es mayor en la MG1, esta ultima se precipita sobre los dientes y contribuye a formar la película adherida del diente, por lo cual lo protege de los cambios de pH, también forma complejos con otras proteínas salivales y puede constituir una fuente de nutrientes para la flora bacteriana de la cavidad bucal, por lo cual se encuentra en niveles altos en pacientes susceptibles a caries dental, ya que modula la colonización bacteriana. La MG2 (125 kDa) presenta menor peso molecular con bajas propiedades viscoelásticas, los carbohidratos predominantes son disialcilitos y trisacáridos, y participa en interacción con bacterias ya que sus componentes son receptores para estas ultimas (Humphrey y Williamson, 2001, Nieuw, y Veerman ,2002).

La función digestiva de la saliva se le atribuye a las enzimas digestivas que son secretadas como la amilasa salival la cual esta glucosidasa, que rompe los enlaces  $\alpha$ 1,6 del almidón, o enzimas digestivas que se encuentran suspendidas en este fluido como la lipasa lingual, que actúa sobre ácidos grasos muy emulsionados. Adicionalmente, la capacidad de saborear los alimentos es favorecida por la característica hip tonicidad de la saliva y el gusteno, que es una proteina que se une al zinc y el permite el desarrollo de los corpúsculos

gustativos. La propiedad sobre el mantenimiento de la integridad del diente se le atribuye a la estaterina constituida por un péptido de 43 aminoácidos con alta carga negativa aminoterminal que contribuye a la estabilización de las sales de calcio y fosfato evitando su precipitación y permitiendo su disponibilidad en el proceso de desmineralización-remineralización del esmalte. Así como inicia la formación de la película adquirida conjuntamente con otras proteínas como la histatinas, las cistatinas que están implicadas en el control de la mineralización y en la inhibición de la actividad de enzimas cisteína proteinasas, y proteínas ricas en prolina que corresponden a un grupo de proteínas con 100 hasta 150 aminoácidos con la habilidad de inhibir la precipitación espontánea de las sales de fosfato de calcio. Todas participan en la unión a la hidroxiapatita, ayudando a controlar el crecimiento bacteriano y la penetración de minerales dentro del esmalte (Lagerlof, Oliverby, 1994, ob cit).

La capacidad buffer o amortiguadora de la saliva se le atribuye al sistema bicarbonato, fosfato, urea, proteínas anfotéricas y enzimas, aunque el bicarbonato es el sistema más importante, ya que mantiene el equilibrio ácido-básico de la ecología bucal e inclusive se difunde dentro de la placa y neutraliza los ácidos formados por las bacterias acidogénicas. Finalmente, la propiedad antibacteriana se le atribuye a proteínas con actividad inmunológicas y no inmunológicas. En el primer grupo se encuentran las inmunoglobulinas siendo más notablemente la IgA secretora, tiene actividad de agregación bacteriana, neutraliza también virus, aunque también están presentes IgG e IgM. Estas se originan en las células plasmáticas del tejido conjuntivo y por transporte transepitelial llegan desde la sangre y atraviesan las células acinares (endocitosis-exocitosis) y formando parte de la saliva.

Las no inmunológicas son proteínas como la lisozima, cuya función catalítica se relaciona con la actividad lítica sobre la pared bacteriana. La lactoferrina que tiene efectos bacterioestáticos, debido a que captura el hierro, disminuyendo la disponibilidad del micronutriente bacteriano. Además, la

peroxidasa salival es una enzima antimicrobiana que cataliza la reacción de productos catabólicos de las bacterias como el peróxido de hidrógeno con el tiocinato proveniente de la saliva, para así formar productos oxidados como el hipotiocinato en un medio con pH neutro y ácido hipotiocianoso en un medio de pH ácido. Estos productos son altamente tóxicos para el metabolismo bacteriano, como *S. mutans* y *Lactobacillus* (Lagerlof, y Oliver, 1994, ob cit, Nieuw y Veerman E, 2002).

### **Peroxidasa Salival**

En la boca humana, la actividad de la peroxidasa salival es derivada de los acinos de las glándulas salivales (peroxidasa salival), o de los leucocitos que entran a la cavidad bucal a través del epitelio crevicular gingival (mieloperoxidasa) (Makinen y Tenuovo, 1976).

Takahiro y col. (2003), realizaron un estudio para discriminar entre la importancia de la peroxidasa salival y la mieloperoxidasa como sistemas antimicrobianos, reportando que cuando midieron la evolución del oxígeno dependiente del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se debió principalmente a la actividad de la peroxidasa.

La importancia biológica de la peroxidasa salival, ha despertado un gran interés a lo largo de tiempo. Esta enzima, ha sido secuenciada en saliva humana (Kiser y col., 1996), clonada y secuenciada en el mosquito *Anopheles* (Ribeiro y Valenzuela, 1999), purificada en dos pasos cromatograficos (Marcozzi, 1996), estudiada en pacientes con sida (Vucicevic-Boras y col., 2003) y determinada en liquido amniótico (Armstrong y col, 1976), constituyendo así, uno de los sistemas con mayor contribución en el mantenimiento de la salud bucal.

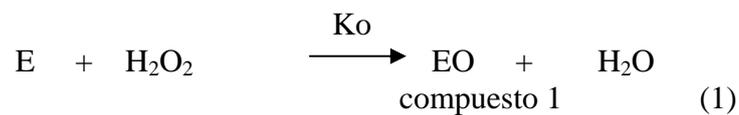
Las peroxidases tiene la clasificación E.C. 1.11.1.7, caracterizada por ser hemoproteínas que catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido. Las hemoperoxidasas de animales, como la peroxidasa de la tiroides, la lactoperoxidasa (leche de bovino), la peroxidasa salival, la mieloperoxidasa y la peroxidasa de eosinófilos son proteínas grandes (>700 aminoácidos), presentan un grupo hemo unido covalentemente a la enzima y tienen sitios para unir  $\text{Ca}^{++}$  (Torres, 2002). La lactoperoxidasa de la leche junto con la peroxidasa de la saliva son capaces de oxidar iones tiocianato a hipotiocianato que es tóxico para algunos microorganismos.

La peroxidasa salival humana es con frecuencia llamada lactoperoxidasa o sialoperoxidasa (Revis, 1977), debido a su similitud bioquímica e inmunológica con la peroxidasa de la leche bovina. El patrón cromatográfico de la lactoperoxidasa salival es similar la lactoperoxidasa de la leche de bovino purificada. Estas se presentan en dos formas diferentes, un monómero y una forma agregada (Tenovuo, 1981). El punto isoeléctrico de la lactoperoxidasa salival es de 8.1, sin cambios en la forma agregada. Además, son similares en la composición de aminoácidos, en el espectro de luz visible y ultravioleta, son termoestables y en que ambas son inactivadas con 2-mercaptoetanol (Mansson-Rahemtulla y col. 1988).

Esta enzima ha sido purificada en muestras de saliva de parótida, para estudios de inmutafinidad, intercambio iónico y cromatografía por afinidad. Geles de electroforesis SDS-PAGE, mostraron tres bandas en teñido con comassie blue. Los pesos moleculares aparentes fueron de 78Kd, 80Kd y 280Kd, con actividad enzimática (Mansson-Rahemtulla, y col., 1988). Por otra parte, Hu y col., realizaron espectrofotometría de masa y electroforesis bidimensional, en la peroxidasa salival purificada, reportando un peso molecular de 80.287 d y un punto isoeléctrico de 8,89.

Por otro lado, los ensayos enzimáticos rutinarios para la peroxidasa se basan en la peroxidación de los siguientes sustratos (revisado por Mansson-Rahemtulla, 1986): guayacol, pyrogallol, benzidina, tetrametilbenzidine, p-phenilenadimino y el 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotriazol-6-ácidosulfónico) (ABTS). Estos ensayos requieren la medida espectrofotométrica de la tasa de incremento o decrecimiento expresado en absorbancia, que resulta de la oxidación del sustrato.

El sistema es complejo, pero, las reacciones principales, pueden resumirse así:

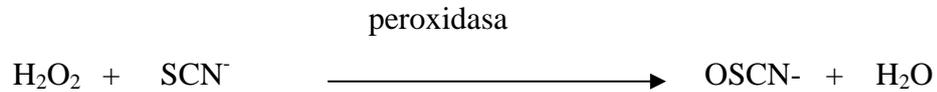


**Donde E representa la enzima peroxidasa, X el sustrato oxidable, EO la forma activa oxidada, y  $K_o$  y  $K_x$  las constantes de las tasas de reacción bimolecular. En dicho ensayo, la actividad de la peroxidasa puede ser medida como la tasa de desaparición de X o la tasa de formación de OX, dependiendo del cromógeno en particular.**

El guayacol es un sustrato oxidable, un metoxifenol, cuyo producto de oxidación, es el tetraguayacol (OX) de color anaranjado, el cual será medido espectrofotométricamente. La tasa de esta reacción, dependerá solo de la concentración de la enzima, ya que los otros componentes son adicionados en exceso.

Por su parte, la enzima peroxidasa, el peróxido de hidrógeno y el ión tiocianato ( $SCN^-$ ) son los componentes que conforman el sistema peroxidasa en la saliva humana (Tenovuo, 1984). El principal producto antimicrobiano generado

por la peroxidasa salival, a pH neutro es el ión hipotiocianato (OSCN<sup>-</sup>) (Thomas y col. 1980). La reacción es la siguiente



El peróxido de hidrógeno y el ión tiocianato, son factores limitantes para la producción de hipotiocianato en saliva. El principal origen del peróxido de hidrógeno en boca humana ha sido presumido que es la flora bacteriana (Pruitt,1983), pero, se ha reportado que no solo es de origen bacteriano, sino también de células presentes en glandulas salivales y leucocitos (Carlsson, 1987). El ión tiocianato, se origina de la dieta, y su concentración es variable en saliva. El transporte de este ión, puede ocurrir a través de un transporte simple de intercambio con sodio o yodo por tiocianato, dentro de la célula, seguido por una liberación a lo largo del canal apical de la glándula (Fragoso y col., 2004).

Además, la actividad antimicrobiana del sistema peroxidasa salival, es proporcional a la concentración de del hipotiocianato, este sistema es más efectivo en saliva en reposo que en saliva estimulada. El flujo de saliva estimulada, presenta una disminución inmediata de los niveles de OSCN<sup>-</sup>, especialmente durante la expectoración. La presencia de OSCN<sup>-</sup> en la secreción de saliva del conducto de Stenon, tiene un origen glandular endógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, debido a que la saliva de parótida de glándulas saludables está desprovista de bacterias y leucocitos (Tenovuo y Pruitt, 1984).

El anión hipotiocianato (OSCN<sup>-</sup>), es el principal producto del sistema a pH normal en saliva, pero a pH bajo el mayor producto es una molécula (HOSCN<sup>-</sup>), el ácido hipotiocianato, el cual está en equilibrio ácido-base con el OSCN<sup>-</sup> (Pruitt,1987). Debido a su carga neutra, el HOSCN<sup>-</sup>, puede penetrar la membrana microbiana, mucho más rápido que el OSCN<sup>-</sup>. Por lo tanto, el efecto antimicrobiano del sistema peroxidasa es más eficaz a pH bajo. En todo este

proceso el pH interviene de manera importante en la eficiencia antimicrobiana del sistema de la peroxidasa salival.

El pH óptimo de la enzima peroxidasa salival está en el rango de 6,5-7,0. Muestras de saliva de parótida, a un pH de 6,5 y suplementado con cantidades apropiadas de Tiocianato y peróxido de hidrógeno, presentaron un incremento en la concentración de hipotiocianato, lo cual es similar a lo observado en muestras de saliva total (Pruitt,1987).

Se ha propuesto un modelo de regulación funcional para el sistema de la peroxidasa salival (Tenovuo, 1984). El modelo explica que entre los períodos de ingestión de alimentos, los microorganismos son relativamente inactivos. Cuando se ingieren particularmente carbohidratos, las bacterias inician sus actividades metabólicas y el peróxido de hidrógeno es excretado por muchas especies. La peroxidasa salival utiliza este peróxido de hidrógeno para generar productos inhibitorios como el hipotiocianato-ácido hipotiocianato (OSCN-/HOSCN-) y otros intermediarios de vida corta. A bajas concentraciones de este producto, las bacterias son sensibles y francamente inhibidas. Finalmente, la excreción continua de peróxido de hidrógeno y la acumulación de productos antimicrobianos, lleva a la inhibición de bacterias sensibles al peróxido, trayendo como consecuencia la reducción concomitante de la disponibilidad de peróxido de hidrógeno, disminuyendo la concentración de factores inhibitorios a niveles críticos, por lo tanto, las bacterias pueden desarrollarse nuevamente dentro de la cavidad bucal.

### **Capacidad Amortiguadora**

La capacidad amortiguadora de la saliva es otro factor que ha recibido una considerable atención debido al efecto potencial de contrarrestar los ácidos en la cavidad bucal. El poder neutralizante de la saliva no es necesariamente reflejado por el pH presente en saliva, por lo que existen diferencias entre el pH salival y la incidencia a caries. La relación entre la capacidad amortiguadora de la saliva per se y caries dental no es tan simple como se supone. La producción de ácidos, significa que existe un proceso de caries, el cual ocurre en un sitio localizado en el diente. Este sitio, particularmente en un estadio temprano de la caries, es protegido por la placa dental, la cual parece actuar como una membrana osmótica preventiva, completamente libre de intercambio iónico. Por el contrario, aún cuando los iones que amortiguan, estén presentes en la saliva, estos no pueden estar totalmente disponibles en aquellos sitios específicos donde existe la necesidad. ( Tenovuo y Larjava, 1984 ).

En muestras de saliva total, estimulada y no estimulada, la capacidad amortiguadora involucra tres sistemas importantes. El sistema tampón más importante en saliva es el bicarbonato/ácido carbónico. La dinámica de este sistema es complicado por el hecho que involucra al gas dióxido de carbono disuelto en saliva. La reacción simplificada en equilibrio, es la siguiente:



El incremento de la concentración del ácido carbónico, podría causar mayor cantidad de dióxido carbónico que sale a la saliva. El incremento en saliva de bicarbonato, aumenta el pH y por lo tanto existe una capacidad amortiguadora presente en saliva, especialmente durante la estimulación. El segundo sistema buffer es el fosfato, el cual contribuye con esta capacidad tampón durante el flujo salival bajo. El mecanismo de acción del fosfato inorgánico, es debido a la disponibilidad de un ión fosfato secundario,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , para unirse al ión hidrógeno y formar  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

El tercer sistema tampón, son las proteínas, que amortiguan a bajos valores de pH. Estas macromoléculas contienen sitios de unión con los hidrogeniones (Tenovuo, Larjava, 1984).

La concentración de bicarbonato es fuertemente dependiente de la tasa de secreción, por lo tanto este sistema es un factor determinante en la capacidad amortiguadora de la saliva, además hay una estrecha relación entre pH, tasa de secreción y capacidad buffer de la saliva. Varios métodos han sido utilizados para medir la capacidad amortiguadora (Tenovuo y Larjava, 1984).

### **Enfermedades bucodentarias: Caries dental y gingivitis:**

La OMS publicó en la ciudad de Ginebra en el año 2004 un informe en el cual se señala que la caries dental, la periodontitis (enfermedad gingival) y el cáncer de boca y faringe son un problema de salud con alcance mundial. Igualmente se informó que existen más de cinco mil millones de personas que han sufrido de caries dental en el mundo, y afecta a más del 60% de los niños en edad escolar. También, se comunicó en este informe que la mayoría de los niños del mundo presentan signos de gingivitis, aunque las periodontopatías son más comunes en los adultos.

La caries dental es una enfermedad infecciosa crónica transmisible, que causa la destrucción localizada de los tejidos duros del diente por la acción de los ácidos de la microbiota, considerada como multifactorial, ya que participan el sustrato o los carbohidratos cariogénicos que son metabolizados por las bacterias acidogénicas de la placa dento-bacteriana sobre los tejidos calcificados del diente, el cual es protegido por las propiedades de la saliva durante un tiempo definido. Se puede clasificar a través de varios criterios como según el tejido de afecte, según la configuración, y progresión (Rioboo, 1994, Liebana, 2002).

El inicio de la lesión cariosa corresponde a fenómenos físico-químicos en los que se producen ácidos de origen bacteriano que causan la disolución de los

cristales de fosfato de calcio del diente, uno de los primeros cambios que se manifiesta es la pérdida de carbonatos y de magnesio. Por lo tanto, debe existir la formación de una placa dentobacteriana, la cual se inicia con la formación de la película adquirida por desnaturalización de las glucoproteínas salivales sobre la superficie dentaria, que se une a la hidroxiapatita a través de puentes de calcio o magnesio pertenecientes a la capa de hidratación de Stern, ésta se encuentra formada por 90 % de calcio y 10% de fosfato. La interacción se establece entre los grupos negativos de la hidroxiapatita proporcionados por los grupos fosfatos e hidroxilo y las mucinas cuya carga también es negativa debido a la presencia de grupos aniónicos como el ácido siálico, sulfatos, carboxilos y fosfatos, a través del calcio o del magnesio (ob. cit).

Existe una clara relación entre el metabolismo de la placa, la dieta y las enfermedades periodontales, tales como la caries dental, así, el efecto de la placa dento-bacteriana se desarrolla a partir de la colonización de la película adherida por las bacterias, la agregación y multiplicación de las mismas. La colonización inicial se presenta en pocas horas por bacterias gram positivas como *A. viscosus* y *S. sanguis* el mecanismo de adherencia que se establece es irreversible, a través de atracciones electroestáticas, fuerzas de dipolo-dipolo, glucocalix, y fimbrias. La colonización secundaria y la congregación se presenta entre las diferentes especies bacterianas por interacciones bacterianas que dependen del potencial redox, disponibilidad de oxígeno y pH. El metabolismo bacteriano en presencia de azúcares como sustrato desarrolla los polisacáridos extracelulares que forman parte de glucocalix y participan en el sistema de adherencia de las bacterias.(ob. cit, Lozano y col, 2000)

Los polisacáridos extracelulares se forman a partir de un grupo de enzimas que utilizan la sacarosa, en presencia de las enzimas glucosiltransferasas y fructosiltransferasas que son homopolímeros de glucosa con enlaces  $\alpha 1,3$   $\alpha 1,6$  y menos frecuente  $\alpha 1,4$  y  $\alpha 1,2$ , por lo cual se clasifican en glucanos acuosolubles y glucanos acuoinsolubles, a los primeros se les confiere una función de reserva

dentro del biofilm y esta representada por los glucanos con enlaces glucosídicos  $\alpha$ 1,6, (31%) , los enlaces  $\alpha$ 1,3 (68%) corresponden a los insolubles cuya contribución se representa por la estabilidad que le ofrece a la placa dentobacteriana, ayuda a crear y mantener canales. Los homosacáridos formados a partir de la fructosiltransferasa produce los fructanos  $\beta$ 2,1 (inulina) y  $\beta$ 2,6 (leván) quienes tiene una función fundamental en la adhesión y colonización de bacterias cariogénicas, ya que, dichas bacterias tienen una hidrolasa extracelular capaz de degradar a fructosa libre y puede ser transportada a su interior como fuente de energía ( De Ugarte, 2002).

El metabolismo de la flora bacteriana depende del sustrato disponible, en caso que sea azúcares se mantiene la vía de la glicólisis, que en condiciones provistas de oxígeno, permite la formación de ácidos como el propiónico, acético y butírico y en condiciones anaerobias se forma ácido láctico. Estos ácidos se mantienen difundándose en el interior de la estructura de la placa dentobacteriana, y el sistema amortiguador de la saliva puede neutralizarlo cuando penetra dentro de la placa, pero, en caso que la estructura de la placa dentobacteriana tenga canales muy densos y el sistema bicarbonato dificulte su acceso a su interior, los ácidos formados actúan sobre la superficie del diente aumentando la disolución de su estructura mineral. Sin embargo, existen placas dentobacterianas con un metabolismo de la ruta de los aminoácidos y proteínas a través de los procesos de descarboxilación y desaminación. En el predominio de este, existe un aumento de la urea lo que genera un aumento del pH, lo cual inicia la precipitación de las sales de calcio que se encuentran en la placa y se forman los cálculos dentales (ob cit, Lozano,J, 2000).

Según la teoría de Keingberg se distinguen tres tipos de placa bacteriana, la normal que presenta un pH similar al de la saliva y está sobresaturada de calcio y fosfato. La cariogénica con un pH ácido inferior a 5, que destruye la hidroxiapatita y produce especies más solubles como el fosfato monocálcico y con iones de calcio y fosfato cercanos a la saturación. Y la placa litógena que tiene un pH mas

elevado que la saliva, lo que favorece la precipitación de sales de calcio y la formación de enfermedades gingivales (ob cit).

Por su parte, el desarrollo de enfermedades gingivales puede ser atribuido a la presencia de placa bacteriana madura. La gingivitis es inducida por la placa dento-bacteriana, por la acción del producto del metabolismo microbiano sobre el tejido de la encía (colagenasas, proteasa, endotoxinas, ácidos, hialuronidasa, etc) desarrollando signos clínicos como lo son: eritema, edema, agrandamiento de los tejidos y hemorragia, siempre que el epitelio de unión permanezca unido al diente a su nivel original, aunque recientemente se considera que la gingivitis inducida por placa pierde la inserción del diente. La microbiota inicial de la gingivitis esta formada por microorganismos facultativos (59%) y especies anaerobias (41%), de los cuales los grampositivos representan el 56%, como *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* y *Peptostreptococcus micros*. y los microorganismos gramnegativos son (44%) *F. nucleatum*, *P. intermedia* *V. parvula*, *Haemophilus*, *Capnocytophaga* y *Campylobacter* Genrando.(ob cit).

La clasificación de la gingivitis es la inducida por placa y la no inducida por placa, a su vez la inducida por placa se subdividida en gingivitis relacionada con placa dento-bacteriana solamente, enfermedad gingival modificada por factores sistémicos, enfermedades gingivales modificadas por medicamentos y finalmente enfermedades gingivales modificadas por desnutrición. También puede clasificarse según su distribución, como localizada o generalizada, según su curso o duración puede ser aguda, recurrente y crónica.(Newman, , Takei, , y Carranza, , 2004).

La gingivitis tiene un desarrollo que se puede explicar en cuatro fases, la lesión inicial son cambios vasculares, como la dilatación capilar y el aumento de la circulación sanguínea, como respuesta ante la colonización, agregación y multiplicación de los microorganismos, ya que los agentes agresivos producto de su metabolismo afectan los espacios intercelulares del epitelio e invaden el tejido conjuntivo e inician las respuesta del huésped. A nivel microscópico se observa en

los capilares del tejido conjuntivo vasodilatación, marginación de neutrófilos polimorfonucleares diapedesis y migración hacia el epitelio de unión y surco gingival. En la segunda fase existe proliferación capilar, especialmente en las proyecciones interpapilares del conjuntivo de la encía, con un incremento de linfocitos debajo del epitelio de unión, e inclusive se aprecia infiltrado denso de neutrófilos, esta lesión temprana clínicamente se reconoce por eritema y hemorragia al sondeo.

La tercera fase, se presenta estancamiento sanguíneo porque el retorno venoso se altera, se aprecian extravasación de eritrocitos y oxidación de la hemoglobina, microscópicamente se observa una reacción inflamatoria crónica intensa, con presencia de células plasmáticas las cuales invaden el tejido conjuntivo. El epitelio de unión presenta sus espacios intercelulares ensanchados ocupados por desechos celulares y zonas en la que la lámina basal esta destruída y los estudios histoquímicos indican que la encía presenta valores altos de fosfatasa ácida y alcalina, glucuronidasa beta, glucosidasa beta, galactosidasa beta, esterases, aminopeptidasa y citocromo oxidasa. Clínicamente se observa la encía, cuyo color normal es rosa coral, se torna rojo azulada, además, cambios de tamaño o posición de la encía, pérdida del puntillado característico y cambios de consistencia, así como, sangramiento al sondeo. La lesión avanzada implica destrucción periodontal. (ob cit).

#### DEFINICION DE VARIABLES EN FORMA CONCEPTUAL Y OPERACIONAL

<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICION OPERACIONAL</b>	<b>INDICADORES</b>
<p><b>PEROXIDASA SALIVAL</b> Es una enzima secretada en el flujo salival que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno y tiocianato en un componente bactericida como</p>	<p><b>ACTIVIDAD DE LA PEROXIDASA SALIVAL</b> La actividad de la enzima será expresada por el incremento de la absorbancia que experimente al ser sometida a ensayo</p>	<p>- Absorbancia en función de tiempo</p>

el hipotiocianato. (Nieuw, y Veerman, 2002).	espectrofotometrico.	
<b>CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE LA SALIVA</b> Es una propiedad de la saliva que consiste en mantener la concentración fisiológica de hidrogeniones (pH) en la superficie de las células epiteliales y sobre el diente. El sistema amortiguador mas importante es el bicarbonato ((Newman M y col, 2004).	<b>CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE LA SALIVA</b> Consiste en los cambios de color que experimenta la saliva a una cantidad de ácido en presencia de un indicador colorimétrico y sometida a un procedimiento de titulación.	- Volumen de ácido para el viraje de pH.
<b>CARIES DENTAL</b> Es una enfermedad infecciosa que altera la composición molecular de los tejidos duros del diente que involucra un proceso histoquímico y bacteriano que descalcifica y disuelve la porción inorgánicas y desintegra la matriz orgánica. (Seif , 1997).	<b>PREVALENCIA DE CARIES DENTAL</b> Unidades de dientes permanentes Cariados, Perdidos u Obturados.	-Indice CPO
<b>GINGIVITIS</b> Es la enfermedad gingival mas frecuente, se caracteriza por inflamación de la encía. (Newman y col, 2004)	<b>PRESENCIA DE GINGIVITIS</b> Alteración de las características clínicas de la encía como color, consistencia, posición, forma, textura y presencia de sangramiento	-Indice Gingival de Loe y Silness -Indice de Placa de Silness y Loe. -Indice de Sangramiento de Ainamo y Bay

### ESTABLECIMIENTO DE HIPÒTESIS

**Hipótesis nula:** “la actividad de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora de la saliva no se modifican en los niños en edades comprendidas entre los 9 y 12 años con caries dental y gingivitis, que asisten al área de Odontopediatría I de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo”.

**Hipótesis alterna:** “la actividad de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora de la saliva se modifican en los niños en edades comprendidas

entre los 9 y 12 años con caries dental y gingivitis, que asisten al área de Odontopediatría I de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo”.

## **MARCO METODOLOGICO**

### **TIPO DE ESTUDIO**

El presente trabajo de investigación será desarrollado con el enfoque cuantitativo, con un nivel descriptivo bajo los lineamientos de un diseño no experimental transeccional, ya que pretende observar y describir la actividad de la peroxidasa salival y de la capacidad amortiguadora de la saliva de parótida en niños en edad escolar con caries dental y gingivitis que asisten al área de Odontopediatría I en la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo.

### **POBLACION Y MUESTRA**

La población corresponde con los niños en edad escolar ( entre 9 y 12 años), ya que durante este período existe la erupción dentaria del segundo premolar superior, y, primer y segundo molar superior , que son las unidades dentarias que se estudiarán por tener una proximidad anatómica con el conducto excretor de Stenon. La población estará integrada por los niños en edad escolar (9-12 años) que asisten al área de Odontopediatría I de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo. Durante el período lectivo 2004-2005 fueron atendidos 407 niños en ese grupo etario, según el Registro de Actividades de Atención al Componente Bucal de la Salud del Departamento Odontología del Niño y del Adolescente.

El tamaño de la muestra se determinará a través de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{e^2}$$

$z$  = nivel de confianza es el presente estudio se utilizara 0,95

$\sigma$  = es la variabilidad de la población objeto de estudio en cuanto a la actividad de la peroxidasa salival. Para estimar su valor se realizará una prueba piloto de la población de los niños en edad escolar que asisten al área de Odontopediatria I

$e$  = representa el error máximo admisible que no será mayor de 0,025.

Posteriormente a la aplicación de la fórmula presentada según los resultados de la prueba piloto, el proceso de selección se someterá a un muestreo sistemático probabilístico que garantice su escogencia al azar.

#### **Criteros para la selección de la muestra:**

- Criterio de exclusión a niños que presenten:
  - Tratamientos odontológicos de ortopedia y/o ortodoncia: La información será por observación a través, de el examen clínico odontológico.
  - Tratamientos farmacológicos con drogas agonistas o antagonistas colinérgicas y adrenérgicas: La información será proporcionada por los representantes durante el interrogatorio de la historia clínica odontológico.
  - O hayan padecidos de enfermedades infecciosas o virales, de traumatismos, o de enfermedades sistémicas que afecten las glándulas salivales. La información será proporcionada por los representantes durante el interrogatorio de la historia clínica odontológico.
  
- Criterios de inclusión a niños en edad escolar que presenten:
  - Niños con erupción de las unidades dentarias 15,16,17,25,26 y 27.

#### **TECNICAS PARA LA RECOLECCION DE DATOS**

El presente estudio pretende implementar procedimientos para obtener muestras de saliva en los niños de edad escolar, que posteriormente será analizada para determinar la actividad de la peroxidasa salival y la capacidad

amortiguadora, Además, del examen clínico para el diagnóstico de caries dental y de presencia de gingivitis.

Las Normas de la Comisión de Bioética y Bioseguridad del MCT Y FONACIT que protegen a los seres humanos que participan en investigaciones se empleara como instrumento el consentimiento informado, del padre, madre y/o representante del niño (anexo 1).

### **Recolección y Tratamiento de las muestras de saliva**

La obtención de la muestra de saliva estimulada de parotida será entre las 8 y 11 a.m., y se realizará de la siguiente manera:

El paciente debe previamente ejecutarse una buena higiene bucal, sentarse cómodamente y tragar. Seguidamente se hará la cateterización del conducto de Stenon, utilizando un capilar cónico corto (7cm), acoplado a una manguera flexible de polietileno, la cual se conecta a una pipeta graduada de 1 -10 ml. El capilar corto se gira suavemente con una leve presión sobre la desembocadura del conducto de Stenon y se introduce de 5 a 10 mm, la pipeta graduada se mantiene horizontal para identificar el flujo salival (Corredor, 1995). Para la estimulación de la secreción salival se colocara sobre el dorso de la lengua un hisopo con ácido cítrico al 2%, cada 30 seg durante 6 minutos (Seif T, 1997).

El flujo de la tasa salival será determinado simultáneamente, una vez que la saliva comience a fluir por el tubo graduado se tomará el tiempo (T<sub>0</sub>). Se esperará que la saliva alcance la marca final y se anota el tiempo( T<sub>f</sub>). Posteriormente se medirá el pH en cada muestra de saliva, utilizando un pHmetro portátil.

Las muestras de saliva serán congeladas (-20°C), hasta la determinación de enzimas y proteínas( no superior a una semana).

### **Actividad de la Peroxidasa en Saliva de Parótida**

El ensayo químico de la enzima será llevado a cabo a través de un método espectrofotométrico utilizando el guayacal, (Sharlau) como sustrato oxidable (Makinen, y col., 1982). La mezcla reactiva se realizará con 50mM de buffer sodio fosfato a pH 7, 30 mM de guayacol y 1mM de peróxido de hidrógeno, para un volumen final de 3ml. La oxidación del guayacol será monitoreada a 470 nm, por 3 minutos, a 25 °C. La actividad de la enzima será expresada por el incremento de la absorbancia por minuto.

### **Proteínas Totales**

Las proteínas totales presentes en la muestra serán determinadas a través de un método colorimétrico, donde las proteínas reaccionarán con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con un máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra. Para ello, se colocará 20 microlitros de la muestra de saliva de parótida, en 2 mililitros del reactivo ( complejo EDTA/Cu 13 mmol/l en NaOH 875 mmol/l y alquil aril poliéter AAP). La muestra se incubará durante 15 min a 37 °C ( De Buitrago y col,1987).

### **Capacidad Buffer**

Se determinará la capacidad amortiguadora de la saliva recogida, a través de la titulación de 5ml de saliva, con dos (2) gotas de solución indicadora de anaranjado de metilo (pH 3.1 a 4.4) . Posteriormente se colocará en una bureta 10 ml de ácido clorhídrico y se titulará la saliva, hasta obtener una coloración rojo-naranja. Se tomará nota de la cantidad de ácido clorhídrico utilizado en la titulación. Los resultados se expresarán en términos de ml de ácido clorhídrico requeridos para titular 100ml de saliva hasta el punto final de anaranjado de metilo, aproximadamente pH 3.7.

### **Diagnóstico de la caries dental en pacientes:**

El instrumento a ser empleado será la historia clínica odontológica utilizada por el área de Odontopediatría I, donde se recolectará toda la

información de la anamnesis y examen clínico, empleando para ello el espejo bucal, y el explorador número 3. Para el diagnóstico de la caries dental se realizará un examen clínico del segundo premolar superior, primer y segundo molar superior, es decir las unidades dentarias 15, 16, 17, 25, 26 y 27 por estar anatómicamente adyacentes al conducto excretor Stenon, el cual se abre en una papila opuesta al primer molar superior (Humphrey y Williamson 2001).

El criterio de diagnóstico que será empleado es el sugerido por la OMS, debido que no será realizado en una unidad odontológica con luz directa. Por lo tanto, no se considerará caries dental a manchas blanquecinas, puntos rugosos o con cambios de color, ni a hoyos o fisuras presentes en el esmalte que fijen el explorador, o áreas del esmalte excavado, zonas oscuras, brillantes y duras, en un diente que muestra signos de moderada a severa fluorosis. El índice para medir caries dental que se aplicara es el Klein, y Palmer, conocido como CPO, cuyas iniciales corresponden a C dientes cariados, P dientes extraídos, perdidos y O dientes obturados cuyo rango puede variar en un individuo de 0 a 32. Para la dentición temporaria el equivalente se expresa en minúsculas ceo (Rioboo, 1994).

### **Diagnóstico de la gingivitis en pacientes:**

La presencia de gingivitis será determinada evaluando las encías del segundo premolar superior, del primer y del segundo molar superior, es decir, las unidades dentarias 15, 16, 17, 25, 26 y 27. A través de tres indicadores, el índice gingival, el índice de sangramiento y el índice de placa. El índice de gingivitis que se empleará es el propuesto por Loe y Silness, que considera las cuatro encías (mesial, bucal, distal y lingual) de cada diente examinado, considerando los siguientes parámetros:

0 = Encía normal,

1 = Inflamación leve, discreto edema y cambio en el color, sin hemorragia al sondaje,

2 = Inflamación moderada, enrojecimiento, edema y hemorragia al sondaje.

3 = Inflamación severa, marcado enrojecimiento y edema, ulceración y hemorragia espontánea. El índice se determina sumando el resultado de cada diente, se divide entre el número de dientes y se multiplica por 100 (Rioboo, 1994). El instrumental que se requiere es el espejo bucal .

El índice de sangramiento que será aplicado es el GBI ( gingival bleeding index) de Ainamo y Bay, mediante la cual se evalúa la presencia o ausencia de hemorragia gingival. El procedimiento implica una exploración leve del surco gingival con una sonda periodontal en la encía de cada diente y después de 10 segundos observar la aparición o no de sangre. El índice se expresa como un porcentaje del total de márgenes gingivales examinado. (Newman y col,2004). Los instrumentos empleados son el espejo bucal y la sonda periodontal homologada por la OMS “con extremo terminado en una bola de 0,5 mm, con una banda negra comprendida entre los milímetros 3.5 y 5.5 contados a partir de la bola terminal” (Rioboo, 1994).

Para determinar el índice de placa se empleara el presentado por Silness y Loe cuyo criterio contempla:

0 = No existe placa dental,

1 = Existe placa en el margen gingival libre y área adyacente del diente,

2 = Presencia de acumulacion moderada de depositos blandos dentro de la bolsa gingival y en el margen gingival o adyacente a la superficie dentaria o ambos

3 = Abundancia de materia blanda de la bolsa gingival o en el margen gingival adyacente a la superficie dentaria o ambos. El índice se obtiene sumando los resultados de cada diente examinado y dividiendo la suma entre el número total de dientes examinados. (Newman , y col,2004). El instrumental que se utilizará son el espejo bucal y la sonda periodontal homologada por la OMS.

### **Procesamiento de recolección y análisis de datos:**

Se desarrollará según los siguientes pasos:

- 1.- Obtención de la muestra de saliva de parótida en los niños en edad escolar seleccionados
- 2.- Diagnóstico de caries y gingivitis en los niños en edad escolar seleccionados
- 3.- Aplicación de pruebas y técnicas bioquímicas para determinar la actividad de la peroxidasa salival y capacidad amortiguadora.
- 4.- Organizar la información recolectada por el análisis de los datos, a los cuales se le aplicara la estadística descriptiva según los resultados.

### **RECURSOS:**

Los recursos necesarios para desarrollar el presente proyecto serán:

#### *Recursos institucionales:*

- Unidad de Investigación Morfopatológica (UNIMPA)
- Biblioteca de la Facultad de Odontología
- Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Odontología

#### *Recursos humanos:*

- Los investigadores
- Docentes de la Facultad de Odontología
- Niños en edad escolar que asisten al área de Odontopediatría I

*Recursos Materiales:*

Oficina:

Papel bond tamaño 2 resmas

Cartucho para impresora (2 ud) modelo HP 920c

Marcador para rotular (3 ud)

Lápiz bicolor (3uds)

Equipo de computación

Impresora

Diskettes (2cajas)

Instrumental Odontológico:

Sondas periodontal (5 ud)

Espejo bucal (5 ud)

Explorador No.3 (5 ud)

Pinza algodonerera (5ud)

Algodón (1paquete)

Campos (100 uds)

Laboratorio

Equipo:

Spectronic 20

pH meter Corning model 430

Timmer digital modelo T-7

Materiales:

Guantes talla S (6 paq x 100)

Cubetas de espectofotometro (4 ud)

Elenmayer 50 ml ( 3 paq x 50)

Eppendorf (1paq)

Gradilla para eppendorf (3ud)

Pipeta (finnipipette fixed)

Pipeta yellow tip (1 paq)

Tubo de polietileno calibre 3,5 x2,3 mm (30 ud)

Tubos de ensayo de 6 ml (2 paq x 1000)

Papel parafilm

Reactivos

Guayacol G5502 (500grs)

Peróxido de hidrogeno (500ml)

Buffer fosfato 1M pH 7,4

Hidróxido de sodio (500grs) y ácido clorhidrico concentrado

## **CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

(FEBRERO-NOVIEMBRE 2005)

ACTIVIDADES	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEM	OCTUBRE	NOVIMEM
REVISION BIBLIOGRAFICA	■									
ELABORACION DEL PLAN DE TRABAJO				■						
RECOLECCION DE LA SALIVA Y EXAMEN CLINICO A LA MUESTRA						■				



Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo. 2004-2005. **Registro de Actividades de Atención al Componente Bucal de la Salud. Departamento Odontología del Niño y del Adolescente.** Odontopediatría I.

Fragoso M, Fernandez V, Corteza R, Randell S, Salathe M y Conner G ( 2004) **Transcellular thiocyanate transport by human airway epithelia** The Journal of Physiology (561) : 183-9

Garroni, E.(1998) **Xerostomia en dos Centros de Salud del Area Metropolitana de Caracas.** *Salud & Bucal.* 2 (2):104-112.

Giglio M y Nicolosi L (2000). **Semiología en la Práctica de la Odontología.** McGraw Hill.Interamericana. Chile

Gómez de Ferraris, M , Campos Muñoz, A.(2004). **Histología y embriología Bucodentaria.** 2ª Edición. Editorial Medica Panamericana . México

Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek R, Li Y, Loo J y Wong D (2005) **Large scales indentification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electroforesis-mass spectrometry** Proteomics (5). Disponible: [www.proteomics-journal.de](http://www.proteomics-journal.de)  
fecha: 12/04/05 hora: 10:23 a.m.

Humphrey S, Williamson R, (2001) **A review of saliva: Normal Composition, flow and function .**The Journal of Prosthetic Dentistry (85):162-9

Hyypa T, Karhwaara L, Tenovuo J, Lumikari M, Vilja P, (1989) **Antimicrobial Factors in Whole Saliva of human infants: A longitudinal study.** *Pediatr Dent* (11): 30-36

Jentsch H, Beetke E, Gocke R, (2004) **Salivary analyses and caries increment over 4 years: an approach by cluster analysis.** *Clin Oral Investig* (3):156-60

Kiser C, Caterina CK, Engler JA, Rahemtulla B, Rahemtulla F (1996) **Cloning and sequence analysis of human salivary peroxidase-encoding cDNA** *Gene* (2):261-4

Lagerlof F, y Oliveby A (1994) **Caries protective factors in saliva.** *Adv Dent Res* 8 (2):229-238

Leont`ev VK, Gaulina MV, Ganzina IV, Anisimova IV (2002) **Structural characteristics of mixed saliva in patiens with caries at different.** *Stomatologia* (4): 29-30

Liebana Urena J. (2002). **Microbiología Oral.** 2º edición. McGrawHill. Interamericana. España.

Lozano, J.A., Galindo J.D, Garcia Borrón J.C (2000). **Bioquímica y Biología Molecular para Ciencia de la Salud**. Mc Graw Hill. España.

Makinen K, Tenovuoto J (1982) **Observations on the use of guaiacol and 2,2-azino-di (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) as peroxidase substrates**. Anal Biochem (126):100-8

Makinen K, Tenovuoto J (1976) **Chromatographic separation of human salivary peroxidases**. Acta Odontol Scand (3) :141-50

Makinen K, Tenovuoto J, Scheinin A (1976) **Turku sugar studies XII The effect of the diet on oral peroxidases, redox potential and the concentration of ionized fluorine, iodine and thiocyanate**. Acta Odontol Scand (6):353-69

Mandel I, Behrman J, Levy R, Weinstein D (1983) **The salivary lactoperoxidase system in caries-resistant and susceptible adults**. J Dent Res (8): 992-5

Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F, Baldone DC, Pruitt KM, Hjerpe A (1988) **Purification and characterization of human salivary peroxidases**. Biochemistry (1):233-9

Mansson-Rahemtulla B, Baldone DC, Pruitt KM, Rahemtulla F, (1986) **Specific assays for peroxidases in human saliva**. Arch Oral Biol (10):661-8

Marcozzi G (1996) **A rapid procedure for the purification of human salivary peroxidase** Biomed Chromatogr (2) 97-8

Nieuw, AV Ameronge, Veerman ECI (2002) **Saliva-defender of the oral cavity**. *Oral Diseases*. Vol 8, issue 1, pag 12. Disponible: [www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034/](http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034/) fecha: 12/05/05 hora 10:07 a.m.

Newman, Michael, Takei, Henry y Carranza, Fermín. (2004). **Carranza Periodontología Clínica**. 9° edición Mc Graw Hill. México

OMS. (2004). **La OMS publica un nuevo informe sobre el problema de las enfermedades bucodentarias**. Ginebra. [www.who.int/mediacentre/es](http://www.who.int/mediacentre/es) fecha: 2/05/05 hora 4:17 p.m.

Pruitt KM, Kamau DN, Miller K, Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F (1990) **Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase, and human myeloperoxidase**. Anal Biochem (2) 278-86

Pruitt KM, (1987) **The salivary peroxidase system: thermodynamic, kinetic and antibacterial properties.** J Oral Pathol (8):417-20

Pruitt KM, Manson-Rahemtulla B, Tenovuo J (1982) **Detection of the hypothiocyanite (OSCN-) ion in human parotid saliva and the effect of pH on OSCN- generation in the salivary peroxidase antimicrobial system.** Arch Oral Biol (6): 517-25

Revis G (1977) **Immunoelectrophoretic identification of peroxidase in human parotid saliva .**Arch Oral Biol (22) :155-158

Ribeiro JM, Valenzuela JG (1999) **Purification and cloning of the salivary peroxidase/catechol oxidase of the mosquito Anopheles albimanus.** Journal of Experimental Biology (202) : 808-16.

Rioboo, R ( 1994). **Higiene y Prevención en Odontología. Individual y Comunitaria.** Ediciones Avances Medico-dentales, S.L. Madrid

Robinson C, Shore R.C, Brookes S.J., Strafford S, Word S.R., Kirkham J, **The Chemistry of Enamel Caries.** Crit Rev Oral Biol Med (4):481-95

Rossin M, Hanschke M, Splieth C, Kärmer A (1999) **Activities of lysozyme and salivary peroxidase in unstimulated whole saliva in relation to plaque and gingivitis score in healthy young males.** Clin Oral Investig (3): 133-7

Rudney JD (1989) **Relationships between human parotid saliva lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase and secretory immunoglobulin A in a large sample population.** Arch Oral Biol (7):499-506

Rudney JD, Kajander KC, Smith QT (1985) **Correlations between human salivary levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase and secretory immunoglobulin A with different stimulatory states and over time.** Arch Oral Biol (11-12) :765-71

Seif T (1997) **Cariología.** Primera Edición. Actualidades Médicas Odontológicas Latinoamérica, CA

Smith A, Smith G, Basu MK, Walsh T (1984) **Changes in salivary peroxidase activity observed during experimentally-induced gingivitis.** J Clin Periodontol (6):373-8

Takahiro N, Kenshi M, Mitsutaka K, Umeo T (2003) **Determination of salivary peroxidase activity in human mixed whole saliva .**Ach Oral Biology (48) : 397-400

Tenovuo J (2002) **Antimicrobial Agents in saliva-protection for the Whole body.** J Dent Res (12): 807-9. Disponible: [www.pubmedcentral.nih.gov/articlernderfci?arid=261064](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlernderfci?arid=261064) fecha: 29/04/05 hora:9:25 a.m.

Tenovuo J, Lumikari M, Soukka T (1991) **Lisozima, lactoferrina e peroxidases salivares: efeitos anti-bacterianos cariogenicas e aplicacoes clinicas em odontologia preventiva.** Proc Finn Dent Soc (87): 197-208 [www.laclede.combrliteratu/13713.htm](http://www.laclede.combrliteratu/13713.htm) 25/03/03

Tenovuo J, Larjava H (1984) **The protective effect of peroxidase and thiocyanate against hydrogen peroxide toxicity assesed by human gingival fibroblast cultured in vitro.** Arch Oral Biol (6) : 445-51

Tenovuo J y Pruitt KM (1984) **Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health.** J Oral Pathol (6) : 573-84

Tenovuo J, Pruitt KM, Thomas EL (1982) **Peroxidase antimicrobial system of human saliva: hypothiocyanite levels in resting and stimulated saliva.** J Dent Res (8) : 982-5

Tenovuo J, (1981) **Different molecular forms of human salivary lactoperoxidase .**Arch Oarl Biol (12) : 1051-1055.

Tenovuo J, Mansson-Rahemtulla B, Pruitt KM, y Arnold R (1981) **Inhibition of dental acid production by salivary lactoperoxidase antimicrobial system.** Infection and Immunity(34) : 208-14. Disponible: [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=rd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=rd) fecha: 12/04/05 hora: 9:13 a.m.

Tenovuo J (1976) **The varation of salivary peroxidase activities in persons of different oral health .**Acta Odontol Scand (3) : 163-8

Tenovuo J , Valtakoski J (1976) **The correlation between salivary peroxidase activity, salivary flor rate, and the oxidation-reduction potentials oh human saliva and dental plaque suspensions.** Acta Odontol Scand (3) : 169-76

Thomas EL, Bates K, , Jefferson MM (1980) **Hypothiocyanite ion: detection of the antimicrobial agent in human saliva.** J Dent Res (59) : 1466-72

Torres WH (2002) **Biología de las especies oxígeno reactivas.** Mensaje Bioquímico, Vol 26 : 19-54

Vucicevic\_Boras V, Brozovic S, CEDIC-Arambasin A, Zadro R, Devic T, Begovac J y Brailo V (2003) **Salivary peroxidase levels in patiens with AIDS.** Eur J Med Res (2) : 81-4