



Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

Determinación de parámetros bioquímicos salivales en pacientes de 4 a 13 años de edad con autismo.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller **Igmilka Dayana Milles Dommar** como requisito para optar al título de Licenciado en Biología mención Celular.

Tutora:

Dra. M. Valentina Salas

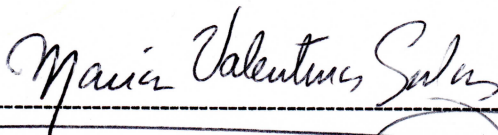
Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular Aplicada (IBE-UCV)

Caracas, Mayo 2016

Acta del examen público y solemne del Trabajo Especial de Grado de la bachiller Igmilka Dayana Milles Dommar.

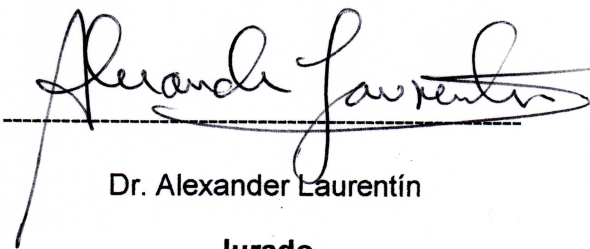
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la ilustre Universidad Central de Venezuela, damos fe de que examinamos el Trabajo Especial de Grado de la bachiller Igmilka Dayana Milles Dommar, portadora de la cédula de identidad V.- 18270578, titulado "**Determinación de parámetros bioquímicos salivales en pacientes de 4 a 13 años de edad con autismo**"; el cual es requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología mención Celular. Culminada la evaluación, consideramos que dicho trabajo cumple con los requerimientos exigidos en los reglamentos respectivos, por lo cual ha sido **APROBADO** y calificado con la puntuación de **20 puntos**. Así mismo proponemos que este trabajo sea considerado para optar a **menção honorífica** ante el Consejo de Escuela.

Para dar fe de ello, se levanta la presente acta en Caracas a los treinta días del mes de Mayo del año 2016.



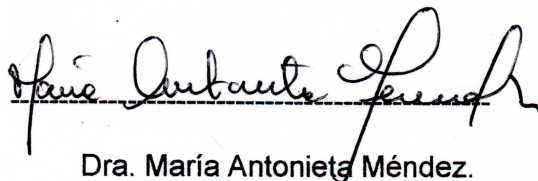
Dra. M. Valentina Salas.

Tutora



Dr. Alexander Laurentín

Jurado



Dra. María Antonieta Méndez.

Jurado

**Dedicado a mi Dios todopoderoso,
que me permitió el grandioso placer
de estudiar esta carrera tan increíble
y apreciar lo maravilloso de su creación:
la vida en este planeta.**

Agradecimientos

Sin orden de importancia, pues absolutamente cada persona aquí nombrada tuvo importancia principal en el momento que gracias a su presencia y colaboración este trabajo logró llevarse a cabo y así concluir mi carrera y consagrarme como licenciada en biología celular de la honorable Universidad Central de Venezuela.

Gracias a mi tutora de tesis, la Doctora María Valentina Salas, por haber sido una de las primeras personas que creyó en mí como bióloga y me aceptó en su laboratorio para trabajar con ella donde pude desarrollar este tema y tuve la oportunidad única de compartir con los seres más espectaculares que he conocido en el mundo, que son los niños con autismo. De la Dra. Salas no sólo aprendí de conceptos y técnicas biológicas, sino de convivencia y compañerismo en el laboratorio y fue mi “mamá gallina” para culminar con éxito esta etapa de mi vida. Cosas invaluable y que no sé si se las pueda pagar con otras cosas aparte del cariño y admiración que siento por ella.

Gracias al futuro Doctor José Mejía, fue un compañero de laboratorio ejemplar y jamás recibí una negativa de su parte cuando se trató de apoyarme o entrenarme en algún protocolo. Siempre estuvo para mí con toda la paciencia del mundo, que lo caracteriza.

Gracias al profesor Víctor Hugo Aguilar de la escuela de Geografía de la UCV, por su incondicional ayuda y apoyo en toda el área estadística de este estudio.

Gracias a la odontóloga Mariana Morales, que aunque hubiera tenido la oportunidad de escogerla no habría podido escoger mejor compañera de experimentos. Hicimos una simbiosis perfecta entre odontología y biología. Aprendí muchísimo de ella.

Gracias a mis amigos y hermanos de vida que Dios puso en mi camino: Megly Mendoza, Carlos Bousquet, Néstor Materano, Alejandra Villarroel, Michelle Alcalá, Sergio Barrantes y Stevens Maneiro. Son personas que estuvieron allí para siempre darme ánimos, darme todo el apoyo, ayuda, favores, logística, transporte, compañía y hasta toda la saliva necesaria durante mi entrenamiento. Estas personas creyeron tanto en mí que hasta cuando yo dudaba de mi misma, no tardaban en recordarme quién era y adónde iba.

Gracias al jurado de lujo que tuve en este trabajo. Uno de ellos, el que considero uno de los mejores profesores de la escuela de Biología de la UCV, el Doctor Alexander Laurentín, pues es un profesional impecable en su enseñanza y en sus trabajos de investigación, estricto pero justo, con un conocimiento irrefutable y profesor por convicción de un mejor país. Haber obtenido su aprobación primero como profesor y luego como jurado de tesis, aparte de haber sido un privilegio, hacen que sea indudable la afirmación de que soy licenciada en biología de esta república. Mi otro jurado, la Doctora María Antonieta Méndez, es una excelente odontóloga y profesora de esta institución, con un currículo extenso en la materia, y gracias a su participación y aportes muy acertados, pudimos concretar uno de los objetivos más importantes que fue la bidimensionalidad de este trabajo, pues dimos un aporte a la odontología basados en la ciencia que tendrá un beneficio en la población.

Gracias a mi hermoso padre, el ingeniero Ignacio Milles, que creyó en mí como persona y quiso apoyar incondicionalmente, sin refutar, todos mis proyectos de vida, a pesar del tiempo que me costó, nunca se quejó. Sin esa ayuda y ese amor infinito, de darme siempre las mejores oportunidades, yo no habría podido lograr nada en esta vida. Soy quien soy gracias a mi superhéroe catalán.

Gracias a mi madre, Rosa Dommar, aparte de darme la vida, por su constancia y dedicación a la familia, por nunca aceptar nada menos que lo mejor para mí y mi hermano.

Gracias a mi hermano, el ingeniero Ignacio Eduardo Milles, porque a pesar de ser mi hermano menor, me enseñó el significado de hacer las cosas no bien sino perfectas al graduarse de la misma institución, la UCV, *summa cum laude* y se convirtió en mi ejemplo a seguir y en mi motivación para no desmayar a pesar de lo difícil que se pusiera el camino.

A todos ¡gracias! y estas palabras no serán suficientes, pero me complacería saber que les retribuí algo al menos sintiéndose orgullosos de mí y que no se equivocaron en apoyarme.

Resumen

El autismo es un trastorno del desarrollo cerebral que presenta alteraciones inmunológicas, metabólicas, gastrointestinales, neurológicas y dificultades en el área de relación social y es notorio a partir de los 3 años de vida del individuo. La saliva es un fluido biológico importante como medio de diagnóstico de enfermedades sistémicas y bucales. Está compuesta de 99% de agua y 1% de electrolitos y macromoléculas orgánicas. Se ha descrito que a pesar de las condiciones desfavorables, niños con autismo presentan un índice de caries menor que niños sanos. En este trabajo determinamos si existen diferencias en parámetros bioquímicos salivales de pacientes con autismo comparado con niños sin autismo. Se determinó pH, concentración de proteínas por el método de Lowry, iones calcio por el método colorimétrico con orto-cresoltaleína complexona, iones fosfato por el método de Fiske y Subbarow e inmunoglobulina A secretora total por ELISA indirecta; el perfil electroforético y zimografías de las proteínas salivales fue determinado en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Para autistas y controles se obtuvieron los siguientes valores promedios $\pm$ DE (desviación estándar) respectivamente: pH $7,20 \pm 0,48$ y $7,27 \pm 0,34$ ($n=34$), concentración de proteínas totales $2,07 \pm 0,88$ mg/mL y $2,18 \pm 0,83$ mg/mL ($n=30$), concentración de iones fosfato $4,02 \pm 1,87$ mmol/L y $3,33 \pm 2,11$ mmol/L ($n=9$) y concentración de IgA secretora total $71,43 \pm 18,43$ μ g/mL y $80,82 \pm 46,71$ μ g/mL ($n=10$). Los resultados de pH, proteínas, fosfatos e IgA secretora total no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Para la concentración de calcio se observó diferencia significativa, donde el promedio para los pacientes con autismo fue $0,57 \pm 0,28$ mmol/L, menor que para los controles $0,77 \pm 0,36$ mmol/L ($p=0,017$). Este resultado se asocia al bajo consumo de alimentos lácteos de los pacientes dentro de la población autista con dieta. El perfil electroforético proteico presenta un patrón similar para ambas poblaciones, sin embargo en el perfil proteolítico pudimos observar diferencias de patrones de actividad de las proteínas dependiendo del paciente y si tenía caries o no. Los pacientes autistas presentan un conjunto de factores desfavorables que los harían propensos a padecer caries, el índice de higiene oral para esta población fue 2,3 (malo) y para controles fue 1,79 (regular), y en contradicción a esto, el índice de caries fue de 1 (muy bajo) para los autista y 3 (bajo) para los control, donde la población control padece caries en un 73,53% y los niños con autismo apenas en un 20%. De hecho, los parámetros bioquímicos salivales aquí estudiados fueron similares entre ambas poblaciones, en contra de lo esperado.

Índice

I. Introducción.....	1
I.1 Autismo.....	1
I.2 La Saliva.....	5
I.3 Índice de caries.....	16
I.4 La Saliva un biofluido aliado.....	17
II. Antecedentes.....	19
III. Objetivos.....	23
IV. Materiales y métodos.....	24
IV.1 Población y Material biológico.....	24
IV.2 Medición de pH.....	25
IV.3 Centrifugación de la saliva entera.....	25
IV.4 Determinación de proteínas totales en saliva humana.....	26
IV.5 Determinación de fosfato salival.....	28
IV.6 Determinación de calcio salival.....	29
IV.7 Determinación de Inmunoglobulina A total salival.....	29
IV.8 Electroforesis en gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	26
IV.9 Zimografía.....	30
IV.10 Análisis odontológico: Índice de caries e índice de IHO-S.....	32
IV.11 Análisis Estadístico.....	32
V. Resultados.....	34
VI. Discusión.....	59
VII. Conclusiones.....	72
VIII. Recomendaciones.....	74
IX. Bibliografía.....	76
X. Anexos.....	80

I. Introducción

I.1 Autismo.

El autismo es un trastorno profundo del desarrollo que afecta aproximadamente a cinco de cada diez mil niños a nivel mundial (5/10.000) con una relación por sexo masculino/femenino de 4:1 (Chakrabarti, 2001), siendo en Venezuela la prevalencia aproximada de 11/10000 (Montiel-Nava, 2008). Kanner en 1943, fue el primero en describir las principales características del autismo como una incapacidad para relacionarse con las personas y desenvolverse en situaciones diversas de una forma normal, presencia de movimientos estereotipados, potencial cognitivo normal y una excelente memorización por repetición. La condición autista es definida completamente en base al deterioro de tres áreas: 1) Interacción social, 2) Comunicación y 3) Comportamiento estereotipado y repetitivo. Éste es un trastorno biológico del desarrollo cerebral, que afecta principalmente a las neuronas conocidas como “espejo”; tiene como consecuencia alteraciones inmunológicas, metabólicas, gastrointestinales y neurológicas en el individuo (Miles y McCathren., 2005).

Las causas del autismo pueden ser divididas en: **1) Congénitas:** la alteración del desarrollo del sistema nervioso central ocurre durante la gestación por exposición de la madre embarazada a: **a)** intoxicación por mercurio y/u otros metales pesados que se adhieren irreversiblemente a la formación de la vaina de mielina que causan interferencia en la sinapsis regular del individuo. **b)** Enfermedades como la rubéola, que provocan delección del material genético del feto (Juul-Dam y col., 2001). **2) Genéticas:** dentro de los modelos de herencia propuestos para el autismo se encuentra la herencia oligogénica, lo que implica la participación de diferentes genes en uno o varios *loci* cromosómicos.

Estudios en familiares han hecho evidente la predisposición genética al autismo, heredable en 90% en gemelos (Bailey, 1995), siendo más frecuente en familias con un integrante autista y la prevalencia de la enfermedad entre hermanos aumenta a un 5%, lo que es varias veces superior a la prevalencia general en la población (Szatmari, 1998; y Fombone, 1999).

3) Exposición ambiental y/o agentes externos directamente del niño ya nacido:

a) intoxicación con mercurio y/o metales pesados, esto lo asocian con el uso de vacunas con un preservante llamado timerosal, el cual es a base de mercurio. Aunque nunca fue demostrado que esto causara autismo, actualmente existen leyes que prohíben el uso de éste y cualquier otro preservante a base de metales pesados en las vacunas (FDA, 2002). Bradstreet y col. (2003) compararon la excreción de mercurio después de tres días de tratamiento con un agente quelante oral, meso-2,3-ácido dimercaptosuccínico (DMSA), en niños con trastornos del espectro autista y una muestra-control de una población sin trastornos. En general, las concentraciones de mercurio en orina fueron significativamente más altas en 221 niños con trastornos del espectro autista que en los 18 controles normales. Además, los casos en los que los niños habían sido vacunados mostraron una concentración significativamente mayor de mercurio urinario, que los controles no vacunados. Concentraciones similares de mercurio urinario fueron observadas entre los vacunados y no vacunados del grupo control. No se encontró asociación entre el cadmio o plomo urinario y trastornos del espectro autista. No se pudo concluir si el mercurio observado era por intoxicación durante la vacunación, o si ésta había ocurrido por predisposición genética, o si por la condición de autismo estos niños concentraban mercurio en su organismo, pero sí concluyeron que independientemente del mecanismo por el cual los niños con esta condición tienen altas concentraciones de mercurio en la orina, el tratamiento con DMSA descrito podría ser útil para diagnosticar su carga actual de mercurio. En otro estudio similar, Adams y col. (2007), determinaron altas concentraciones de mercurio en dientes de niños con autismo respecto a controles/sanos

(n=15 vs n=11, respectivamente); las conclusiones fueron similares, no sabían el origen exacto de dicha acumulación.

Las causas del autismo permanecen poco claras. Las enfermedades complejas son probablemente provocadas por la combinación de alelos raros y variantes comunes que representan solo un pequeño riesgo para desarrollar la enfermedad, pero que combinados dan como consecuencia el fenotipo autista y a veces pasan desapercibidos en los análisis biológicos; o podríamos hablar de epigenética.

En los trabajos anteriores, a pesar de los nuevos avances, los resultados son contradictorios y no es sencillo repetir los experimentos, por lo que no dejan del todo claras las causas. Pudiera deberse a uno o a la combinación de varios factores, incluyendo tamaños de muestra muy pequeños, combinación de múltiples genes interactuando con efectos pequeños, heterogeneidad genética y por la propia diversidad fenotípica del espectro autista, todo lo cual hace que sea más difícil establecer la correcta relación genotipo-fenotipo en este tipo de trastornos. La única conclusión común es que el daño al desarrollo neuronal de estos niños ocurre antes de alcanzar los 3 años de vida.

Recientemente ha surgido el interés de identificar endo-fenotipos en autismo. Los endo-fenotipos se refieren a fenotipos que reflejan procesos o mecanismos subyacentes y que pueden aproximarse a una herencia mendeliana, pudiendo ser más fáciles de detectar por los métodos de ligamiento convencionales, obteniendo así resultados reproducibles por diferentes grupos de investigación (Solís-Añez, 2007). Uno de estos endo-fenotipos que ha emergido, son las alteraciones cuantitativas y cualitativas de determinados componentes del sistema inmunitario en pacientes con autismo, como la hipersensibilidad a grupos específicos de alimentos que contienen caseína y/o gluten, que de hecho algunos niños han sido sometidos a dieta y se han evidenciado mejorías notables en su

desarrollo (De Escrivan, 2012), lo que ha llevado a la postulación de teorías inmunológicas en el autismo donde se implican principalmente los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) (Hjiej, 2008).

La dieta del paciente será un factor a tomar en cuenta en nuestro estudio, ya que tiene varias implicaciones: 1) la intolerancia al gluten y a la caseína están demostrando una respuesta inmunitaria diferente a la de los sanos y 2) varía los recursos disponibles en boca, por lo tanto pudiera interferir con los microorganismos que allí se desarrollan, específicamente el *Streptococcus mutans* causante de la caries. Por ser un sistema fisiológico el que estudiamos, la dieta podría estar incluida en la explicación a cualquier alteración bioquímica en la saliva de nuestros pacientes que pudiéramos notar.

Se ha observado un incremento alarmante en las proporciones de nacimientos de niños con autismo en los últimos años. Para el año 2012, la ONU registró que Venezuela en el año 2011, un 0,7% de la población nació con autismo; mientras que en el 2008 se había registrado un 0,1% (Montiel-Nava y col.; 2008). Por otro lado, Rangel en 2014, indicó en su artículo que los estados venezolanos con mayor número de casos con niños autistas eran Bolívar y Zulia, que coinciden con ser los más contaminados del país. Esto no solo ha ocurrido en nuestro país, sino a nivel mundial, según reporte del Centro para Control y Prevención de Enfermedades, del CDC (por sus siglas en inglés *Centers for Disease Control and Prevention*, 2008), que calcularon que 1 de cada 88 niños ha sido identificado con un trastorno del espectro autista (TEA). El cálculo del CDC proviene de la Red de Vigilancia del Autismo y las Discapacidades del Desarrollo (ADDM, por sus siglas en inglés *Autism and Developmental Disabilities Monitoring*) el cual observa el número de niños de 8 años con TEA que viven por comunidad. En 2013 la Dra. Clavera Ortiz, hizo una recopilación de datos de niños con autismo desde el año 1975 hasta 2011, donde

demuestra con una gráfica exponencial el crecimiento de esta condición a nivel mundial, lo que definió como una epidemia. Nada es concluyente, de manera no oficial lo asocian a incremento de la contaminación global en general.

I.2 La saliva:

La saliva es el fluido biológico de la cavidad bucal incoloro, viscoso, secretado en conjunto por las glándulas salivales mayores y menores. Es una solución saturada en iones calcio, fosfato y que además contiene flúor, proteínas y glucoproteínas. Entre sus funciones está la de proteger los tejidos bucales, participación en la digestión, gusto, efecto lubricante, acción amortiguadora y actividad antibacterial. Juega un rol muy importante en la salud bucal (Aguilar y col., 2003).

Según su procedencia se distinguen dos tipos de saliva:

- Saliva total o mixta, resultante de la mezcla de la secreción de todas las glándulas salivares (serosas y mucosas).
- Saliva parcial, es obtenida por cateterismo, de los respectivos conductos excretores de cada una de las glándulas (serosa o mucosa).

I.2.1 Glándulas salivales:

La saliva es excretada por las glándulas mayores (parótidas y sub-maxilar) en un 93% y por las menores (glándulas sublinguales) en un 7% (Puy, 2006). La producción de saliva está relacionada con el ciclo circadiano, de tal manera que en estado de reposo, como al dormir de noche, se segrega una mínima cantidad de la misma. Las glándulas mayores son responsables de la secreción en condiciones estimuladas (producen saliva mixta), mientras que las menores de la secreción en reposo (producen saliva principalmente mucosa, pero también mixta). Estudios previos comprueban que dependiendo de la hora del día y de la actividad del individuo (el estímulo presentado), el flujo salival varía (respondiendo a ritmos circadianos) y también la composición de la saliva (regulando

cambios de concentración basados en reabsorción) (Gómez de Ferraris y col., 2009); por lo tanto, en este estudio se procuró un horario de toma de la muestra que permitiera homogenizar las muestras en análisis.

Las glándulas constan de un grupo de células secretoras dispuestas alrededor de una luz estrecha, denominadas acinos y conforman la unidad secretora de las glándulas salivales (Fawcett, 1999). En estas unidades es donde el fluido salival es generado y la mayoría de las proteínas son sintetizadas y secretadas (Ross y col., 2004).

-Glándula parótida:

Es la de mayor tamaño de las glándulas salivales compuestas, son un par situadas por debajo y delante del oído, cuyo conducto excretor desemboca en la cavidad oral frente al segundo molar superior. Su principal característica es que su secreción es acuosa rica en enzimas principalmente serosa (Gartner y col., 2002).

-Glándula submandibular:

Son órganos pares, de tamaño intermedio, ubicados debajo del piso de la boca, una de cada lado, en el maxilar inferior. La principal porción de la saliva producida es serosa. También secreta mucinas (una mezcla de glucoproteínas que participan en lubricación y protección bucal) (Ross y col., 2004).

-Glándula sublingual:

Son las glándulas salivales más pequeñas, son pares y se sitúan en el piso de la boca, anteriores a las glándulas sub-maxilares. Están constituidas principalmente por acinos mucosos. Elaboran el 5% del total de la saliva. Su sistema de conductos no forma un conducto terminal, sino que varios conductos se abren en el piso de la boca. (Ross y col., 2004).

-Glándulas salivales menores:

Son pequeñas glándulas situadas entre los haces de músculo estriado de la lengua. Algunas son serosas y otras mucosas. Se encuentran en la submucosa de la mejilla y el

piso de la boca y están formadas por acúmulos muy ramificados. Las mucosas sobrepasan en mucho a las serosas. Se ha sugerido que estas glándulas segregan de forma continua y contribuyen a la formación de la saliva en reposo que humedece y lubrica la mucosa bucal (Fawcett, 1999).

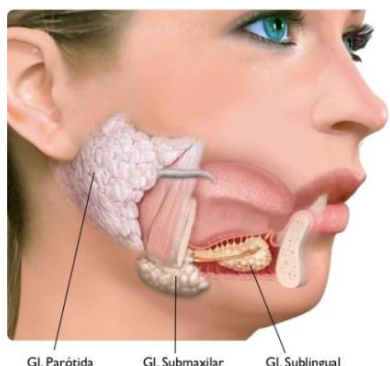


Figura 1. Glándulas mayores: glándula parótida, glándula submandibular y glándula sublingual; producen el 93% del volumen total de saliva mixta.

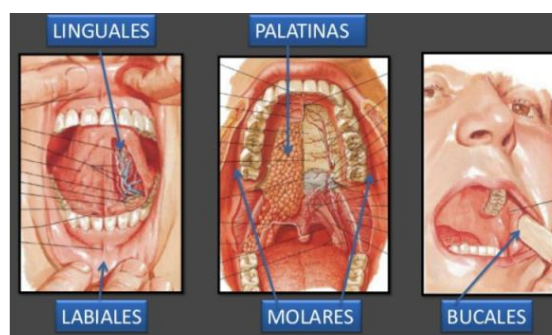


Figura 2. Glándulas menores: se ubican reunidas en acúmulos, y su principal secreción es saliva mucosa. Se ubican en el epitelio de la mucosa de la boca.

<http://www.asisccmaxilo.com> [consulta: 9 de Febrero de 2015]

I.2.2 Composición de la saliva:

El 99% de la saliva es agua y un 1% de electrolitos y macromoléculas orgánicas: iones calcio (Ca^{2+}), fosfato (PO_4^{3-}) y flúor (F^-) y proteínas en general: que componen las inmunoglobulinas, glucoproteínas y componentes de la microbiota bucal. Como fluido presente en la cavidad bucal, la saliva, cumple funciones de lubricación, protección de tejidos, barrera antimicrobiana y contra irritantes exógenos como químicos, y evita la desecación producto de la respiración (Grant y col., 1988). Esta composición confiere a la saliva sus funciones (Figura 3).



Figura 3. Cuadro esquemático composición-función en la saliva. (Aguilar y cols. 2003).

La saliva total en boca, además de sus componentes originales provenientes de su excreción por las glándulas salivales, también es nutrida de elementos provenientes de otros sitios bucales como: el **fluido crevicular gingival**, el cual es un líquido incoloro excretado en pequeñas cantidades a través del surco gingival, producto exudado inflamatorio proveniente del sistema linfático, que contiene proteínas plasmáticas y anticuerpos (Jablonski, 1982). Otros colaboradores de la composición de la saliva son los residuos y procesos de los microorganismos que moran en la cavidad oral, ya sean simbióticos propios de una salud bucal óptima, o producto de infecciones exógenas. Ellos forman la **biopelícula dental**, que Pérez-Luyo en el 2005, la define como una comunidad microbiana diversa que se adhiere a la superficie dental embebida en una matriz de polímeros de origen salival y de los mismos microbios. La formación de esta biopelícula involucra la interacción entre los colonizadores primarios y la película adquirida (PA) del

esmalte. Los colonizadores secundarios se unen a las bacterias inicialmente adheridas a través de interacciones moleculares específicas. Existe una relación entre las bacterias de la biopelícula y el huésped en la salud y en la enfermedad. Se encuentra implícito que las enfermedades pueden prevenirse no sólo inhibiendo directamente los patógenos, sino también interfiriendo con los factores ambientales que favorecen la aparición selectiva y crecimiento de estas bacterias y hongos. Aquí entran en juego algunos componentes de la saliva que tendrán esta función, inhibiendo por una u otra estrategia biológica el crecimiento de los microorganismos dañinos. Entre ellos existen componentes orgánicos e inorgánicos que forman una delgada membrana que se deposita en la superficie de los dientes como resultado de su adsorción, por interacción iónica, con la hidroxiapatita (fosfato de calcio de fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, principal componente del esmalte dental), formando la **película adquirida**, que es el nicho que define la biopelícula dental (Francia y col., 2006). Entre estos componentes de la saliva en general, destacan:

Componentes orgánicos:

Histatinas:

Son una familia de péptidos ricos en histidina que son secretadas primordialmente en la parótida y en la glándula submandibular. Las histatinas poseen propiedades antimicrobianas ya que alteran la permeabilidad de sus membranas (Schenkels y cols., 1995).

Proteínas ricas en prolina (PRP):

Son un grupo de proteínas en las que predominan aminoácidos prolina seguido de glicina y glutamato. Las proteínas ricas en prolina se dividen en dos grupos:

PRP ácidas: con una masa molecular de 16 kDa, estas proteínas unen calcio (Ca^{2+}) con gran afinidad, regulando la concentración del ión en la saliva (Bennick y col., 1983).

PRP glucosiladas: con una masa molecular de 36 kDa y están involucradas en las funciones de lubricación durante la masticación y participan en el reconocimiento del gusto (Hatton y col., 1985; y Azen y col., 1990).

Estaterinas:

Asociada también a funciones de lubricación, son proteínas ácidas de bajo masa molecular, compuestas de 43 aminoácidos. Es secretada por las glándulas parótida y submandibular (Azen y col., 1990). Junto con las PRP acídicas, juegan un papel muy importante en la homeostasis del Ca^{2+} . Inhibe la precipitación espontánea de éste y de las sales de carbonato y fosfato, (los componentes del esmalte dental) (Hay y col., 1986; Raj y col., 1992)

Mucinas:

Son proteínas altamente glucosiladas cuya conjugación de azúcares difiere estructuralmente de las proteínas en suero y de los proteoglicanos (Klein y col., 1992). Se presenta en dos tipos en saliva humana:

- Mucinas de alta masa molecular (MG1): tiene una masa molecular de 1000 kDa, se adhiere a la superficie del diente formando una barrera contra los ataques acídicos (Nieuw y col., 1987).
- Mucinas de baja masa molecular (MG2): entre 150 y 200 kDa, se une a gran número de microorganismos que incluyen Candida albicans y Aggregatibacter actinomycetemcomitans evitando la colonización (Groenick y col., 1995).

Cistatinas:

Familia peptídica donde predominan las cisteínas y las estructuras beta-paralelas; son un grupo de proteínas (9 isoformas) de baja masa molecular (por los 13 kDa aproximadamente) presentes en todas las secreciones del tipo mucosas. Actúa como inhibidor de las proteinasas, protegiendo los tejidos de los ataques proteolíticos por bacterias y virus (Abrahamsson, 1986).

α -amilasa salival:

Principal participante de la digestión primaria de los carbohidratos y formación del bolo alimenticio. Es una enzima de entre 46 y 60 kDa, y es uno de los componentes más abundantes de la saliva (Schenkels y col., 1995).

Lisozima:

Posee actividad enzimática antibacterial, ya que cliva enlaces β 1-4 glucosídicos entre el ácido murámico y residuos N-acetilglucosamina en los peptidoglucanos de la pared celular de las bacterias (Schenkels y col., 1995).

Lactoferrina:

Es producida por las células de la mucosa epitelial. Tiene una masa molecular de 80 kDa, En la saliva, esta glucoproteína de la familia de las transferrinas, tiene la capacidad de secuestrar el hierro de los sitios de infección y así, priva de un nutriente esencial a las bacterias, inhibiendo su crecimiento (Rodriguez-Franco y col., 2005).

Aglutinina:

Proteína altamente glucosilada con una masa molecular de aproximadamente 340 kDa, que porta antígenos activos de grupos sanguíneos. Comparte similitudes con MG2, al ser además monomérica, con propiedades altamente adhesivas y porque se une a gran variedad de microorganismos incluyendo *S. mutans* y *S. sanguis*. Su nombre deriva de su función de aglutinar, unir entre sí, a estas bacterias (gracias a su capacidad adhesiva) para luego ser desechadas por vías digestivas mediante la deglución (García Triana y col., 2012).

Peroxidasa humana salival:

Presenta un peso molecular de 73-78 kDa. Es una enzima que cataliza la formación de compuestos bactericidas como el hipotiocianato (OSCN^-) y el ácido hipotiocianoso (HOSCN^-), a partir del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el tiocianato (SCN^-). Estos compuestos oxidantes pueden reaccionar rápidamente con los grupos sulfidrilos de las

enzimas bacterianas involucradas en la obtención de energía a partir de la glucosa; así inhiben su función y la concomitante producción de ácidos. Se han comercializado diversos productos como pastas dentales y enjuagues bucales, dirigidos a incrementar la actividad endógena de esta enzima. Sin embargo, se cree que su principal función es eliminar al peróxido de hidrógeno generado localmente por las bacterias, sustancia altamente tóxica para las células de los mamíferos. Otra función no asociada a la generación de agentes oxidantes que se le ha atribuido a esta enzima, es la inhibición de la producción de polisacáridos extracelulares que fortalecen la unión de las bacterias a la superficie dentaria que forman la biopelícula dental (García Triana y col., 2012).

Albúmina:

Es una de las proteínas que se encuentra en mayor cantidad en el plasma sanguíneo y se puede encontrar en cualquier fluido del cuerpo humano (saliva, sudor, lágrimas, leche materna, etc), pues su función principal es mantener la presión oncótica de los compartimientos vasculares, es decir, regula la secreción o exudación de los mismos al exterior. Su peso molecular aproximado es de 67 kDa. Algunos estudios la asocian a la presencia de otras macromoléculas en dichos fluidos, como partícipe de la regulación de la concentración en la que éstos están presentes (Carins y col., 2002).

Inmunoglobulina A (IgA):

La IgA es una inmunoglobulina predominante del sistema inmune a nivel de mucosas, ya que en su isoforma con el componente secretor (IgA secretora), adquiere la capacidad de estar presente en la superficie epitelial. La IgA salival, como parte del engranaje inmune, tiene funciones de defensa bucal y llega hasta esta mucosa mediante el fluido crevicular gingival (Grahnborg y col., 1982).

Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP):

Numerosos estudios involucran a las MMP o matrixinas, como una de las principales moléculas relacionadas con la degradación y/o remodelación de los componentes de la

matriz extracelular. Las MMP constituyen una familia de endopeptidasas metal-dependiente para la cual se han identificado al menos 23 miembros. Esta familia se clasifica en cinco clases principales: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, MMP de membrana y un grupo heterogéneo de MMP. Ellas comparten características funcionales y se diferencian en la especificidad por el sustrato y su origen celular. Dentro de las características comunes para las MMP se describe: el ser secretadas como una proforma inactiva o latente; el que requieren un pH neutro para poder actuar y el incluir en su estructura un dominio propéptido, un dominio catalítico y un dominio 16-hemopexina. El dominio catalítico se caracteriza por la presencia de dos átomos de zinc en el sitio activo de la molécula y un residuo de cisteína esencial para el mantenimiento de la latencia enzimática. La activación se produce al interrumpirse la interacción entre este residuo aminoacídico con el átomo de zinc en el sitio activo enzimático. Este fenómeno ocurre en el espacio extracelular donde las MMP activadas, reconocen y se unen a la matriz extracelular (MEC). Los principales sustratos de las colagenasas son el colágeno tipo I, II y III. Las gelatinasas hidrolizan principalmente componentes de la lámina basal como gelatina y colágeno tipo IV. Las estromelisin degradan elastina y colágenos tipo IV, V, X y XI. Las MMP de membrana no se agrupan de acuerdo al sustrato hidrolizado, sino por su ubicación celular.

Las MMP están ampliamente distribuidas en el organismo, donde desempeñan una serie de funciones fisiológicas como la cicatrización, la reabsorción ósea, la involución mamaria, procesos fisiológicos asociados al embarazo y al parto, migración de células inflamatorias, angiogénesis, etc. Todos estos procesos son dependientes de la actividad controlada de estas enzimas extracelulares, las que en términos generales son reguladas por 3 mecanismos: 1) regulación de la transcripción; 2) activación de la MMP latente y 3) por sus inhibidores naturales: los inhibidores tisulares de 17 metaloproteinasas (TIMP). La desregulación en cualquiera de ellos, puede dar origen a procesos patológicos como:

metástasis, desórdenes autoinmunes, ulceraciones tisulares, entre otros. Algunas variedades de MMP han sido descritas en la saliva total y en la biopelícula dental. Las MMP reportadas en nuestro estudio corresponden a la subfamilia gelatinasas, la que está compuesta por MMP-2 o gelatinasa A y MMP-9 o gelatinasa B, de 72 y 92 kDa, respectivamente. En estas enzimas, un dominio de unión a gelatina adicional se inserta en el dominio catalítico, situación que permite su identificación inferencial en zimogramas preparados con este sustrato. Inicialmente, se pensaba que las MMP de la saliva total se originaban en el fluido crevicular gingival. Sin embargo, estudios recientes indican que se encuentran también en la saliva parotídea en condiciones de normalidad (Torres Chomón, 2005).

Componentes inorgánicos:

Bicarbonato y fosfato salival:

Otra función de la saliva es mantener en equilibrio el pH de la cavidad bucal y esto lo logra gracias a la capacidad amortiguadora que le confieren los iones bicarbonato (aumenta su concentración en flujo salival estimulado), y así protege los tejidos bucales contra la acción de los ácidos de la comida o de la acción bacteriana y fúngica (Ericsson; 1959; Edgar, 1992). El tampón fosfato juega un papel fundamental en situaciones de flujo salival bajo. Por encima de un pH de 6, la saliva está sobresaturada de fosfato con respecto a la hidroxiapatita. Cuando el pH se reduce por debajo del pH crítico (5,5), la hidroxiapatita comienza a disolverse y los fosfato liberados tratarán de restablecer el equilibrio perdido, lo que dependerá en último término del contenido de iones fosfato y calcio circundante, protegiendo así la integridad del esmalte dental (Puy; 2006). El pH de la saliva es en condiciones regulares entre 6,8 y 7,8 (Tenovuo, 1997).

Tampón bicarbonato: $\text{CO}_3\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CO}_3\text{H}^- + \text{H}^+$

Tampón Fosfato: $\text{PO}_4\text{H}_2^- \rightleftharpoons \text{PO}_4\text{H}^{2-} + \text{H}^+$

iones calcio, fosfato y flúor:

Los iones calcio y fosfato participan en el equilibrio de mineralización y desmineralización del diente (Figura 4) debido a que conforman la estructura de la hidroxiapatita (Camacho, 2004). El flúor está presente en muy bajas concentraciones en la saliva y forma fluoroapatita, así desempeña un papel fundamental en la remineralización, ya que al combinarse con los cristales del esmalte, éste es mucho más resistente al ataque ácido (De Estrada y col.; 2006).

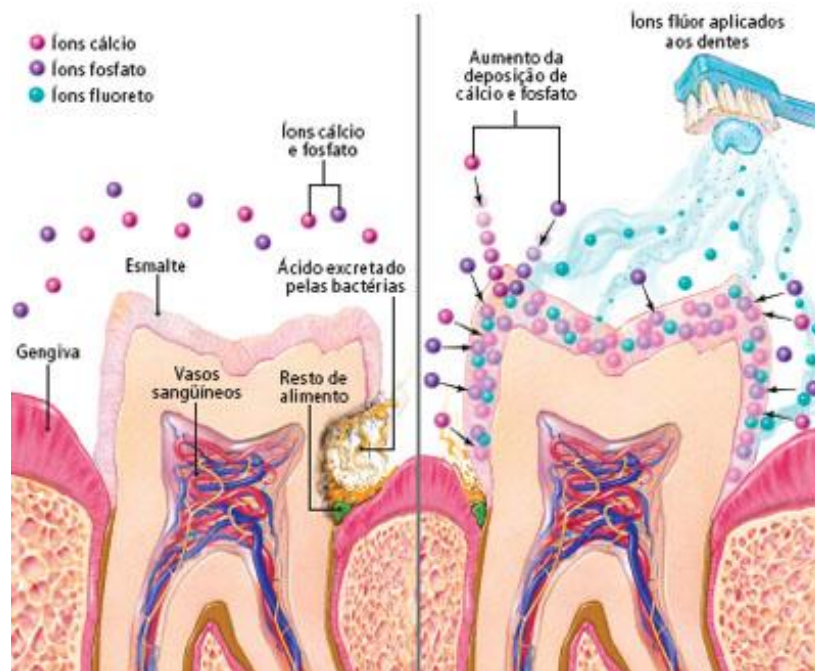


Figura 4. El esmalte cubierto de biopelícula dental se encuentra entre la encía y los dientes. Cuando los carbohidratos fermentables llegan a las bacterias de la biopelícula, ellos forman ácidos que empiezan a disolver el esmalte debido a la pérdida del equilibrio iónico y se desprende calcio y fosfato (desmineralización). Cuando el consumo de azúcar disminuye, la saliva puede lavar carbohidratos remanentes y diluir los ácidos generados por la fisiología bacteriana. El calcio y el fosfato pueden unirse nuevamente al esmalte. El proceso se facilita rápidamente con el uso de flúor.

http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/controversias_sobre_o_fluor.html

[Consulta: 9 de Febrero de 2015]. (Fagin, D., 2006).

. La cavidad bucal de cada persona, posee una microbiota característica debido a las condiciones peculiares de nutrientes, pH y humedad; y muy variable en función de distintos factores que confluyen localmente. Dependiendo del nicho alcanzado, existirá

una flora específica asociada, con sus respectivas proteínas características de la actividad fisiológica de la misma. Por ende, factores como dieta, hábitos de higiene dental, y ambiente de exposición, serán determinantes en cuanto a lo que se pueda analizar entre un paciente y otro en su perfil salival proteico (Álvarez López y col., 2009).

I.3 Índice de caries:

Se considera a la **caries dental** como un proceso patológico complejo de origen infeccioso, que afecta a las estructuras dentarias y se caracteriza por un desequilibrio bioquímico; que de no ser revertido a favor de los factores de resistencia, conduce a cavitación y alteraciones del complejo dentino-pulpar (De Estrada y col., 2006).

El **COP-D** se ha convertido en el índice fundamental de los estudios odontológicos que se realizan para cuantificar la prevalencia de la caries dental. Señala la experiencia de caries tanto presente como pasada, pues toma en cuenta los dientes con lesiones de caries y con tratamientos previamente realizados. Se obtiene de la sumatoria de los dientes permanentes cariados, perdidos y obturados, incluidas las extracciones indicadas, entre el total de individuos examinados, por lo que es un promedio. Se consideran solo 28 dientes. Para su mejor análisis e interpretación se debe descomponer en cada una de sus partes y expresarse en porcentaje o promedio. Esto es muy importante al comparar poblaciones. Se debe obtener por edades, las recomendadas por la OMS son: 5-6, 12, 15, 18, 35-44, 60-74 años. Morón y col., publicaron en 2009, que la prevalencia de caries en Venezuela en una población de 5 a 12 años con diversidad étnica era de 1= muy bajo.

Nomenclatura: **C** = caries **O** = obturaciones **P** = perdido

El índice **ceo-d** se obtiene de igual manera pero considerando solo los dientes temporales cariados, extraídos y obturados. Se consideran 20 dientes. En los niños se utiliza el **ceo-d** (dientes temporales), las excepciones principales son los dientes extraídos

por tratamiento de ortodoncia o perdidos por accidentes, así como coronas restauradas por fracturas. Cuando el paciente tiene una edad en la cual presenta dentición mixta, dientes temporales y permanentes, se promedian ambos índices (COP y ceo).

La Organización Mundial de la Salud define el Índice COP-D a los 12 años como indicador de salud bucal de una población y de acuerdo con su valor establece una escala de gravedad de la afección en 4 niveles: (Fernández y col., 2015).

Muy Bajo: 0 a 1	Bajo: 2 a 3	Moderado: 4 a 5	Alto: 6 a + de 6
------------------------	--------------------	------------------------	-------------------------

Este dato será incluido en nuestro estudio, el cual fue medido por la odontóloga Mariana Morales, para asociarlo a nuestras conclusiones, ya que dicho índice varía entre niños con autismo y controles, según antecedentes (Jaber, 2011; Du y cols., 2015); por lo que se sugiere que los cambios en este dato tendrán relación con la composición salival del individuo.

I.4 La saliva: Un biofluido aliado.

Cada vez más, a nivel mundial, son mayores los avances en el uso de la saliva como biofluido rastreador, al mejorar los alcances de los diagnósticos que pudieran ser hechos con la misma. Como es el caso estudiado por Soukup y col. (2012), quienes demostraron que existe una relación lineal entre la concentración de ácido úrico en saliva y los riesgos de padecer un trastorno metabólico (obesidad, diabetes y/o trastornos cardiovasculares). Este resultado sugiere que el ácido úrico salival puede ser un biomarcador útil para monitoreo no invasivo de riesgos cardio-metabólicos; y así como este, existen varios ejemplos donde una biomolécula como cortisol, testosterona, entre otros, presente en el fluido salival puede arrojar información clínica sistémica del individuo.

La razón más importante de explotar la saliva como herramienta diagnostica es el hecho de que su obtención es un método no invasivo, y así se mejora la rutina de los análisis clínicos al paciente. Y es además, de muy fácil y segura manipulación para el operador (Lawrence, 2002; Chiappin y col., 2007).

II. Antecedentes

En un estudio preliminar en saliva de infantes, (Bustos y col., 1999), estudiaron la presencia de *Streptococcus mutans*, las concentraciones de calcio y fosfato en saliva de niños de 6 años en Chile, estableciendo una correlación positiva entre la presencia de esta bacteria y la existencia de caries.

En Dubai, Jaber (2011) realizó un estudio con 61 pacientes entre 6 y 16 años de edad (45 masculinos y 16 femeninos) diagnosticados con Trastorno del Espectro Autista (TEA) y como población control escogió igual número de pacientes sanos. A cada paciente se le realizó examen bucal completo y periodontal, así como la apreciación de caries. Se reportó, que a pesar de las condiciones desfavorables de ser un niño con TEA, el 97% de los pacientes analizados tenían un notable bajo índice de caries, respecto a los niños sanos.

En Hong Kong, (Du y col., 2015), compararon la salud gingival e índice de caries en 347 niños diagnosticados con TEA, de edades de 32 a 77 meses de nacidos, con otra población del mismo tamaño muestral, en la misma edad escolar pero controles. Concluyeron que hay diferencia significativa entre los niños controles y los TEA, en la cual, los niños con autismo presentan un índice de caries mucho más bajo y una salud gingival en óptimas condiciones, comparado con los otros niños. El pH salival y la capacidad buffer se mantuvo en valores similares para todos los grupos.

Castagnola y col., (2008) realizaron un estudio en el cual examinaron saliva extraída de 27 pacientes infantiles con autismo. Hicieron un perfil de ésta por espectrometría de masa y cromatografía líquida; y compararon estos resultados con los obtenidos para niños sin autismo. Hallaron diferencias, del 66% de significancia, en la cual los niveles de

fosforilación para 3 fosfopéptidos específicos de saliva (Histatina 1, Estaterinas y PRP ácidas) eran más bajos para niños TEA que para los controles. Es decir, estos péptidos se encontraron hipofosforilados. La fosforilación de los péptidos salivales involucra a la Golgi-caseína-quinasa, la cual es común para otros tejidos, como el del Sistema Nervioso Central. En un trabajo anterior (Castagnola y col., 2007), se analizó saliva de niños recién nacidos, prematuros y *a término*, y obtuvieron que los niveles de fosforilación de los péptidos salivales de un niño que le comienza a salir la dentadura alcanzaba ya los niveles de un adulto. Ellos sugieren que la fosforilación (o no) tardía de los péptidos durante los primeros días de vida del individuo pudiera causar asincronía o desregulación temporal de los procesos involucrados en la maduración, desarrollo y diferenciación neuronal, resultando en el fenotipo autista. Lo compararon con Síndrome de Rett, que por mutación en cromosoma X dominante de las niñas, tienen ausencia de una proteína y causa discapacidad mental. Sugieren que la hipofosforilación de las proteínas detectada ocurre en diversos tejidos y son excretadas en saliva.

Recientemente, Ngounou y col. (2015), desarrollaron un protocolo piloto de espectrometría de masa y cromatografía nano-líquida donde compararon la composición salival de niños con autismo y sin autismo. Los resultados fueron concentraciones elevadas de prolactina inducida, lactoferrina y diferentes isómeros de varias inmunoglobulinas con las cadenas alteradas. Concluyeron que su estudio es un método efectivo para la identificación de proteínas salivales como biomarcadores de esta condición, justificando las perturbaciones del sistema inmune y gastrointestinal, que presentan estos individuos.

Hagel y col. (2000), estandarizaron el protocolo de Elisa para saliva y midieron la concentración de inmunoglobulina A a niños con y sin infecciones helmínticas en regiones rurales de Venezuela que es el mismo protocolo que se utilizará para medir este factor

presente en saliva en este estudio. Hakeem y col. (1992) también midieron IgA en saliva para monitorear pacientes infantiles con enfermedad celiaca.

Mejía (2008) analizó saliva de adultos venezolanos con y sin enfermedad periodontal y empleó pruebas para determinación de fosfato y proteínas totales. También hizo electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de azul de Coomassie y tinción de plata. Además incluyó pruebas donde comparó congelación/descongelación de muestras y días límites de vigencia de las mismas. Las conclusiones fueron que la saliva mantenía su integridad hasta máximo 5 días después de tomada la muestra, aunque para la prueba de fosfato, por ser la más sensible, se recomendó realizar la misma en los próximos 3 días a la toma. Y, respecto a congelar/descongelar, concluyó que las muestras solo debían ser descongeladas una vez para el momento del análisis. Gracias a este estudio se estandarizó el protocolo de toma, almacenamiento y análisis de las muestras de saliva en nuestro laboratorio.

Cortés y col., (2008), compararon los resultados obtenidos al medir la concentración de calcio en saliva por el método de espectrometría de masas, cotejándolos con los resultados obtenidos con una adaptación del método de Orto-cresoltaleína complexona (OCPC) de Connerty y Briggs (1966), original para sangre. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa entre ambos, por lo que se logró estandarizar el método colorimétrico que se utiliza en el presente trabajo.

En nuestro laboratorio, se analizó la saliva de niños venezolanos (entre 5 y 13 años) con y sin caries (Escárte, 2008). Se determinaron las concentraciones de fosfato y proteínas totales y se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de azul de Coomassie y tinción de plata. Sus resultados no fueron definitivos y concluyeron que debía aumentarse el tamaño de la muestra. A pesar de esto, este estudio permitió estandarizar los métodos aquí nombrados para el análisis de saliva.

Dado que la saliva es una herramienta importante usada como medio indirecto de diagnóstico clínico de diversas enfermedades sistémicas y bucales, en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular Aplicada del IBE, estudiamos la composición iónica y proteica de este fluido, procedentes de pacientes de una condición específica como lo es el autismo infantil y establecer un perfil salival para dicha condición.

En base a lo anteriormente explicado, demostrado que los niños autistas presentan un menor índice de caries (Jaber, 2011; Du y col., 2015), surge la inquietud sobre si existen diferencias en algunos parámetros, como concentración de iones y proteínas y perfiles electroforéticos de proteínas de la saliva de niños diagnosticados con autismo y niños controles (sin autismo). Por ello nos hemos planteado la siguiente hipótesis:

Si existen diferencias en el índice cariogénico de niños con autismo respecto a niños controles, entonces deben existir diferencias en la composición y propiedades de la saliva de los mismos que justifiquen esto.

II. Objetivos

III.1 Objetivo General

Determinar si existen diferencias en los parámetros bioquímicos de la saliva de pacientes de 4 a 13 años de edad diagnosticados con autismo comparada con saliva de niños controles (sin autismo).

III.2 Objetivos Específicos

Para pacientes autistas y controles:

- 1) Tomar muestras de saliva tomando en cuenta las condiciones éticas y de bioseguridad correspondientes.
- 2) Determinar el pH salival en el momento de toma de la muestra.
- 3) Determinar las concentraciones de proteínas, iones fosfato y calcio en muestras de saliva.
- 4) Determinar las concentraciones de inmunoglobulina A secretora total en muestras de saliva.
- 5) Determinar los perfiles electroforéticos de proteínas de saliva con coloración de Coomassie.
- 6) Determinar los perfiles proteolíticos presentes en saliva mediante una zimografía.

III. Materiales y métodos.

IV.1.- Población y material biológico.

Se emplearon muestras de saliva de pacientes entre 4 y 13 años, masculinos, diagnosticados con autismo (n= 34) y controles sanos (n= 34), con la previa autorización de sus representantes (Anexo 2 y 3); proporcionadas por la odontóloga especialista en atención especial, Mariana Morales, que se recolectaron: 1) en su consultorio privado Elite Dental, 2) en los colegios “CIPPEC”, “CEPIA” (perteneciente a la Fundación Autismo en Voz Alta) y “Escuela Comunitaria Luisa Goiticoa”, y 3) en el Servicio de Triage infantil de la Facultad de Odontología de la Universidad Santa María. En Caracas, Venezuela.

A las muestras, se les midió el pH al momento de ser tomadas y se transportaron al laboratorio en frío, para realizarle el protocolo de almacenamiento y su posterior análisis de concentraciones de proteínas, calcio, fosfato e inmunoglobulina A secretora total y los respectivos perfiles proteicos y proteolíticos.

Del paciente se recolectaron los siguientes datos: edad, presencia o no de lesiones de caries y si posee o no dieta (estricta).

Los criterios incluyentes para el estudio fueron los siguientes:

- Pacientes de edad entre 4 y 13 años.
- De sexo masculino.
- Que hayan sido diagnosticados con autismo leve o moderado. En el caso de la población control, que no tengan diagnóstico de ninguna enfermedad o condición (a excepción de caries).
- Que no se encuentren bajo ningún tratamiento médico que incluya medicinas y/o fármacos de ningún tipo.

- Al momento de tomar la muestra, el paciente debió haber realizado su última comida y luego cepillado sus dientes, 2 horas antes como mínimo. Solo se permitió el consumo de agua durante este tiempo.
- Las muestras salivales fueron tomadas en un intervalo de horario entre las 10:00 am y 3:00 pm. Para garantizar sincronía del ciclo circadiano y que fueran una mezcla proporcional de los tipos glandulares de saliva (saliva total o mixta).
- La muestra fue de saliva total. No estimulada.

Se le pidió al paciente que acumulara saliva en su cavidad bucal de manera natural y al tener un volumen suficiente, la depositara en un envase estéril. Se recolectó entre 2 y 3 mL por paciente.

IV.2.- Medición de pH.

El pH se determinó, una vez que el paciente había terminado de depositar el volumen de saliva en el recipiente, con la ayuda de un pHmetro portátil (marca Hanna Piccolo®, EE.UU.).

IV.3.- Centrifugación de la saliva entera.

Se tomaron varias alícuotas de 1 mL de cada muestra de saliva y se añadieron a un tubo Eppendorf® estéril de 1,5 mL. Se usaron al menos 4 tubos Eppendorf® por paciente para garantizar un tubo para cada análisis posterior (y así evitar congelar/descongelar la muestra). Los tubos fueron centrifugados a 16000 x *g* por 10 minutos. Luego, cada sobrenadante fue almacenado a -20°C.

IV.4.- Determinación de la concentración de proteínas totales en saliva humana mediante el método de Lowry y col. (1951).

Se tomó una de las alícuotas de saliva almacenada a -20°C , se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a $16000 \times g$ por 1 minuto. Del sobrenadante recolectado, se tomó una alícuota de $10 \mu\text{L}$ y se llevó a un volumen de $500 \mu\text{L}$ con agua bidestilada. Posteriormente se añadieron $2,5 \text{ mL}$ de la mezcla de soluciones **A** (Na_2CO_3 2%, NaOH 0,1N), **B** (Na-K-tartrato 2%) y **C** (CuSO_4 1%), cuya proporción fue A:B:C – 100:1:1; se agitó en vórtex y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadieron $100 \mu\text{L}$ de reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico) diluido 1:2 con agua bidestilada, se agitó con vórtex y se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro (marca: Spectronic®, modelo: Genesis2) a una longitud de onda de 660 nm.

Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) de 1mg/mL .

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

IV.5.- Determinación colorimétrica de la concentración del ión fosfato (PO_4^{3-}) en saliva por adaptación del método de Fiske y Subbarow (1925).

Se descongeló una alícuota de saliva por paciente a temperatura ambiente y se le realizó una centrifugación de $16000 \times g$ por 1 minuto. El sobrenadante recolectado se diluyó 1:20 con agua bidestilada.

Se tomó una alícuota de $50 \mu\text{L}$ de esta dilución y se completó hasta $200 \mu\text{L}$ con agua bidestilada. Luego, se agregaron $700 \mu\text{L}$ de la solución de molibdato de amonio al 2% en H_2SO_4 (2N) y seguidamente se agregaron $100 \mu\text{L}$ de FeSO_4 40% en H_2SO_4 (1N) y se agitó en vórtex. Se dejó reposar 45 minutos a temperatura ambiente y se leyó en

espectrofotómetro (marca: Spectronic®, modelo: Genesis2) a una longitud de onda de 830 nm.

Se realizó una curva de calibración con estándar de fosfato inorgánico (Pi) a partir de una solución madre de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 10 mmol/L.

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

IV.6.- Determinación de la concentración del ión calcio (Ca^{2+}) en saliva mediante la adaptación del método de Connerty y Briggs (1966).

Se trabajó con el método colorimétrico de orto-cresolftaleína complexona (Connerty y Briggs, 1966) adaptado para muestras de saliva en nuestro laboratorio (Cortés y col., 2008). Previamente se curaron todos los instrumentos de cristal que se usaron con HCl (0,5 mol/L).

Se descongeló una alícuota de saliva por paciente a temperatura ambiente y se le realizó una centrifugación de $16000 \times g$ por 1 minuto. Se tomaron 20 μL del sobrenadante y se agregaron 1980 μL de la mezcla colorante, se agitó en vórtex y se dejó en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se leyó en el espectrofotómetro (marca: Spectronic®, modelo: Genesis2) a una longitud de onda de 570 nm, utilizando una cubeta de cuarzo.

La composición de la mezcla colorante es: 2,5 mL de *Buffer* 14,8 (mol/L) de etanolamina-borato, más 750 μL de solución 5 % de 8-hidroxiquinoleína, más 2,5 mL de OCPC 0,8 mg/mL y se aforó con agua miliQ hasta un volumen final de 50 mL. La mezcla colorante se preparó al momento de su uso.

Se realizó una curva de calibración con solución estándar de carbonato de calcio (Ca_2CO_3) 1mmol/L y 5 mmol/L.

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

IV.7.- Determinación de la concentración de inmunoglobulina A secretora total en saliva (Hagel y col., 2000):

Para determinar la concentración de IgA secretora total se utilizó la técnica de ELISA modificada (Hagel y col., 2000) en el Laboratorio de Inmunoquímica II del Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit" en el Hospital José María Vargas, en conjunto con la Dra. Isabel Hagel. Se utilizaron placas de microtitulación (Nunc Maxi sorp®) sensibilizadas durante 16 horas a 4 °C con un anticuerpo monoclonal anticomponente secretor IgA humano (SIGMA®), a una dilución 1:3000 en *coating buffer* bicarbonato (SIGMA – ALDRICH®) a pH 9,6. Se aspiraron y se lavaron con 100 µL/pozo de PBS (por sus siglas en inglés: *phosphate buffered saline*, tampón fosfato salino) –*tween* al 0,05%, cuatro veces. Fueron bloqueadas con 100 µL/pozo de PBS–suero de caballo (*Horse Serum* SIGMA- ALDRICH®) al 10% durante dos horas a 37 °C y luego se aspiró. Se dejaron descongelar las muestras de saliva a temperatura ambiente, se diluyeron 1:4 con PBS–suero de caballo (10%) y se agregaron 100 µL/pozo. Se colocaron durante una hora a 37 °C en una incubadora. Se aspiró y se lavó con 100 µL/pozo de PBS –*tween* (0,05%) cuatro veces. Se agregaron 100 µL/pozo del anticuerpo anti- IgA marcado con peroxidasa (SIGMA®) diluido 1:1000 en PBS–suero de caballo (10%) y se colocaron a 37 °C por una hora. Se aspiró y se lavó con 100 µL/pozo de PBS–*tween* (0,05%) cinco veces. Se reveló con 100 µL/pozo de una solución de 8 mg de OPD (orto-fenilenodiamina) en 12 mL de agua bidestilada más 5 µL de peróxido de hidrógeno. Se dejó reposar por 15 minutos en oscuridad y se detuvo la reacción con 30 µL/pozo de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1,25 mol/L). Se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Biorad® 550). Los valores fueron expresados en µg/mL a partir de una curva de calibración construida con valores de concentración de IgA secretora total humana de calostro (SIGMA®).

Cada ensayo se realizó una sola vez.

IV.8.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% bajo condiciones disociantes (SDS- PAGE).

Se realizaron geles de 12% de acrilamida, de 9 cm x 7 cm, en condiciones disociantes, según el protocolo descrito por Laemmli (1970), con revelado en tinción de azul de Comassie.

Gel de separación (Gel 12%):

Se mezcló Tris-HCl 0,4 mol/L (pH: 8,8), glicerol 1,5 %, acrilamida 12 %, SDS (por sus siglas en inglés: *sodium dodecyl sulfate*, dodecilsulfato sódico) 0,1 %, TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etileno- diamina) 0,1 % (v/v) (Marca River Behind®) y persulfato de amonio (PSA) 0,02 %.

Una vez agregada toda la mezcla 12 % a las placas de vidrio, se dejó polimerizar y se agregó agua destilada en la superficie para compactar el gel.

Gel de apilamiento (Gel al 5%):

Se realizó con una solución de: Tris-HCl 0,36 mol/L (pH: 6,8), glicerol 1,5 %, acrilamida 4 %, SDS 0,1 %, TEMED 0,15 % y persulfato de amonio (PSA) 0,04 %.

Se agregó esta mezcla con una micropipeta en las placas de vidrio, sobre el gel de separación ya polimerizado, luego de escurrir el agua que éste tenía en su superficie. Luego se calzó el peine para formar los bolsillos y se dejó polimerizar.

Preparación de la muestra:

Se tomó una alícuota de saliva almacenada a -20 °C por cada paciente y se descongeló a temperatura ambiente. Se tomó el volumen equivalente a 80 µg de proteína de cada muestra. Se agregó un volumen igual de TCA (ácido tricloro acético) al 20 % para precipitar las proteínas (quedando a una concentración final de TCA al 10%). Se dejó reposar 20 minutos en frío (cava con hielo). Luego se centrifugó a 16000 x g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Al sedimento se le agregaron 5 µL de Tris-HCl 1 mol/L (pH: 8) para basificar el medio y luego 45 µL del **buffer de muestra**: Tris-HCl 60

mmol/L (pH: 6,8), glicerol 20 %, β -mercaptoetanol 5 % (v/v), azul de bromo fenol 0,02 % y SDS 10 %. Las muestras así tratadas se agitaron con una varilla de plástico durante un minuto, se centrifugaron a 16000 x *g* por 30 segundos y luego se calentaron en baño de María durante 5 minutos.

Se cargó cada muestra en un bolsillo del gel.

Una vez montado el sistema en la cámara electroforética, se corrió a un voltaje de 75 V por media hora y luego se cambió a 120 V hasta que se observó el frente de corrida al final del gel (tardó alrededor de una hora).

Revelado del gel:

Tinción de azul de Coomassie:

Se trasladó el gel a un recipiente y se cubrió con **solución colorante** (azul de Coomassie R-250 al 0,25 % en metanol 50 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v)) por unas 12 horas. Se mantuvo en constante agitación. Se escurrió dicha solución y se agregó **solución descolorante** (50% Metanol, 10% Ácido acético (v/v)). Se realizaron lavados consecutivos con esta solución, cambiándola cuantas veces fue necesario, hasta que se observaron solo las bandas coloreadas de azul en el gel. Luego se preservó el gel en **solución conservadora** (glicerol al 3% (v/v) y metanol 10% (v/v)).

Se digitalizó el gel en un escáner (marca HP[®]) y se analizó el perfil electroforético de las proteínas observadas.

IV.9.- Zimografía en muestras de saliva total.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (7 cm x 9 cm) copolimerizado con gelatina 1% (piel de cerdo, SIGMA®). Este procedimiento es una modificación del método descrito por Laemmli (1970), en donde se añade gelatina en lugar de glicerol (Okada y cols, 1992). El gel separador es preparado a una concentración

de 12% (3 mL de *buffer* Tris-HCl a pH 8,8; 0,4% de dodecil sulfato sódico (SDS) (p/v); acril-bisacrilamida en proporción 29:1; gelatina piel de cerdo 1 mg/mL (p/v); agua bidestilada; persulfato de amonio (PSA) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina o TEMED). El gel de apilamiento se prepara sin modificación alguna al protocolo descrito en el apartado IV.5, manteniendo la concentración de 5% (Acril-bisacrilamida en proporción 29:1; tampón Tris-HCl a pH 6.8; 0,4% de dodecil sulfato de sodio (p/v); agua bidestilada; persulfato de amonio (PSA) al 10% (p/v) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina o TEMED).

Preparación de las muestras para zimografía.

Para los zimogramas se agregaron volúmenes de la saliva de cada paciente equivalentes a 20 µg de proteína y se llevó a un volumen final de 30 µL con tampón de carga (SDS al 2,5%; Sacarosa 0,01%; Rojo fenol 0,01%). Luego, las muestras se cargaron en cada bolsillo correspondiente.

Una vez montado el sistema en la cámara electroforética, el gel se corrió a un voltaje constante de 100 V en *buffer* Tris/glicina/SDS y a una temperatura de 4 °C. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron lavados en Triton X-100 al 2,5% (v/v) tres veces por 30 minutos en agitación continua. Terminada esta etapa, los geles fueron colocados en *buffer* de digestión: 50 mmol/L CaCl₂, 0,5 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, pH 7,8 a 37 °C durante 6 horas. Finalmente los geles fueron teñidos en azul de Coomassie R-250 al 0,25% por 1 hora y media. Luego, se realizaron recambios continuos en solución decolorante (metanol 50% - ácido acético 10%) para su revelado hasta que se observó el perfil electroforético.

Se digitalizó el gel con un escáner (marca HP® scanjet 8520) y se analizó el patrón proteolítico observado.

IV.10.- Análisis odontológico.

Los índices de caries y de higiene oral fueron suministrados por la odontóloga Morales y se utilizaron como referencia de comparación para la discusión de los resultados bioquímicos. Dichos análisis fueron hechos siguiendo los siguientes parámetros:

Índice de Caries COP-D y ceo-d (Fernández y col., 2015) e **Índice de Higiene Oral Simplificado** (Greene y Vermillion, 1964).

Tabla 1.- Clasificación del índice COP-D y ceo-d según la OMS

Índice de caries	Clasificación cualitativa
0 a 1	muy bajo
2 a 3	Bajo
4 a 5	Moderado
+ de 6	Alto

Tabla 2.- Clasificación del índice IHO-S según Greene y Vermillion.

Índice de higiene oral simplificado (IHO-S)	Clasificación cualitativa
0,0 – 1,0	Óptimo
1,1 – 2,0	Regular
2,1 a 3	Malo
más de 3	muy malo

IV.11.- Aplicación de tratamiento estadístico a la data recolectada.

Los valores de pH y las concentraciones de calcio, fosfato, proteínas totales e inmunoglobulina A secretora total se muestran respecto a su promedio y su desviación estándar (DE).

Se les aplicó a los datos el parámetro de homogeneidad, prueba de Hartley- Cockran-Barlett, para escoger el uso de la prueba estadística paramétrica o no paramétrica.

Dado que los resultados obtenidos cumplieron con las condiciones y basados en la teoría consultada (Peña, 2009), la conclusión fue aplicar la prueba de “T” de *student* para

grupos independientes, que mediante este análisis se contrasta si dos grupos independientes tienden a tener medias poblacionales diferentes uno del otro.

Se plantearon las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0). No existen diferencias observadas entre ambas poblaciones, por lo tanto sus medias son iguales. $\mu_1 = \mu_2$.
- Hipótesis alternativa (H_1). Las medias de los resultados de un ensayo específico para pacientes con autismo son diferentes que los observados en pacientes control. $\mu_1 \neq \mu_2$.

Para todos los estadísticos de prueba se escogió una región de rechazo de $\alpha = \pm 0,05$. Todos los $p < 0,05$ serán considerados significativos.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 10 para Windows® (STAT Inc., EE.UU., 2009).

Cada resultado correspondiente a cada factor bioquímico evaluado se expresó en gráficas conocidas con el nombre de “cajas y bigotes”, que permiten cómodamente observar los datos estadísticos de cada ensayo y hacer seguimiento de los pacientes a lo largo de este estudio. Se definió el cuadro central del gráfico como el promedio de los valores de la población, el cuadro que encierra a éste, como el promedio más el error típico, las barras como el promedio más el intervalo de confianza definido en 95%, los valores atípicos serán los incluidos en el intervalo entre 5% y 0,1% de la población y los valores extremos serán los menores al 0,1% de dicha población.

Todo este análisis se realizó bajo la asesoría del profesor Víctor Hugo Aguilar, del Instituto de Geografía de la UCV.

V. Resultados.

Se tomaron muestras de 68 pacientes, todos de sexo masculino, de los cuales 34 correspondían a diagnosticados con autismo leve o moderado que acudieron a consulta odontológica privada al consultorio “Élite Dental” con la odontóloga Mariana Morales y de los colegios que participaron. Y, los otros 34, fueron pacientes sin autismo los cuales unos acudieron a consulta odontológica igualmente con la odontóloga Morales y otros acudieron al servicio de Triage Infantil de la Facultad de Odontología de la Universidad Santa María. Todos en Caracas, Venezuela.

A continuación se muestran los datos y resultados de los ensayos realizados en resumen de todos los pacientes en estudio (Tabla 3). Se obtuvieron valores muy cercanos entre las poblaciones comparadas en la mayoría de los ensayos aplicados. Solamente para la concentración de calcio en saliva, el índice de caries y el índice de higiene oral, el análisis estadístico arrojó diferencias significativas. No en todos los ensayos se pudo evaluar la misma cantidad de pacientes, por lo que al lado de cada resultado se coloca el tamaño respectivo de cada población (n).

Tabla 3.- Cuadro resumen de los factores bioquímicos y descripción de la población de los estudios realizados en pacientes con autismo y control.

	Paciente		Población total (n)
	Autista	Control	
Edad (años) (Prom ± DE)	8,44 ± 2,16	7,76 ± 1,67	34/ 34 68
pH (Prom ± DE)	7,20 ± 0,48	7,27 ± 0,34	34/ 34 68
[Proteínas] (Prom ± DE)	2,07 ± 0,88	2,18 ± 0,83	29/ 30 59
[Iones fosfato] (mmol/L) (Prom ± DE)	4,02 ± 1,87	3,33 ± 2,11	9/ 8 17
[Iones calcio] (mmol/L) (Prom ± DE)	0,57 ± 0,28	0,77 ± 0,36	33/ 30 63
[IgA] (µg/mL) (Prom ± DE)	71,43 ± 18,43	80,82 ± 46,76	9/ 10 19
Dieta (%)	47,06	0	34/ 34 68
Caries (%)	20,59	73,53	34/ 34 68
Índice de caries (COP-D + ceo-d) (Prom ± DE)	1 ± 1 (muy bajo)	3 ± 2 (moderado)	34/ 34 68
Índice de higiene oral (IHO-S) (Prom ± DE)	2,3 ± 0,83 (malo)	1,79 ± 0,59 (regular)	30/ 31 61

* En color rojo se resaltan los resultados que tuvieron diferencias significativas estadísticamente, que serán explicados más adelante.

Dentro de las poblaciones estudiadas, se identificaron subdivisiones de las mismas que fueron también de importancia en este análisis comparativo. En la tabla 4 y 5 se muestran sus datos, donde podemos observar que hubo diferencia estadísticamente significativa para la concentración de calcio en saliva de los pacientes con autismo

dependiente de la dieta y en la concentración de fosfato en saliva de los pacientes controles dependientes de la caries.

Tabla 4.- Cuadro resumen de los factores bioquímicos y descripción de las subpoblaciones de los estudios realizados en pacientes con autismo.

Pacientes con Autismo	Con dieta	Sin dieta	Con caries	Sin caries
[Iones calcio] (mmol/L) (Prom ± DE)	0,47 ± 0,27 (n= 16)	0,67 ± 0,25 (n= 17)	0,63 ± 0,28 (n= 7)	0,56 ± 0,28 (n= 26)
[Iones fosfato] (mmol/L) (Prom ± DE)	2,65 ± 0,18 (n= 3)	4,71 ± 1,97 (n= 6)	2,44 (n= 1)	4,29 ± 1,9 (n= 8)
[IgA] (µg/mL) (Prom ± DE)	55,83 (n=1)	74,02 ±18,73 (n=6)	100,82 (n=1)	66,52 ±14,3 (n=6)
Caries (%)	25	16,67	-----	-----
Índice de caries (COP-D + ceo-d) (Prom ± DE)	1 ± 1,68 (n=16)	0 ± 0,98 (n=18)	-----	-----
Índice de higiene oral (IHO-S) (Prom ± DE)	2,34 ± 1,06 (n=16)	2,28 ±0,49 (n=18)	-----	-----

* En color rojo se resaltan los resultados que tuvieron diferencias significativas estadísticamente, que serán explicados más adelante.

Tabla 5.- Cuadro resumen de los factores bioquímicos y descripción de las subpoblaciones de los estudios realizados en pacientes controles.

Pacientes controles	Con caries	Sin caries
[Iones calcio] (mmol/L) (Prom ± DE)	0,83 ± 0,35 (n= 21)	0,64 ± 0,36 (n= 9)
[Iones fosfato] (mmol/L) (Prom ± DE)	1,47 ± 1,66 (n= 3)	4,45 ± 1,5 (n= 5)
[IgA] (µg/mL) (Prom ± DE)	86,2 ± 46,06 (n=9)	31,84 (n=1)

* En color rojo se resaltan los resultados que tuvieron diferencias significativas estadísticamente, que serán explicados más adelante.

2.- Determinación de pH:

Se compararon los valores de pH medidos en las muestras de saliva recién tomadas entre los pacientes y el grupo control. En la figura 5 se presentan en promedio los valores de pH para los dos grupos evaluados con su respectivo tratamiento estadístico y podemos observar un comportamiento casi igual para ambos, alrededor de un valor de pH= 7. Los datos extremos y atípicos se encuentran acotados entre pH= 6 y 8,3.

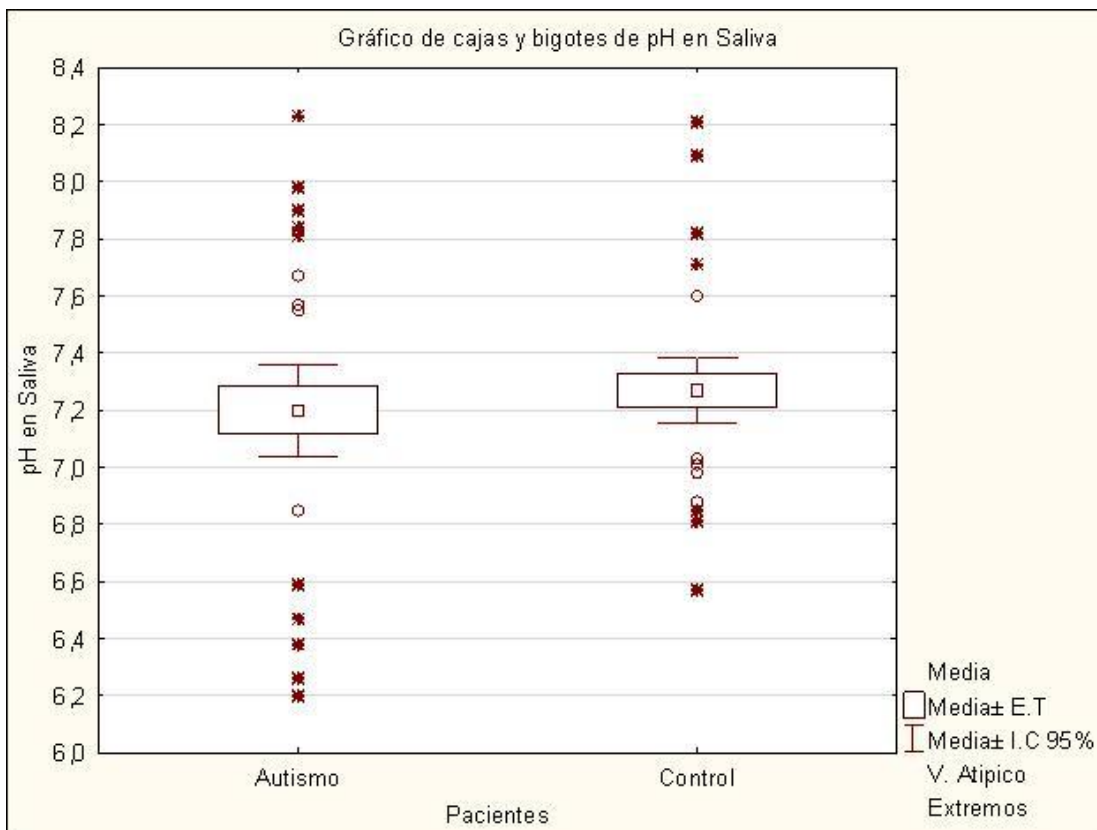


Figura 5. – Gráfica “cajas y bigotes” para valores de pH promedio en saliva de pacientes con autismo (n=34) y controles (n=34) medido con pHmetro portátil a la muestra recién tomada.

No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 0,68$; $p = 0,5$; $n = 34$).

3.- Determinación de concentración de proteínas totales en saliva.

Se compararon los valores de concentración de proteínas totales medidos en las muestras de saliva mediante el método de Lowry (1954). Se observa en general, en la figura 6, que ambos grupos mantienen valores muy similares y los datos extremos y atípicos se ubican en el intervalo comprendido entre 0,5 y 4 mg/mL.

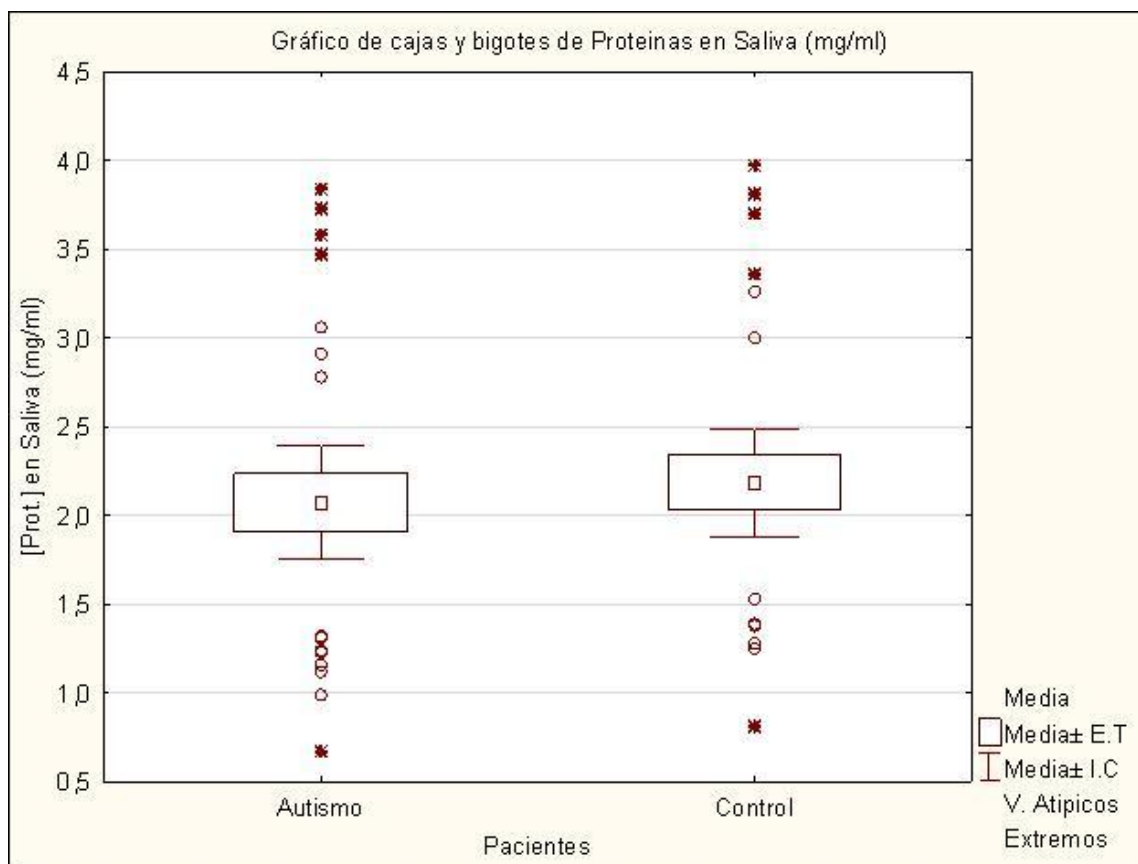


Figura 6. – Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de proteínas totales (mg/ ml) promedio en saliva de pacientes con autismo (n=29) y controles (n=30) cuantificado mediante método de Lowry.

No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 0,49$; $p = 0,62$; $n = 30$).

4.- Determinación de concentración de iones calcio en saliva:

Se compararon los valores de concentración de iones calcio medidos en las muestras de saliva mediante el método de Connerty y Briggs (1966) adaptado por Cortés en 2008. Observamos que ambas poblaciones poseen homogeneidad en la mayoría de sus datos; también, que hay una notable disminución en la concentración promedio del ión para los pacientes con autismo ($0,57 \pm 0,28$ mmol/L) respecto a los controles ($0,77 \pm 0,36$ mmol/L). Para la población con autismo, los datos extremos y atípicos están comprendidos entre 0,1 y 1,4 mmol/ L, mientras que para la control, observamos un ligero desplazamiento hacia arriba, con estos datos comprendidos entre 0,2 y 1,5 mmol/L (figura 7).

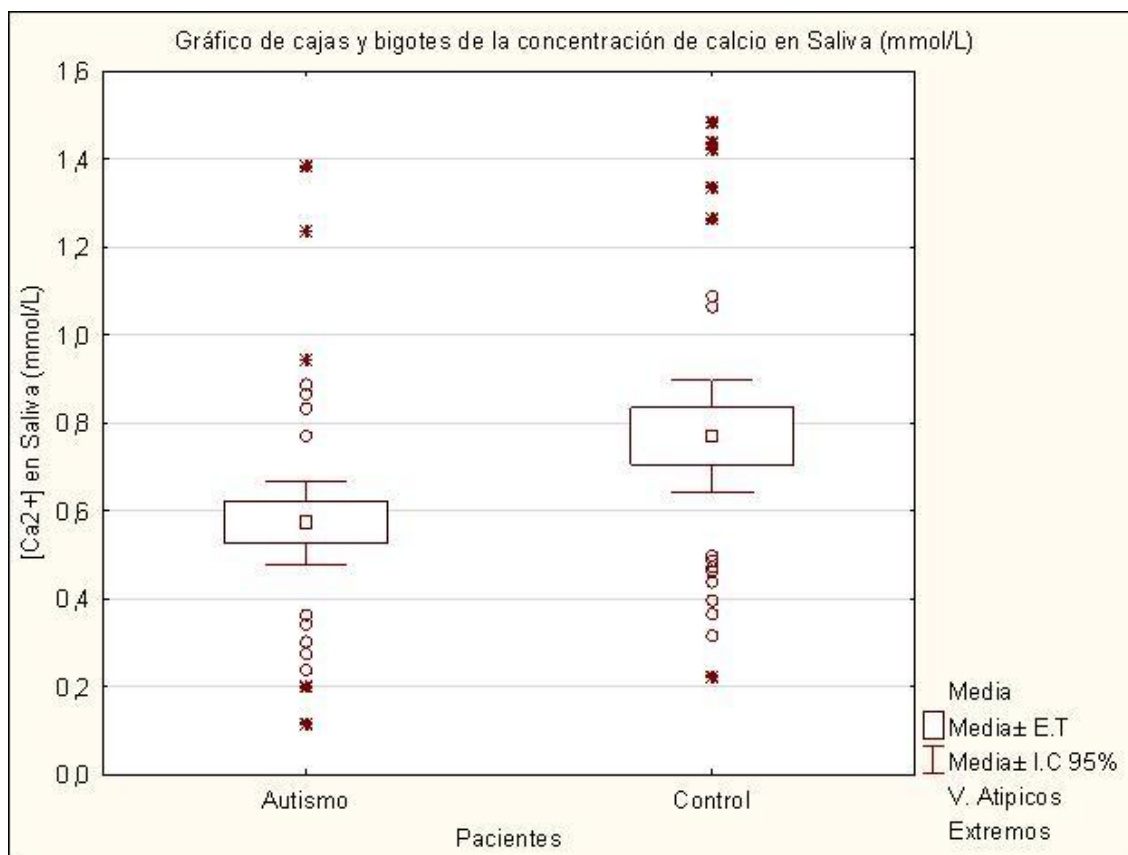


Figura 7. – Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de iones calcio (mmol/L) promedio en saliva de pacientes con autismo (n=33) y controles (n=30) cuantificado mediante método de Connerty y Briggs (1966) adaptado a saliva por Cortés (2008).

Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 2,45$; $p = 0,017$; $n = 33$).

5.- Determinación de concentración de iones fosfato en saliva:

Se compararon los valores de concentración de iones fosfato medidos en las muestras de saliva mediante el método de Fiske y Subbarow (1925). Se observa en la figura 8 que ambos grupos presentan valores de concentración muy variados, ya que ambas cajas que representan el promedio más el error típico son bastante amplias, lo que se interpreta como variabilidad de los datos en la misma población. Presentó solamente un dato atípico y sin valores extremos para cada población debido a lo pequeña de cada muestra. El promedio de iones fosfato en las muestras para pacientes con autismo fue de $4,02 \pm 1,87$ mmol/L y para los controles fue de $3,33 \pm 2,11$ mmol/L.

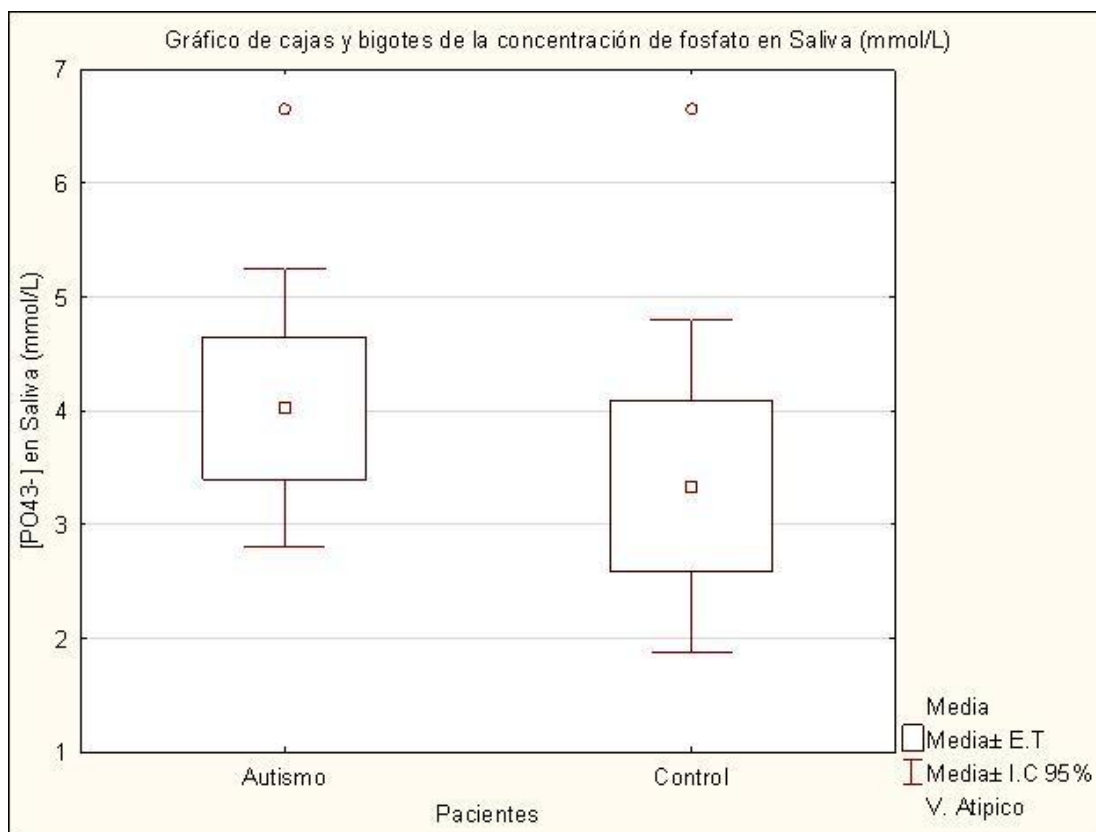


Figura 8. – Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de iones fosfato (mmol/L) promedio en saliva de pacientes con autismo (n=9) y controles (n=8) cuantificado mediante método de Fiske y Subbarow (1925).

No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 0,71$; $p = 0,49$; $n = 9$).

6.- Determinación de concentración de IgA secretora total en saliva:

Se compararon los valores de concentración de inmunoglobulina A (IgA) secretora total en las muestras de saliva mediante el método de ELISA estandarizado por Hagel y col. (2000). En este ensayo sólo fue posible incluir diez de los pacientes analizados y en la figura 9 podemos observar que se obtuvo una concentración de IgA secretora total para la población control de $80,82 \pm 46,71 \mu\text{g/mL}$ ligeramente mayor que la obtenida para la población autista, $71,43 \pm 18,43 \mu\text{g/mL}$. Los pacientes con autismo muestran datos más homogéneos que los pacientes control y se puede evidenciar en la diferencia reportada tanto en su desviación estándar como en el ancho de ambas cajas en el gráfico. Se

reportó un solo dato atípico para la población con autismo y un solo dato extremo para la control.

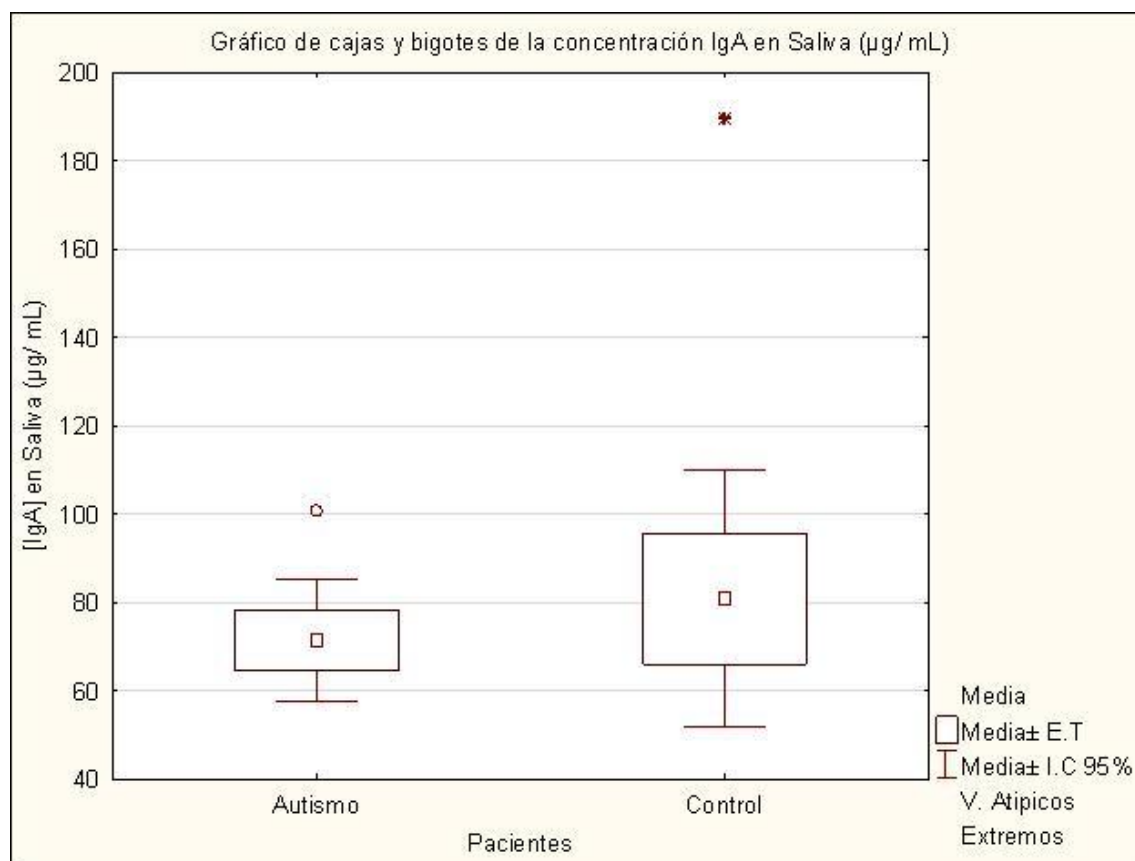


Figura 9. – Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de IgA secretora total (µg/mL) promedio en saliva de pacientes con autismo (n=9) y controles (n=10) cuantificado mediante método de ELISA estandarizado por Hagel (2000).

No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 0,5$; $p = 0,62$; $n = 10$).

7.- Perfil electroforético:

A cuatro muestras de saliva de pacientes control y cuatro muestras de pacientes autistas se les realizó un perfil electroforético en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) al 12% de 7 cm X 9 cm basados en el protocolo de Laemmli (1970) y se tiñó con azul de Comassie. La imagen que observamos a continuación (figura 10) es la representación digitalizada del gel que se obtuvo.

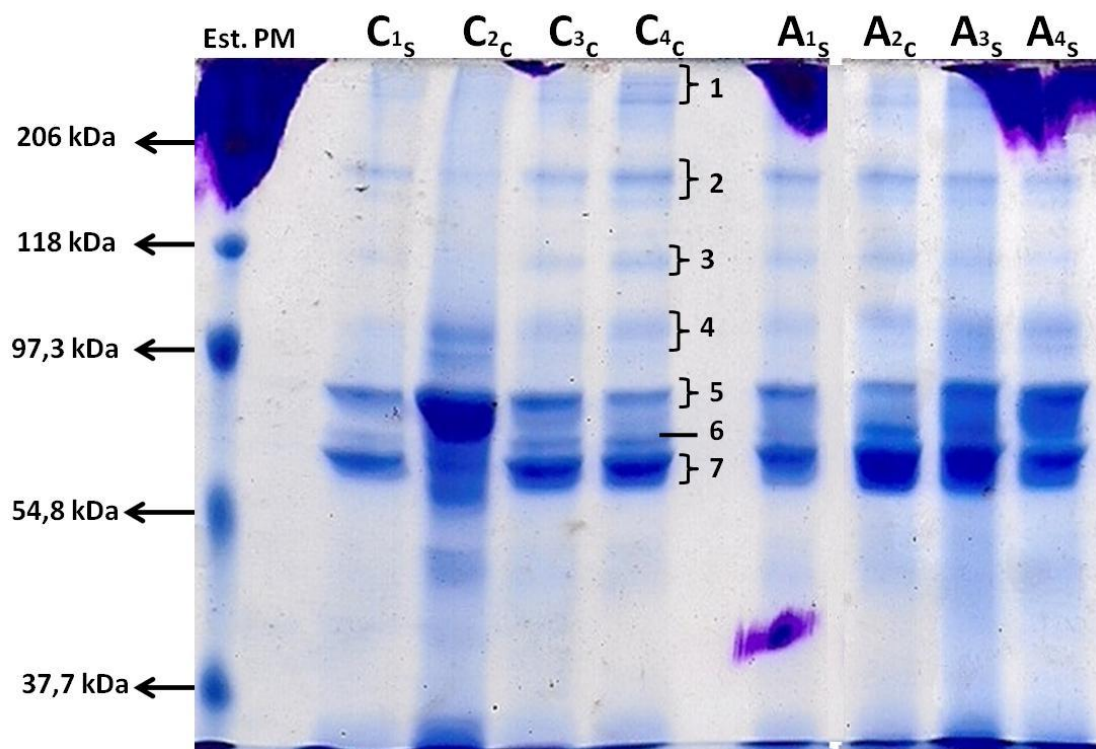


Figura 10. –Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes (SDS-PAGE) de 7cm x 9cm teñido con azul de Coomassie. Perfil electroforético de la saliva de pacientes con autismo sin caries (carril A1s, A3s y A4s), de paciente con autismo con caries (A2c), paciente control sin caries (carril C1s), pacientes control con caries (C2c, C3c y C4c) y de estándar de masa molecular de corrida (carril Est. PM). Se han enumerado del 1 al 7 las bandas sobresalientes en la corrida y se calculó su respectiva masa molecular, indicadas en la tabla 6.

Tablas 6 y 7.- 6) Masas moleculares aproximadas de las bandas observadas (1,2,3,4,5,6 y 7) calculadas a partir de la figura 10 y proteínas con peso conocido extraído de la bibliografía representadas en la tabla 7.

6)

Banda	PM (kDa)
1	260
2	174
3	125
4	102
5	83
6	73
7	68

7)

Proteína	Peso molecular (kDa)
Mucinas MG1	1000
IgA secretora	170 y 720
Aglutinina	340
Mucinas MG2	150 y 200
Lactoferrina	80
Peroxidasa	73 - 78
Albúmina	67
α -amilasa	46 y 60
PRP glucosilada	36
PRP acídica	16
Cistatinas	13

Podemos observar que en general los patrones de bandas en todos los pacientes son muy similares, resaltando en ellos las mismas siete bandas que se indican en la figura 10 relacionadas con las masas moleculares respectivas de las tablas 6 y 7. La mayor diferencia entre ambas poblaciones se puede observar en la densidad de las bandas 5, 6 y 7, es decir, en la expresión de dicha proteína en la muestra del paciente. En el carril C2c, paciente control, la banda 5 está mucho más densa que en los otros pacientes, incluso solapa las bandas subsiguientes de dicho carril. Y en los carriles A2c, A3s y A4s observamos que la banda 7 está más concentrada que en las demás muestras.

8.- Zimografías:

Se realizaron dos geles de los perfiles de actividad proteolítica de las muestras de saliva total de los pacientes, donde dicha actividad corresponde a las bandas claras de la imagen, pues son resultado de la digestión de la gelatina en esa zona por las proteínas en cuestión. En la figura 11 podemos observar el gel 1, en el que los dos pacientes con autismo sin caries (A1s y A2s) presentan un patrón de bandas muy similar entre ellos, en

el que solo se evidenció actividad en el área inicial de los carriles, con cuatro bandas visibles y definidas (1, 2, 3 y 4). Mientras que en los carriles con las muestras de los pacientes controles con caries (C1c y C2c) podemos ver que también ambos patrones proteolíticos son similares entre ellos, las mismas primeras cuatro bandas definidas, pero presentando mayor proteólisis en la banda 4 respecto a las muestras de los pacientes autistas. El paciente C2c muestra un patrón más extenso donde se observa una quinta banda separada de las demás.

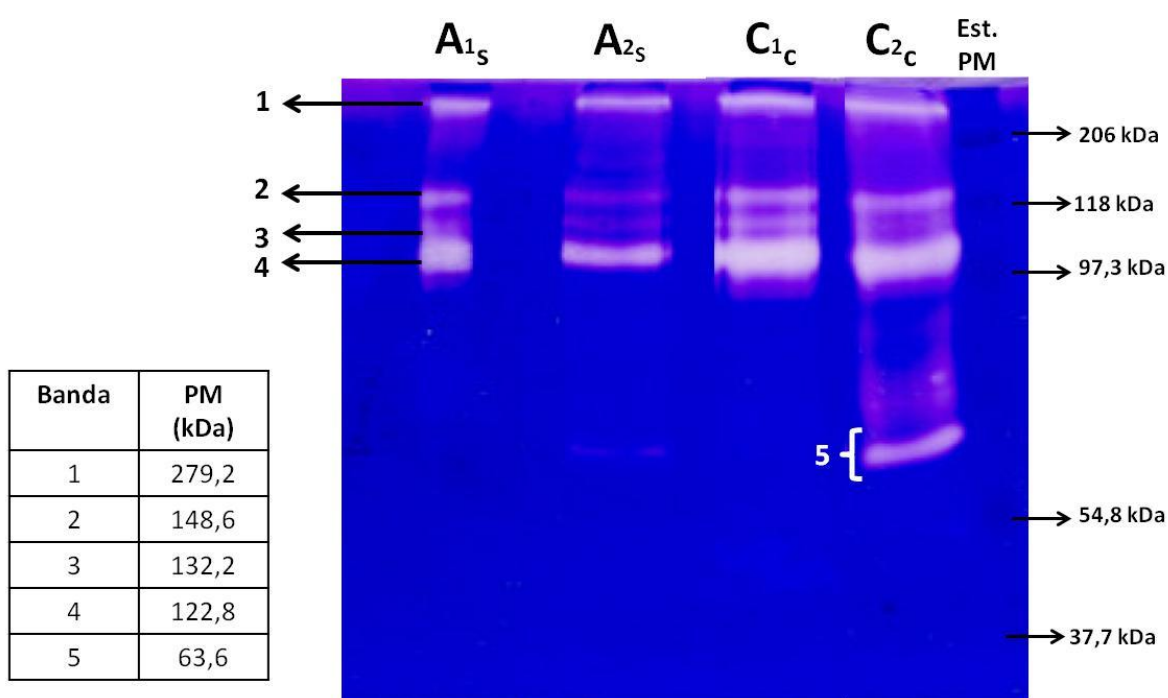


Figura 11. – Gel 1: Zimografía en gel de poliacrilamida al 12% copolimerizado con gelatina al 1% con tinción de azul de Coomassie mostrando los patrones proteolíticos de muestras de saliva total de dos pacientes con autismo sin caries (A1s y A2s) y dos pacientes controles con caries (C1c y C2c). Se enumeraron del 1 al 5 las bandas sobresalientes en la corrida. A la izquierda del gel se muestran en una tabla las masas moleculares de las bandas observadas.

En la figura 12 se muestra el gel 2, una segunda zimografía donde se evaluaron cuatro pacientes diferentes al gel 1. Se observa que ambas muestras de pacientes con autismo sin caries (A1s y A2s) tienen un comportamiento muy similar entre ellas a lo largo del perfil electroforético, donde igualmente se evidencian las cuatro primeras bandas bien definidas que observamos en el gel anterior. En este caso, para los pacientes control no

ocurrió igual, el paciente control sin caries (C1s) presenta un patrón diferente al otro paciente control con caries (C2c) en cuanto a la actividad de proteólisis, pues vemos las bandas en el primero más acentuadas y con una mayor digestión de la zona por la proteína en cuestión, puesto que la banda se ve extendida en los laterales de la misma indicando mayor proteólisis de la gelatina. Entre ambas poblaciones, podemos ver que el patrón es diferente, ya que la saliva de los pacientes autistas solo tienen el primer intervalo de cuatro bandas (1, 2, 3 y 4) y la de los controles presentan cuatro bandas más (5, 6, 7 y 8) con un patrón más largo de corrida y en definitiva, las bandas 2 y 3, con mayor actividad proteolítica.

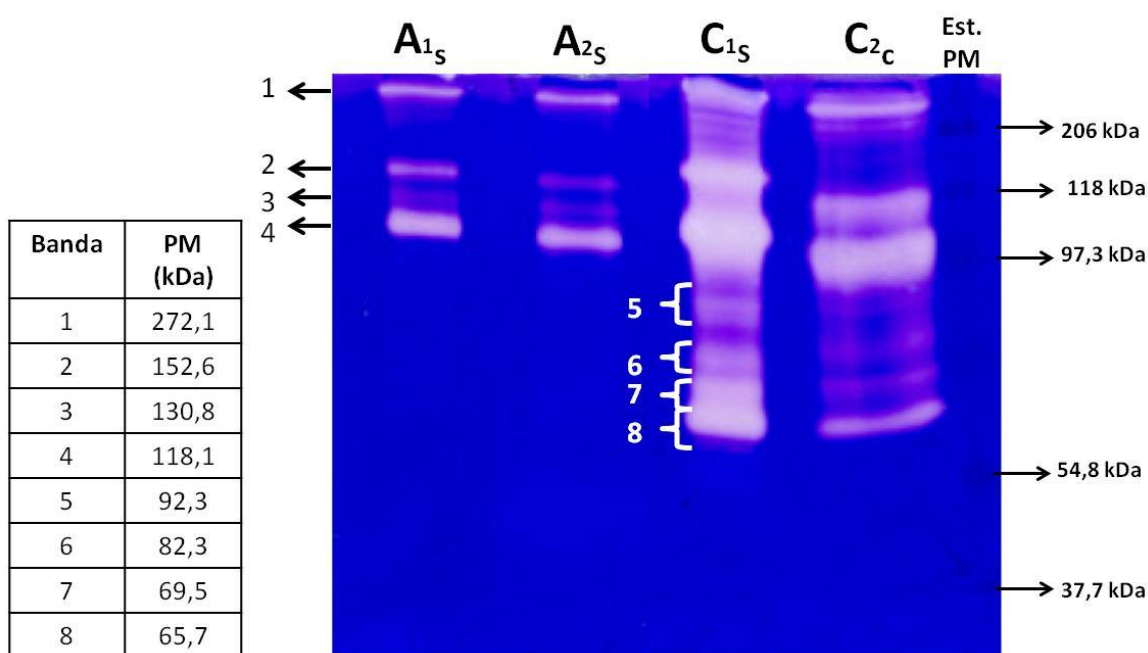


Figura 12. – Gel 2: Zimografía en gel de poliacrilamida al 12% copolimerizado con gelatina al 1% con tinción de azul de Coomassie mostrando los patrones proteolíticos de muestras de saliva total de dos pacientes con autismo sin caries (A1s y A2s) y dos pacientes controles, uno sin caries (C1s) y otro con caries (C2c). Se enumeraron del 1 al 8 las bandas sobresalientes en la corrida. A la izquierda del gel se muestran en una tabla las masas moleculares de las bandas observadas.

A continuación se muestra una tabla (tabla 8) con una compilación de datos teóricos que relacionan una metaloproteasa o un complejo proteico asociado con su respectiva masa molecular calculada en un zimograma de gelatina, ya que lo utilizamos como base para la discusión de nuestros resultados, partiendo del principio de que la mayoría de las proteínas participantes en la proteólisis de la gelatina en nuestro ensayo son de este tipo.

Tabla 8.- Metaloproteasas 2 y 9 y compuestos asociados con masa molecular conocida en zimografías de gelatina extraído de la bibliografía. (<http://protocol-place.com/assays/gelatin-zymography/gelatin-zymography-protocol/.com>) [consulta: 06 de Marzo de 2016]. (Farhat, 2013).

Proteína posible	Masa molecular (kDa).
Multímero MMP	240
Dímero MMP-9 asociado con microglobulina 25 kDa.	215
Dímero MMP-9	200 y 180
Dímero MMP-2	144 y 140
MMP-9 asociado con microglobulina 25 kDa.	125
Pro MMP-9	92
MMP-9 parcialmente glucosilada (precursor intracelular).	85 y 83
MMP-9 activada	82
Pro MMP-2	72
MMP-9 activada	68 y 67
MMP-2 activada	62 y 58

9.- Resultados de los índices caries e IHO-S:

Estos resultados fueron determinados y suministrados por la odontóloga Morales para compararlos con los resultados biológicos en este estudio.

A.- Índice de Caries COP-D y ceo-d:

En la figura 13 observamos una notable diferencia entre los índices de caries de los pacientes con autismo con respecto a los controles, donde los autistas tienen un índice mucho menor (1 = muy bajo) de aparición de dicha enfermedad bucal que los controles (3 = bajo). Con una desviación estándar más amplia para los controles que para los autistas, donde los datos de los segundos son más homogéneos que los primeros.

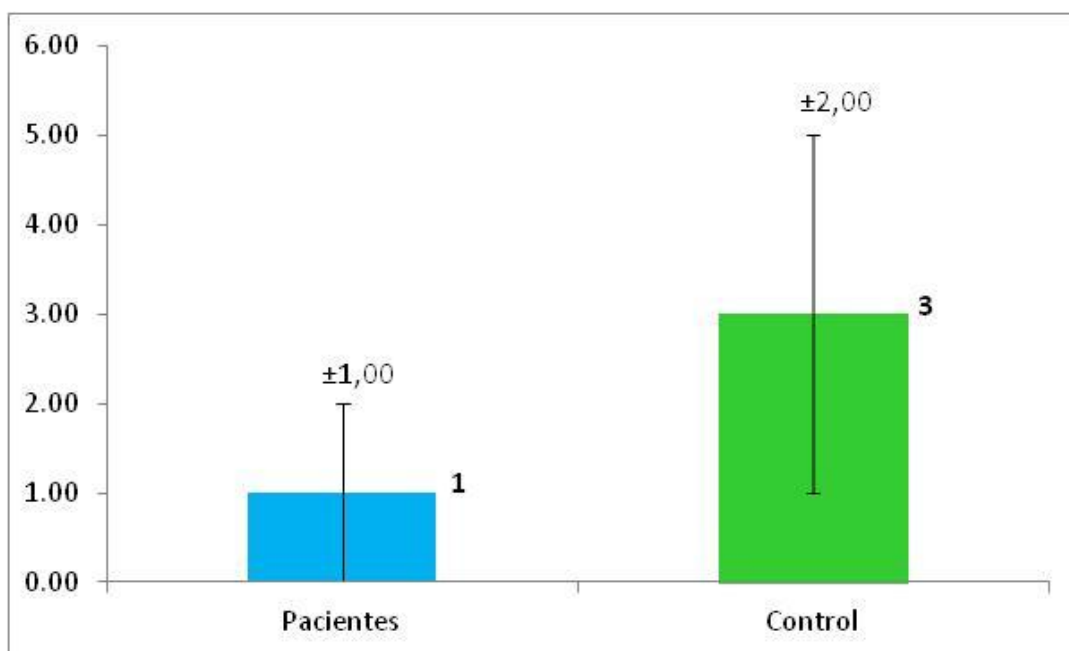


Figura 13.- Gráfica de barras para valores de índice de caries COP-D y ceo-d en promedio con su desviación estándar para pacientes con autismo (n= 34) y pacientes control (n= 34). (Dato suministrado por la odontóloga Mariana Morales).

B.- Presencia de caries:

Se hizo una apreciación simple y directa de presencia o ausencia de caries de cada paciente evaluado y se reportó en porcentaje (figura 14) para observar el patrón de aparición de la enfermedad en cada población.

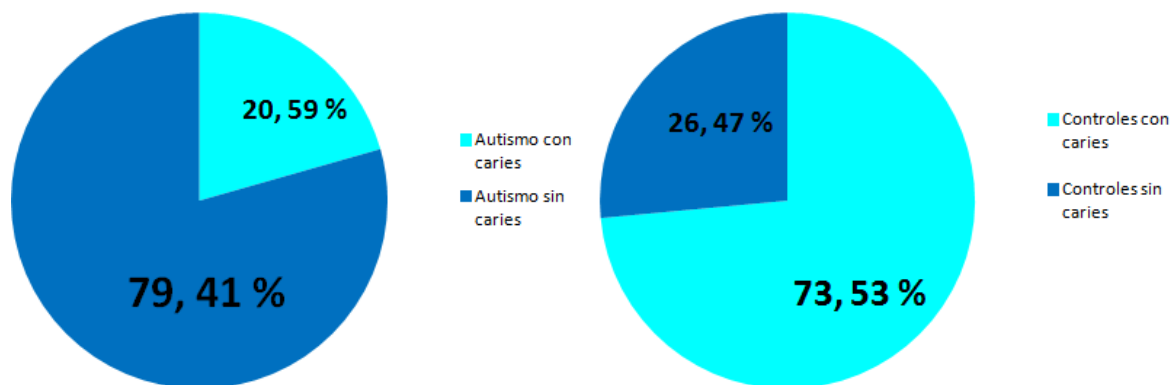


Figura 14.- Representación del porcentaje de presencia de caries para pacientes con autismo (n= 34) y pacientes control (n= 34). (Dato suministrado por la odontóloga Mariana Morales).

En la figura 14 notamos una gran diferencia entre las poblaciones, donde los pacientes control en su mayoría presentan caries, mientras que los pacientes con autismo, todo lo contrario, en su minoría tienen caries.

C.- Índice de higiene oral simplificado (IHO-S):

. El promedio del índice de higiene oral simplificado que observamos en la figura 15 para pacientes con autismo (2,3 = malo) es superior al que presentan los control (1,79 = regular). Ambas poblaciones con una desviación estándar similar, autismo $\pm 0,8$ y control $\pm 0,6$, indicando la homogeneidad intrínseca de cada una.

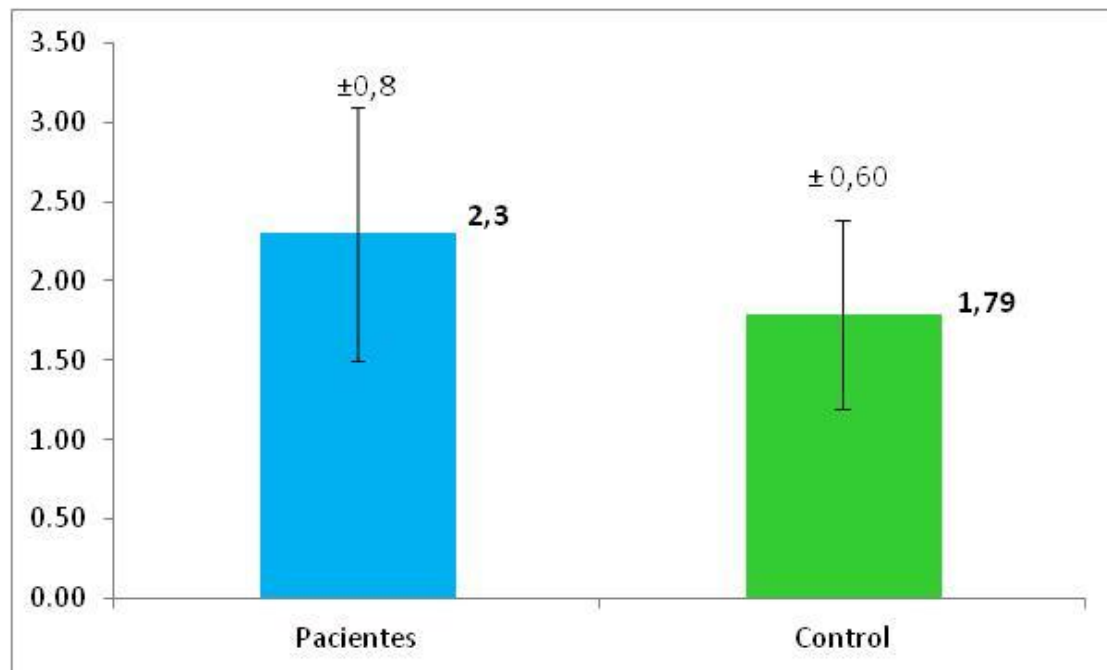


Figura 15.- Gráfica de barras para valores de índice de higiene oral simplificado en promedio con su desviación estándar para pacientes con autismo (n= 34) y control (n= 34). (Dato suministrado por la odontóloga Mariana Morales).

10.- Comparaciones dentro de la población con autismo:

A.- Concentración de iones fosfato:

En la figura 16 observamos una comparación de la concentración de iones fosfato en saliva de pacientes con autismo separados entre los que cumplen dieta estricta y los que no. Se hace evidente la diferencia de esta concentración: con dieta se obtuvo en promedio $2,65 \pm 0,18$ mmol/L y sin dieta en promedio $4,71 \pm 1,97$ mmol/L. Sin embargo, la población comparada es pequeña y no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 1,75$; $p = 0,12$; $n = 9$) ni presentan valores extremos o atípicos.

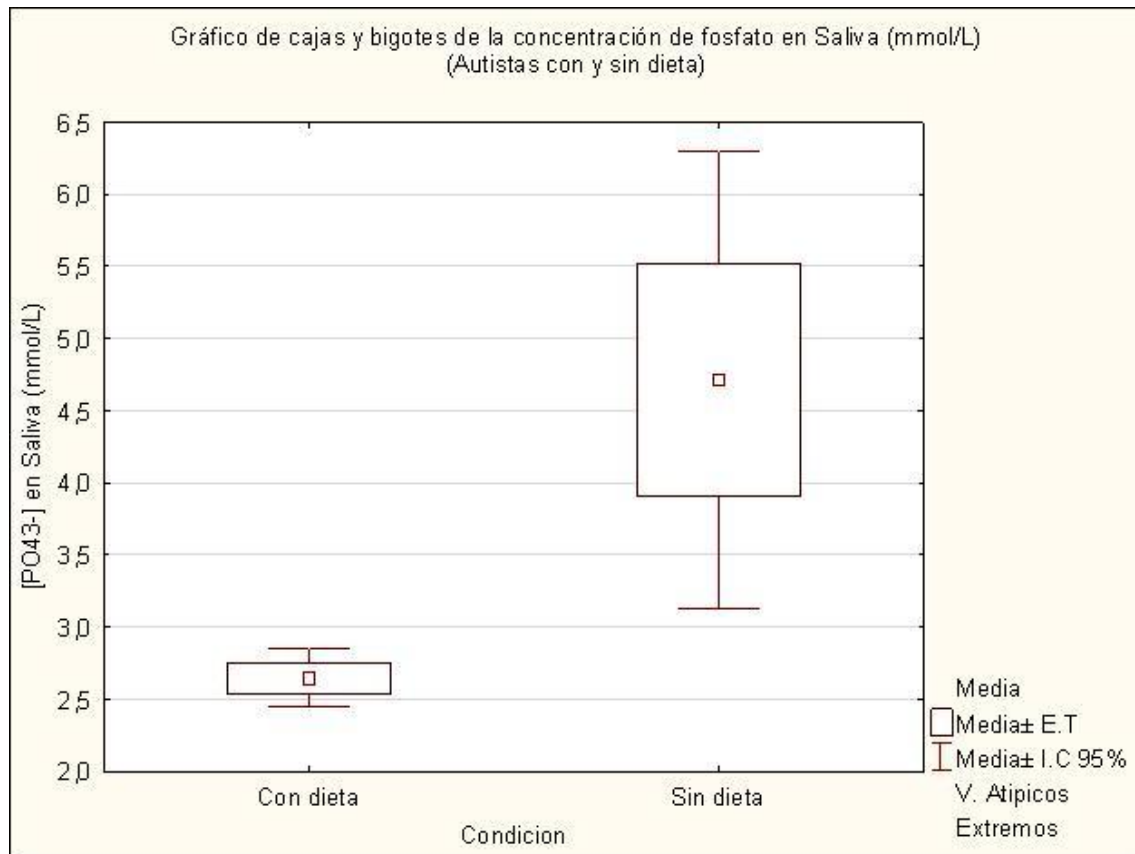


Figura 16.- Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de iones fosfato (mmol/L) promedio en saliva de pacientes con autismo con dieta (n=3) y sin dieta (n=6) cuantificado mediante método de Fiske y Subbarow (1925).

B.- Concentración de iones calcio:

La concentración de iones calcio en saliva de los pacientes con autismo dependiendo de si seguían dieta o no tuvo un valor promedio diferente para cada condición, como podemos ver en la figura 17. Si no seguían dieta fue de $0,67 \pm 0,25$ mmol/L, mientras que el valor disminuyó cuando seguían dieta a $0,47 \pm 0,27$ mmol/L. Al realizar el análisis estadístico se obtuvo significancia ($t_s = 2,28$; $p = 0,03$; $n = 17$). Se observan valores atípicos y extremos para ambos, desde 0,1 hasta 1,4 mmol/L.

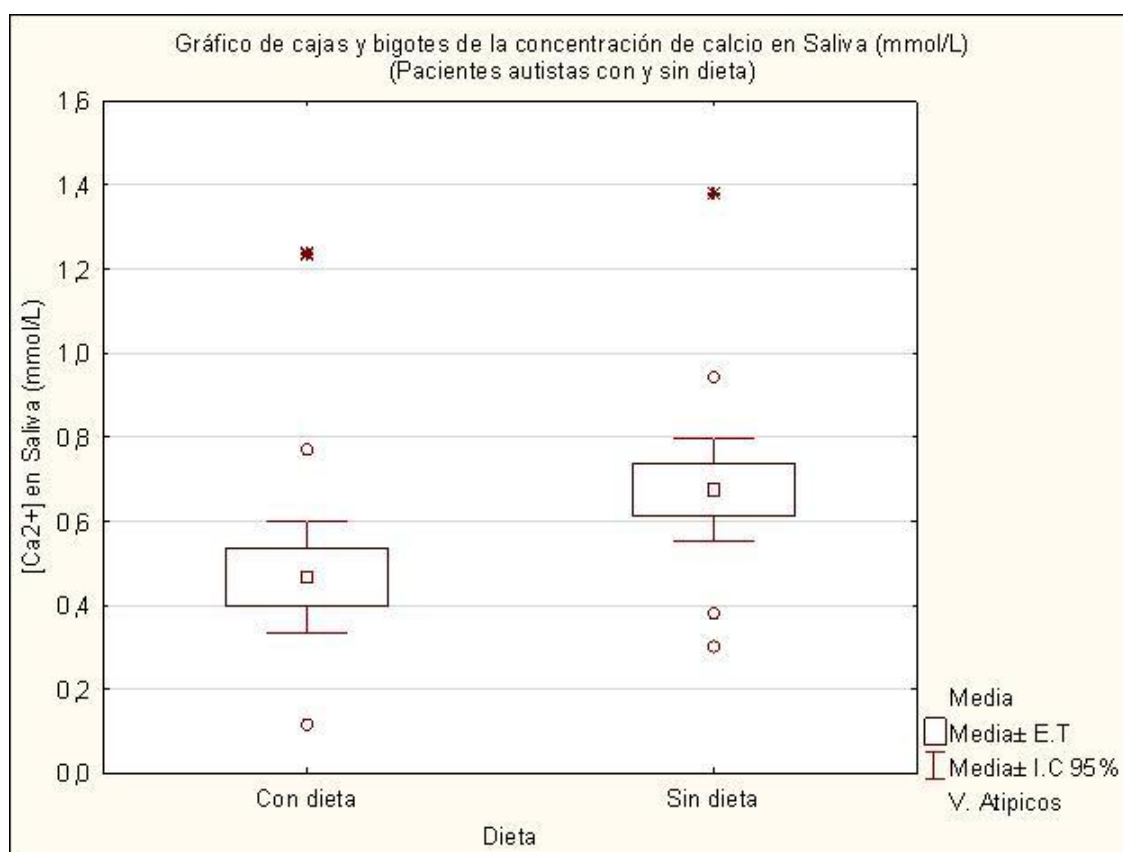


Figura 17. – Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de iones calcio (mmol/L) promedio en saliva de pacientes con autismo con dieta (n=16) y sin dieta (n=17) cuantificado mediante método de Connerty y Briggs (1966) adaptado a saliva por Cortés (2008).

También se midió esta misma variable, pero separando la población con autismo en pacientes con caries y sin caries y se obtuvo valores en promedio muy parecidos, con caries $0,63 \pm 0,28$ mmol/L y sin caries $0,56 \pm 0,28$ mmol/L (figura 18), como demuestra la ausencia de diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 0,61$; $p = 0,55$; $n = 26$).

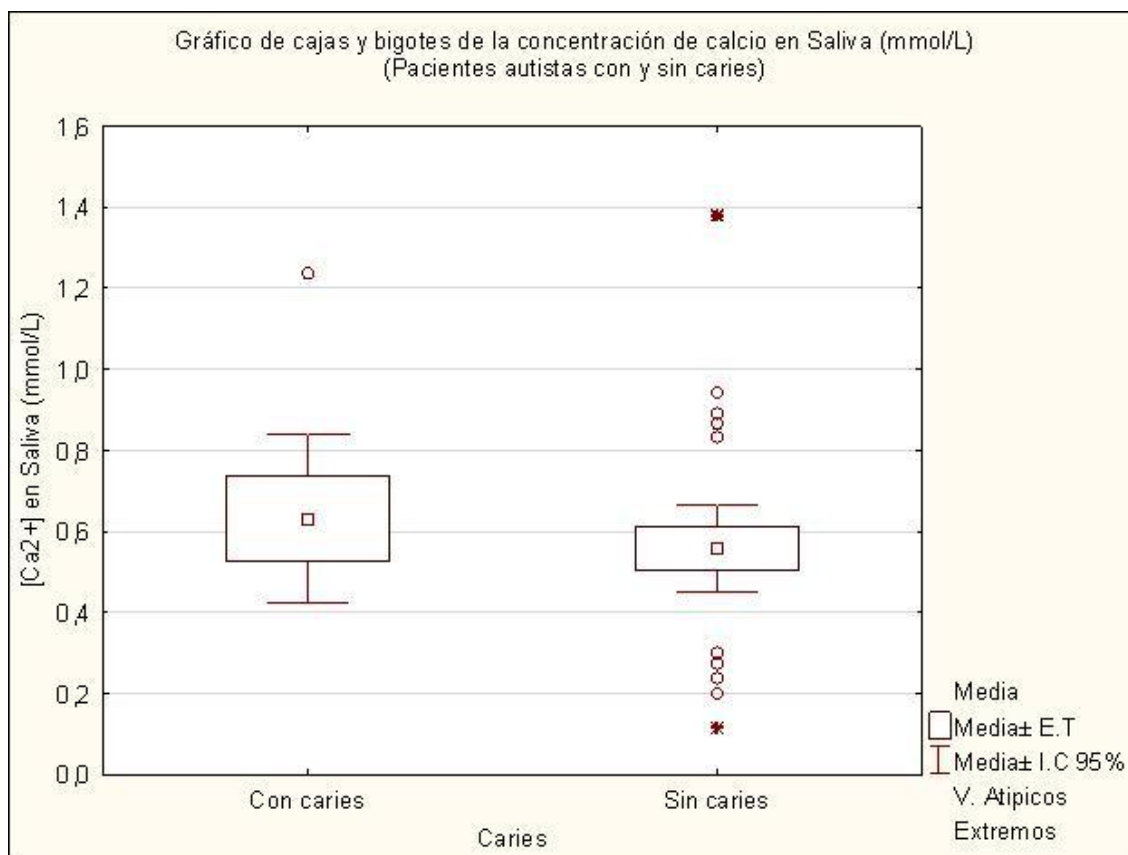


Figura 18. – Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de iones calcio (mmol/L) promedio en saliva de pacientes con autismo con caries (n=7) y sin caries (n=26) cuantificado mediante método de Connerty y Briggs (1966) adaptado a saliva por Cortés (2008).

C.- Resultados odontológicos:

1.- índice de caries COP-D y ceo-d:

Para evaluar el comportamiento de la caries asociado al tipo de nutrición de nuestros pacientes con autismo, se comparó el índice de la misma separando la población en sin dieta y con dieta y el resultado lo podemos observar en la figura 19, a continuación:

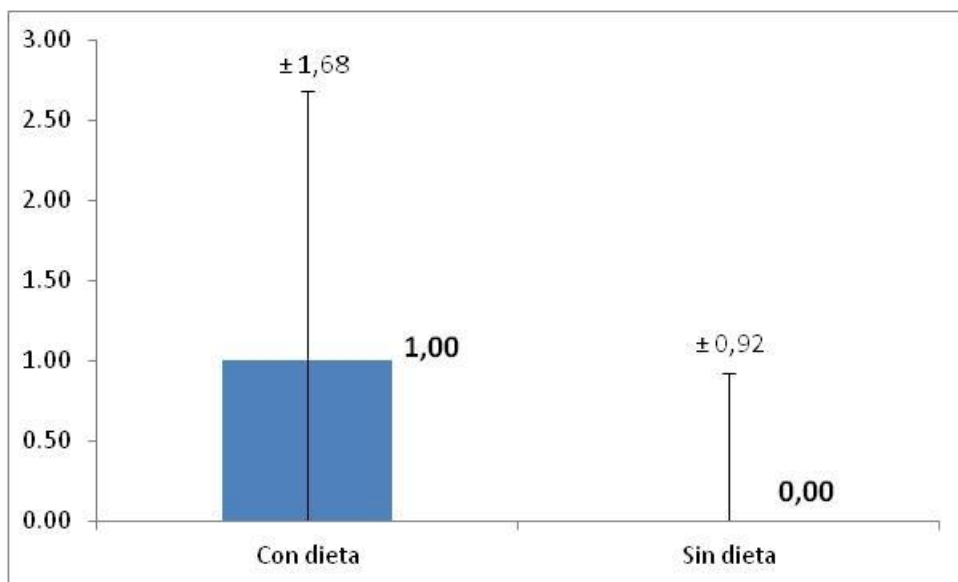


Figura 19.- Gráfica de barras para valores de índice de caries COP-D y ceo-d en promedio con su desviación estándar para pacientes con autismo con dieta (n= 16) y sin dieta (n= 18). (Dato suministrado por la odontóloga Mariana Morales).

Para los pacientes con dieta se obtuvo un valor de 1 y sin dieta un valor de 0, ambos datos pertenecientes a la clasificación “muy bajo”. Es decir, ambas poblaciones presentan el mismo índice de caries.

2.- Presencia de caries:

Al comparar estas poblaciones en cuanto al porcentaje de aparición de caries, encontramos un resultado que va de la mano del anterior, pues en efecto, si los pacientes con o sin dieta presentan un índice de caries igual, el porcentaje de aparición de la misma será muy similar también entre ellos. Para los pacientes que cumplían dieta tuvieron un 25% de presencia de caries y los que no la cumplían, un 16,67% (Figura 20).

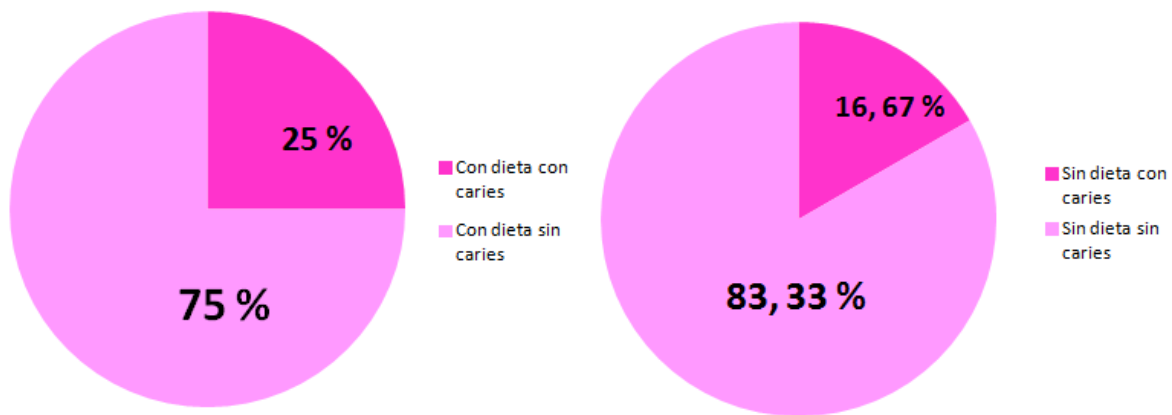


Figura 20.- Representación del porcentaje de presencia de caries para pacientes con autismo con dieta (n= 16) y pacientes sin dieta (n= 18). (Dato suministrado por la odontóloga Mariana Morales).

3.- índice de higiene oral simplificado (IHO-S):

Al evaluar si el índice de higiene oral dependía de los hábitos alimenticios de la población con autismo se encontró que el valor promedio para ambos casos fue muy similar. Como podemos ver en la figura 21, para la población con dieta se alcanzó un IHO-S de 2,34 (malo) y para la población sin dieta de 2,28 (malo), exactamente el mismo rango de clasificación.

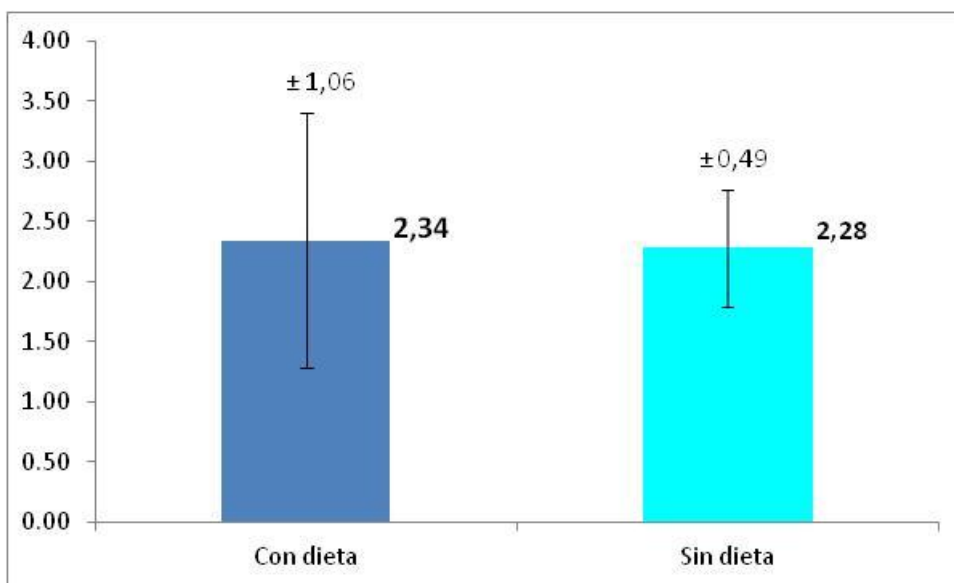


Figura 21.- índice de higiene oral simplificado en promedio con su desviación estándar para pacientes con autismo con dieta (n= 16) y sin dieta (n= 18). (Dato suministrado por la odontóloga Mariana Morales).

11.- Comparaciones dentro de la población control:

La población control se subdividió en pacientes controles con caries y sin caries y se compararon algunos factores que se midieron entre ellos.

A.- Concentración de iones fosfato:

En la figura 22 vemos una clara diferencia entre la población control con y sin caries respecto a la concentración promedio de iones fosfato que presentan en su saliva. Para los pacientes controles con caries se obtuvo un valor de $1,47 \pm 1,66$ mmol/L y para los sin caries de $4,45 \pm 1,50$ mmol/L, con diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 2,62$; $p = 0,04$; $n = 5$).

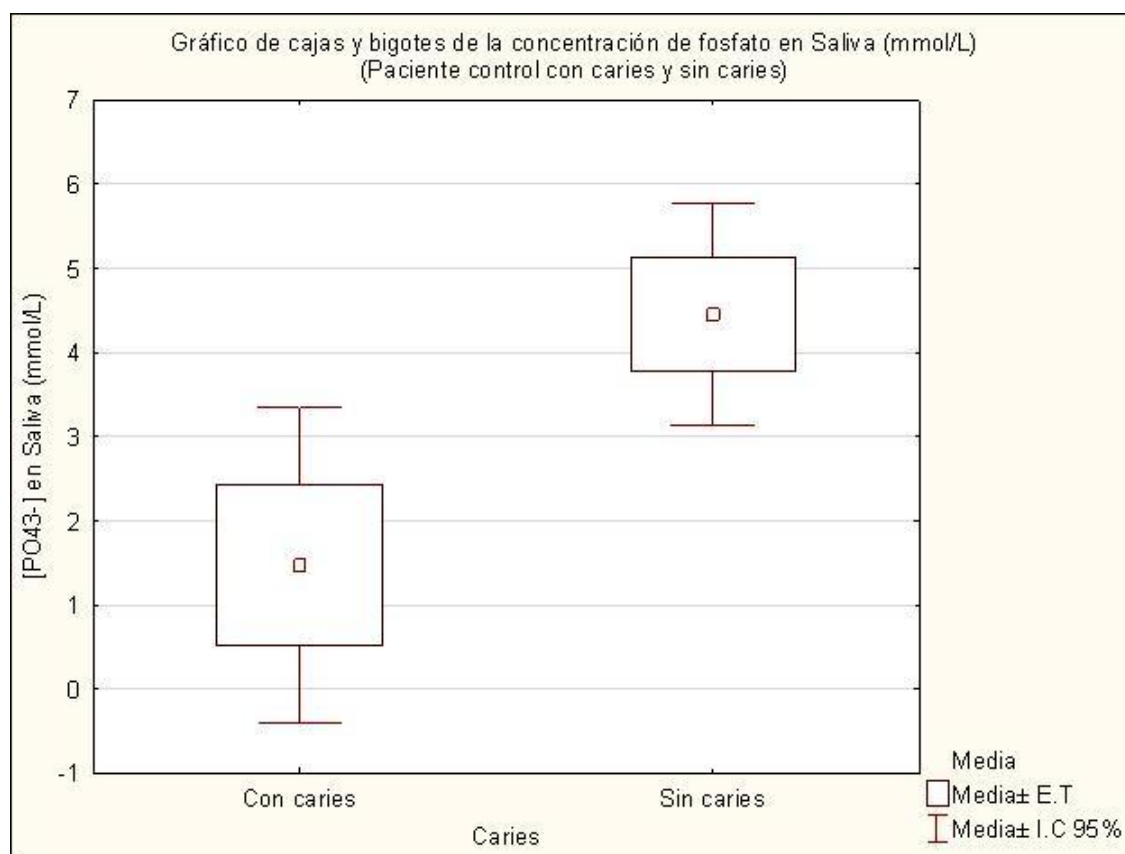


Figura 22.- Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de iones fosfato (mmol/L) promedio en saliva de pacientes control con caries (n= 3) y sin caries (n= 5) cuantificado mediante método de Fiske y Subbarow (1925).

B.- Concentración de iones calcio:

Al cuantificar los iones calcio en saliva para la misma subclasificación de población control, se encontró que para los pacientes con caries era de $0,83 \pm 0,35$ mmol/L y para los sin caries de $0,64 \pm 0,36$ mmol/L. A pesar de que en la figura 23 podemos observar una clara diferencia entre ambos resultados, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($t_s = 1,37$; $p = 0,18$; $n = 21$).

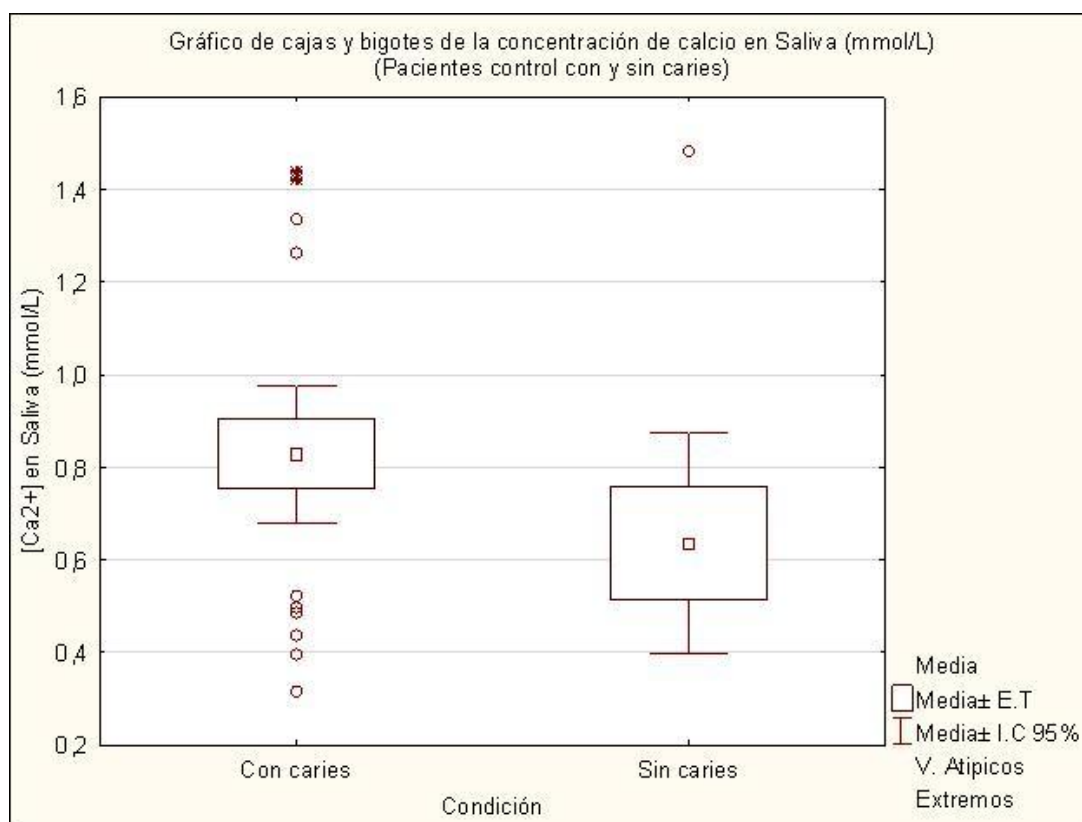


Figura 23. – Gráfica “cajas y bigotes” para valores de concentración de iones calcio (mmol/L) promedio en saliva de pacientes control con caries ($n = 21$) y sin caries ($n = 9$) cuantificado mediante método de Connerty y Briggs (1966) adaptado a saliva por Cortés (2008).

12.- Medición de factores bioquímicos en muestras de saliva del mismo paciente en fechas diferentes

En la siguiente tabla (Tabla 9) se recopilieron varios datos de mediciones de factores bioquímicos que se tuvo la oportunidad de evaluar en diferentes muestras de saliva del mismo paciente, tomadas en diferentes fechas. Se compararon entre sí para determinar si

había diferencias entre ellas y como vemos en la tabla 9, en efecto, siempre hubo diferencias en el dato.

Tabla 9. – Comparación de factores bioquímicos medidos en saliva en diferentes fechas a los mismos pacientes con autismo (A) y controles (C).

Factor bioquímico	Paciente	Fecha anterior	Fecha posterior	Diferencia
pH	006A	7,01 (3/10/14)	7,69 (9/12/15)	0,68
	032A	6,89 (22/2/15)	7,58 (3/12/15)	0,69
	007C	6,81 (3/10/14)	7,43 (10/12/15)	0,62
	018C	7,41 (31/10/14)	8,16 (10/12/15)	0,75
	019C	7,14 (31/10/14)	7,01 (10/12/15)	- 0,13
	031C	7,6 (2/2/15)	7,31 (9/12/15)	- 0,29
[Proteínas]	006A	2,18 mg/mL (3/10/14)	2,66 mg/mL (9/12/15)	0,48
	032A	2,91 mg/mL (22/2/15)	1,85 mg/mL (3/12/15)	- 1,06
	031C	5,54 mg/ml (2/2/15)	2,93 mg/mL (9/12/15)	- 2,61
[Fosfato]	006A	5 mmol/L (3/10/14)	4 mmol/L (9/12/15)	- 1
	007C	4,56 mmol/L (3/10/14)	3 mmol/L (10/12/15)	- 1,56

V. Discusión.

En general, los resultados obtenidos al comparar diferentes factores bioquímicos en la saliva de pacientes con autismo respecto a una población control (sin autismo), fueron muy similares. De acuerdo a la hipótesis que nos planteamos para este estudio, se esperaban diferencias más notables. Sin embargo, esta similitud también resulta interesante, puesto que partiendo de los datos odontológicos suministrados por la odontóloga Morales, donde se demuestra un índice de higiene oral (IHO-S) para autistas de $2,3 \pm 0,80$ (malo) y para los controles de 1,79 (regular) sumado a los diferentes hábitos alimenticios conocidos para cada población, vemos un conjunto de factores promotores de caries apuntando a los autistas y no sólo se obtuvo un índice de caries menor en ellos, sino que a pesar del déficit en su higiene bucal, están logrando un patrón óptimo en su equilibrio fisiológico en boca tan, o quizás hasta más, eficiente que el de los pacientes que no tienen ni autismo ni estos factores cariogénicos.

Comenzando por el pH, para ambos grupos, se mantienen valores muy similares en el intervalo comprendido entre pH 6,2 y 8,3. Para pacientes autista un promedio de 7,2 y para controles de 7,27. Este valor es el esperado y considerado normal, pues dependiendo del pH de la saliva, el fosfato se presentará en varias formas iónicas de acuerdo al pKa. Sabiendo que el sistema amortiguador fosfato tiene un pKa de 6,8 a 7,0, es decir, que éste será el pH al cual el sistema ejerce su máximo poder amortiguador entonces, este valor de pH es el esperado en una saliva fisiológicamente normal. Este sistema amortiguador es una de las principales características de la saliva, involucrada en la protección dental y la primera digestión de los alimentos (Piñero, 2005). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas donde ambas poblaciones tenían datos muy parecidos. Comparando estos resultados con estudios similares, encontramos que Piñero (2005) obtuvo un dato de pH para niños y adolescentes sanos de 10 y 11 años del estado Miranda entre 7,39 y 7,55; y Pulido (2008) publicó un intervalo de pH entre 6 y

7,5 para niños y adolescentes sanos de 9 a 16 años de la zona centro de la ciudad de Valencia (Venezuela).

La cantidad de proteínas que se miden en la saliva son el resultado del conjunto de compuestos que conforman este fluido más la interacción que tiene el mismo con la biopelícula dental. En 2008, Escárate y col., reportaron que el promedio de concentración de proteínas para niños sanos venezolanos fue de $2,06 \pm 0,94$ mg/ml (n=39), un valor dentro de nuestros resultados y observaron que a medida que aumentaba el índice de caries había un leve incremento en la concentración de proteínas de la población, por lo que lo relacionaron con la presencia de microorganismos causantes de esa enfermedad. En nuestro trabajo se esperaba un comportamiento similar, ya que se halló un índice cariogénico mayor para los controles que para los autistas, sin embargo, podemos observar que para los pacientes con autismo la concentración de proteínas totales en saliva fueron valores muy cercanos a los de los controles, ligeramente menores los primeros y no hubo diferencias estadísticamente significativas.

En las determinaciones de la concentración de calcio en saliva, el grupo con autismo mantuvo valores comprendidos entre 0,20 y 1,34 mmol/L y el grupo control entre 0,22 y 1,5 mmol/L y este último grupo con mayor varianza entre los valores. Tulunoglu y col. en 2006, reportaron que la concentración de calcio en saliva era mayor en niños libres de caries. Para que este ión pueda participar en el proceso de remineralización del esmalte, debe estar en concentraciones de sobresaturación en este fluido, por lo que es lógico esperar mayores concentraciones del mismo en pacientes con menor índice de caries, pues no están perdiendo dichos iones en la recuperación del equilibrio del calcio-fosfato. Pero en nuestros resultados observamos que aunque los pacientes con autismo tienen un menor índice de caries, están presentando una menor concentración de calcio promedio respecto a los controles. Al aplicar el análisis estadístico encontramos diferencia significativa entre ambos grupos. Este resultado lo asociamos a que nuestra población

autista en un 47,06% consume una dieta libre de gluten y caseína, es decir, bajo consumo de lácteos y alimentos con trigo, por lo tanto, entre otras cosas, poco acceso a fuentes de calcio. Hicimos una evaluación dentro de esta población para demostrar cuantitativamente a qué condición de las estudiadas se podía deber la disminución de los iones calcio en la saliva de los autistas. Cuando comparamos dicha concentración en la saliva de los pacientes autistas con dieta y sin dieta, obtuvimos que para los que no seguían dieta era mucho mayor que para los que seguían dieta. Al realizar el análisis estadístico se obtuvo significancia, confirmando que una de las posibles razones de esta disminución del ión en saliva podría ser el tipo de dieta. Se realizó la misma comparación, pero separando a los pacientes autistas con caries y sin caries y el resultado fueron valores muy cercanos y que no arrojaron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, el hecho de que la concentración de calcio esté más baja en los pacientes con autismo que en los controles, pareciera estar asociado a que casi la mitad de esta población cumple una dieta libre de lácteos y aunque lo esperado era que esta concentración fuera definida por la presencia de caries, el factor de la dieta fue más importante. También evaluamos el comportamiento de este ión dentro de la población control separándolos con y sin caries. El resultado mostró que los controles con caries tenían mayor concentración de calcio y sin diferencia significativa entre ellos. Podemos inferir que, al aumentar el tamaño muestral, la tendencia cambie y se asemeje más a la bibliografía consultada.

El fosfato libre en saliva también participa en el proceso de remineralización del esmalte, pero su equilibrio iónico se ve afectado por la presencia de caries. Escárte y col. publicaron en 2008 que la concentración de fosfato en saliva de niños con caries era de $4,37 \pm 1,64$ mmol/L (promedio $\pm$ DE, $n = 62$). Y otros estudios en Chile hallaron en promedio en muestras salivales de niños sanos, 1,75 mmol/ L (Bustos y col., 1999). Nuestros resultados obtenidos en niños están acotados dentro de estos valores

reportados previamente, observando grandes variaciones dentro de una misma población. En el artículo publicado por Escárte y col. (2008), establecen que la concentración de PO_4^{-3} en saliva en las primeras etapas de la caries es menor y al incrementar la enfermedad observaron un aumento de la concentración, lo que podría indicar que al disminuir la concentración de PO_4^{-3} es cuando se desarrolla la caries, ya que el proceso de remineralización del esmalte no se estaría llevando a cabo totalmente y que luego cuando la enfermedad avanza, se produce una pérdida del material que compone al esmalte (hidroxiapatita), es así que, al progresar la enfermedad el proceso de desmineralización del diente es tan avanzado, que resultaría en el aumento de la concentración de PO_4^{-3} en la saliva. En nuestros resultados los valores son muy similares para ambas poblaciones y no hubo diferencia estadística, pero sí se observó una alta variación entre los datos. En este ensayo tuvimos obstáculos logísticos para evaluar una mayor cantidad de muestras y por esta razón, quizás, la variabilidad entre los datos es tan alta y el resultado es poco concluyente. Se evaluó si el fosfato variaba dentro de las poblaciones, dependiendo de si la condición era la dieta o la caries y encontramos que en los autistas que seguían dieta era mucho menor la concentración que en los que no y que la población que seguía dieta era mucho más homogénea que la otra, aunque no se reporta diferencia estadística. Que los autistas con caries tienen mucho menos fosfato en la saliva que los sin caries (pero es un dato de referencia porque en la población autista con caries sólo se obtuvo una muestra). En los pacientes controles con caries dio un valor casi cuatro veces mayor que en los controles sin caries, indicando diferencia estadísticamente significativa. Podemos sugerir que la dieta pareciera normalizar la concentración de fosfato circulante en saliva en los pacientes con autismo, es la tendencia que se observa, aunque la muestra es pequeña, en la población con dieta presenta valores menores y más homogéneos que los sin dieta. La caries sí resultó una condición determinante en los pacientes control, lo que se demostró al hacer el análisis estadístico,

donde en ausencia de caries, la concentración de fosfato en saliva era mucho mayor que en los con caries. Respecto a la bibliografía consultada (Escárte y col., 2008), encontramos que la población afectada por la caries se encontraba en las primeras etapas de la infección (el índice de caries promedio para la población control fue de 3= bajo) y definitivamente la tendencia es que la concentración de fosfato en saliva es determinante en el avance de la caries. Que en condiciones de sobresaturación, los dientes estarán protegidos, pero que una alteración de su concentración, ya sea por encima o por debajo del valor regular, estarán indicando un rompimiento del equilibrio de remineralización del esmalte.

En una observación directa podríamos decir que los pacientes con autismo tienden a tener más alta la concentración de este ión y que cuando siguen una dieta específica se regula, pero que podría ser una explicación simple por su bajo índice de caries, pues se podría decir que sus dientes están más protegidos por este aumento del fosfato en saliva. Pero más allá de la ausencia de caries en ellos, esta sería una consecuencia de algo a nivel fisiológico más interesante que pudiera estar pasando en estos individuos. Todo el proteoma es susceptible de variar su actividad por acción de las proteínas quinasas. El genoma humano contiene cerca de 500 genes que codifican proteínas quinasas, estamos hablando de que medir o analizar este factor libre (ión fosfato) en saliva, puede ser una “luz en el túnel” para llegar a una explicación de la causa de la condición autista, puesto que suena lógico decir, que una falla en la base fosforilativa traería como consecuencia un fenotipo como el autismo, ya que hemos observado que las fallas fisiológicas no son puntuales, sino vemos que son muchas las alteraciones que hay. Y esta hipótesis podría empezar con un factor libre en sistema como el fosfato, que es el protagonista de este proceso vital que es la fosforilación. Decir que la fosforilación no está ocurriendo correctamente, es decir, que los procesos de señalización celular están sucediendo incompletos, regulaciones que no se están dando, proteínas que no se están activando,

procedimientos fisiológicos que no están ocurriendo regularmente y se podrían justificar características evidentes en el autismo como son la formación incorrecta del sistema nervioso o irregularidades en el sistema inmune como la intolerancia al gluten, etc, (Castagnola, 2008).

Era necesario en nuestro estudio incluir un análisis del sistema inmune de estos pacientes. Por ello, se midió concentración de IgA secretora total en saliva. Para pacientes con autismo, se reportó un valor promedio menor que para los controles, pero sin diferencia significativa; sin embargo, se observaron muy variables los datos individuales de una población respecto a la otra, por lo que de aumentar el tamaño de la muestra, se observarían diferencias estadísticas con una tendencia marcada a una menor concentración en el autismo. Chacón y col. (2002) midieron IgA secretora total en saliva de niños sanos del estado Carabobo, utilizando el método nefelométrico y obtuvieron un promedio de 70 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que Conde y col. (2001), en Caracas reportaron un valor de 120 $\mu\text{g/mL}$ (ambos cercanos a nuestro estudio).

Hagel y col. (2000), hicieron un trabajo donde demostraban cómo el estado nutricional afectaba la respuesta inmune frente infecciones parasitarias y encontraron un valor de 374,16 $\mu\text{g/mL}$ de concentración de IgA secretora total en saliva de niños con infección helmíntica, pero con buena nutrición. En nuestro ensayo, hay valores dentro de la población control que superan este último valor citado, lo que nos hace dudar de si estos pacientes tenían algún tipo de infección parasitaria que nos aumentaron el promedio en este grupo, pues la IgA secretora que se midió fue la total. Es común que estas infecciones algunas veces pasen desapercibidas para los padres, pues muchas son asintomáticas. Otra explicación, es que como la caries es una infección causada por el *Streptococcus mutans* (Bustos, 1999) y como el índice COP/ceo es mayor en esta población control, puede estar involucrada una IgA secretora específica para esta bacteria. Sería interesante repetir este ensayo, pero con un antígeno para esta IgA

secretora específica y eliminar factores externos (infecciones no relacionadas con el equilibrio bucal que aumenten su concentración en niños sanos).

Se esperaba discutir sobre las diferencias de este parámetro, pues al ser intolerantes a la caseína y gluten, los individuos con autismo, nos hace pensar que alteraciones en el sistema inmunitario pueden estar implicadas con esta condición, pero quizás no son variaciones de concentración sino variaciones morfológicas de los componentes inmunitarios, como reportan Ngounou y col. (2015). Otros estudios de IgA total (no secretora) medida en sangre en pacientes con autismo apuntan hacia una deficiencia de este anticuerpo para estos individuos. Gupta y col. (1996), establecen que el 20% de los niños con autismo tenían deficiencia de IgA y un 8% no tenían el anticuerpo. Warren y col. (1997), tuvieron un resultado muy similar, en el 20% de su población autista encontraron deficiencia en IgA en suero sanguíneo, mientras que todos los controles tenían el valor regular. El valor promedio de IgA en suero para los autistas (n= 40, 31 masculinos y 9 femeninos, de 5 a 31 años) fue de ≤ 6 mg/dL mientras que los controles (n= 25, 19 masculinos y 6 femeninos, de 5 a 26 años) estuvo en un intervalo de 33 a 235 mg/dL. Pero quizás no sea una deficiencia o ausencia del anticuerpo como tal, sino que sean cambios morfológicos del mismo y el antígeno utilizado para la prueba no lo esté reconociendo, según indican los estudios más recientes (Ngounou y col. 2015). Esto explicaría la irritabilidad intestinal de los pacientes autistas, pues quizás presentan una IgA ineficiente en su mucosa. En nuestro estudio, se obtuvo que la concentración de IgA secretora total para la población control con caries era mayor que la sin caries. Para la población con autismo con caries también fue mayor que la sin caries y con dieta, ligeramente menor a los sin dieta, pero sólo se reportan como datos referenciales, pues por lo pequeña de nuestra muestra, algunas de estas condiciones estaban representadas por un único individuo. Sin embargo, coinciden con la bibliografía y lo esperado, pues en presencia de caries la concentración de la IgA aumentó en ambos casos (autistas y

controles), por ser ésta una infección. Y en presencia de dieta la IgA disminuyó, pues se están evitando algunos alimentos que contienen antígenos que activan este anticuerpo.

Para evaluar el patrón electroforético de las proteínas presentes en las muestras de los pacientes y compararlo entre las poblaciones con autismo y control, se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones disociantes SDS-PAGE. De manera general, podemos decir, que no se observaron diferencias de los perfiles entre los distintos pacientes y que incluso no se observa ninguna banda particular para ningún caso. En la imagen podemos ver que las mismas siete bandas allí indicadas, se identificaron en los ocho pacientes analizados, con un ligero aumento de la banda 7 en los pacientes con autismo. Si comparamos entre sí a los pacientes controles, observamos que en el carril C2c (paciente control con caries), las bandas 1 y 2 no están nítidas, pero la banda 5 está en mayor concentración que incluso solapa las bandas subsiguientes, respecto a los otros controles. La banda 5 presenta una masa molecular que corresponde a la masa de la lactoferrina, reportada en la bibliografía en las tablas 6 y 7, la cual es una proteína que tiene actividad antimicrobiana secuestrando iones de hierro imprescindibles para el crecimiento microbiano. Según la historia clínica del paciente C2c, éste presenta un índice de caries de 4= moderado y los otros pacientes, C1s (control sin caries) es 0= muy bajo, C3c (control con caries) es 3= bajo y C4c (control con caries) es 3= bajo, por lo que al ser el C2c el paciente con más alto índice de caries entre los comparados, se justifica que esta banda sea posiblemente la lactoferrina sobreexpresada como parte del sistema inmune atacando una infección. Si nos vamos al grupo de los autistas, observamos que las cuatro corridas son muy similares, se observan las mismas siete bandas, pero la banda 7 está más concentrada que en los controles. Según lo reportado en teoría, la banda 7 tiene una masa molecular parecido al de la albúmina (tablas 6 y 7), la cual es una proteína de transporte con una alta concentración en saliva y otros fluidos corporales, pues su principal función es mantener la presión oncótica. Medir la concentración de albúmina en

sangre es utilizado por los nutricionistas para supervisar los niveles de proteínas que está consumiendo un paciente y lo que necesitaría para tener una salud óptima. Las cuatro muestras eran de pacientes con autismo que no seguían dieta libre de gluten y caseína, pero no tenemos la información de cuál era su dieta exacta, por lo que no podemos llegar a ninguna conclusión respecto a la causa de por qué esta banda, que probablemente sea albúmina, está aumentada sólo en los autistas y no en los controles. Vemos que esta metodología no es sensible para proteínas de masas moleculares menores a 55 kDa, pues no se observa ninguna banda proteica por debajo de este peso.

Para complementar nuestro trabajo, también realizamos zimografías a estas muestras de saliva. La zimografía es un ensayo que permite analizar la actividad proteolítica que tienen algunas proteínas en su mayoría metaloproteasas, pues este ensayo simula la actividad en la matriz extracelular que tienen *in vivo* estas proteínas durante los recambios de tejido en el organismo (Okada y col., 1992). Se realizaron dos geles. Tenemos el gel 1, en el cual se analizaron dos pacientes autistas sin caries (A1s y A2s) y dos pacientes controles con caries (C1c y C2c). En los cuatro perfiles proteolíticos se observan las primeras cuatro bandas, excepto en el carril C2c que muestra un patrón con más bandas activas que los otros pacientes y además de las primeras cuatro bandas, se logra identificar una quinta banda. En general, la proteólisis se ve muy similar entre ambas poblaciones, sólo se observa que la cuarta banda es más densa en los dos controles con respecto a los dos autistas. Esta banda se puede asociar por su masa molecular a la MMP-9 asociada a microglobulina de 25 kDa, según la tabla 8. La banda 5, que es una banda extra que observamos sólo en el carril C2c, del paciente control con caries, tiene una masa molecular que se asemeja a MMP-2 activada. El hecho de que posiblemente la proteína que se esté expresando más visible sea la MMP-9 en los dos pacientes controles puede estar relacionado a la presencia de caries que está asociada a inflamación de las encías (respuesta del sistema inmune a la infección) que a su vez

incluye procesos en los que está involucrada la matriz extracelular con esta proteína por alteración de dicho tejido. Y la posible MMP-2 que estamos viendo en el paciente C2c, probablemente es porque este sujeto presenta un índice de caries superior al otro control (3= bajo *versus* 2= muy bajo, respectivamente). El carril A1s se ve más angosto que los otros, pero se puede inferir que fue un error experimental, que se agregó menos muestra que en los demás.

Observamos un segundo gel de zimografía, donde se corrieron dos muestras de pacientes con autismo sin caries (A1s y A2s) y dos muestras de pacientes control, uno sin caries (C1s) y uno con caries (C2s). Los dos patrones proteolíticos para los pacientes autistas son idénticos. En cambio, entre los dos pacientes controles encontramos una notable variación. En el carril C2c, vemos un comportamiento muy similar a los controles del gel 1 y coincide en diferenciarse de los autistas por tener la banda 4 más densa y por ser más extenso el patrón, tres bandas más de menor masa molecular. En el carril C1s observamos un patrón muy particular, donde el aumento de la actividad proteasa es evidente. Comparándolas con los datos teóricos de las masas moleculares (tabla 8), se puede inferir que son la forma MMP-9 asociada a microglobulina 25 kDa (banda 4) más concentrada en controles que en autistas y las formas MMP-9 y MMP-2 activadas (bandas 7 y 8 respectivamente) presentes en los controles mas no en los autistas. Que posiblemente sean estas proteínas las que estén presentes o más concentradas significa que el recambio tisular en boca está ocurriendo en mayor proporción en los pacientes control que en los con autismo. En el caso del paciente C2c, lo podemos asociar a la presencia de caries, pero el paciente C1s no tenía caries. Al revisar el historial del paciente C1s, encontramos una alta concentración de proteínas en su muestra salival (5,54 mg/mL), fuera del promedio poblacional, considerado un dato atípico. No tenemos más información del individuo con la cual argumentar este patrón proteolítico tan particular, pero el hecho de presentar una concentración tan alta de proteínas totales

explica la elevada actividad de esta muestra en la zimografía. El alto contenido proteico en la saliva de este paciente puede ser por alguna condición diferente a caries desconocida para nosotros o simplemente el paciente no cumplió correctamente el protocolo para la toma de la muestra.

Torres Chomón (2005), evaluó muestras de saliva total de 17 pacientes femeninos y 17 pacientes masculinos de 4 a 14 años, realizando zimografías para comparar la presencia o ausencia de actividad de las metaloproteasas (MMP-9 y MMP-2) en pacientes con parotiditis crónica recurrente infantil respecto al grupo control y el resultado fue que la actividad se encontraba aumentada en los pacientes con la enfermedad respecto a los controles. Mejía y col. en 2014, presentaron resultados de zimografías de muestras salivales de adultos con periodontitis respecto a controles sanos y también concluyeron que la actividad proteasa estaba incrementada en presencia de la enfermedad, incluso comparó muestras del mismo paciente antes y después de tratamiento para la periodontitis y el individuo recuperaba el patrón proteolítico de un individuo sano. Entonces, podemos decir que, los niños con autismo, al no presentar caries, tienen un periodonto y tejido bucal, en general, más sano, representado con patrones proteolíticos de actividad proteasa muy baja y homogéneos.

Nuestra investigación partió de una observación odontológica que indicaba que los pacientes con autismo tenían menor presencia e índice de caries respecto a una población control. La diferencia es notable entre ambas poblaciones donde la tendencia es irrefutable de que en presencia de la condición autista es menor la probabilidad de padecer caries y que esto ocurre a pesar de que el índice de higiene oral (IHO-S) juega en contra de estos individuos, ya que cumplir los hábitos regulares de higiene oral es complicado, intrínseco en la condición que estamos analizando. Esto significa que, estos pacientes acumulan más biopelícula y cálculo dental, lo que traería como consecuencia infecciones en boca como lo es la caries. El factor etiológico principal de la caries es la

bacteria *Streptococcus mutans* (Bustos, 1999) en conjunto con el resto de la biopelícula dental y se conoce que su principal sustrato es la glucosa, por lo que el primer pensamiento que puede aparecer es que debido a la dieta libre de gluten y caseína, que cumplen la mayoría de los pacientes con autismo, podría ser la razón principal de que la caries no se esté desarrollando en ellos. Por esto, hicimos comparaciones de los datos entre los pacientes que cumplían dieta respecto a su índice de caries, para determinar si había o no dependencia entre ambos factores (tipo de dieta y presencia de caries). Mostramos el índice de caries para los pacientes autistas con y sin dieta y vemos que el índice es el mismo, 0 a 1= muy bajo, para ambos hábitos alimenticios. Al evaluar el porcentaje de presencia de caries, vemos de nuevo que son valores muy cercanos representativos de la tendencia del grupo completo con autismo. Y al medir el índice de higiene oral (IHO-S), observamos que el patrón de acumulación de biopelícula y cálculo en estos pacientes es igual, cumplan o no la dieta. Por lo que, a pesar de no haber encontrado resultados bioquímicos más explícitos que nos lleven a la razón por la que estos pacientes con autismo presentan menos caries, sabemos que la dieta no es el motivo, pues estos resultados en conjunto nos demuestran que no son dependientes, la caries de la dieta.

Tuvimos la oportunidad de tomarle muestras salivales a algunos pocos pacientes en dos tiempos distintos y realizarle algunos de los análisis bioquímicos. A pesar de ser el mismo paciente y seguir los mismos protocolos, solo variamos que tomamos dos muestras salivales en dos fechas distintas, sus análisis arrojaron datos diferentes en el mismo parámetro evaluado. Dichos resultados se mantienen dentro del promedio de la población a la que pertenecen. Lo que nos lleva a decir que, la saliva es un fluido producto de tantos factores en conjunto que posee una variabilidad bastante alta, no sólo dependiendo de una condición particular, sino de individuo a individuo y es sensible a la fecha y hora de la toma en el mismo individuo (ciclo circadiano). Por lo que, los estudios hechos en saliva

deberían ser reportados en intervalos que permitan definir una condición regular o no y con tamaños de muestras elevados, para obtener un dato representativo de una población específica, así serán tomadas en cuentas la mayoría de las variaciones posibles.

Por ser nuestro trabajo de investigación uno de los pioneros en el tema de la bioquímica de saliva de pacientes con autismo, se nos dificulta llegar a argumentos más exactos en los ensayos analizados. Sin embargo, hemos hecho un aporte más en esta línea de investigación que apunta a seguir creciendo hacia la dirección de la especificidad en los ensayos donde se desarrolle la proteómica de esta condición, como sugieren Ngounou y col. (2015) en su trabajo más reciente donde analizaron electroforesis de geles de poliacrilamida 2D y también Mejía y col. (2014), donde realizaron bloqueos químicos en sus zimografías que aumentaron la especificidad de su ensayo. Ambas técnicas nos aproximan a las identidades de los factores bioquímicos involucrados en la condición del autismo.

VI. Conclusiones

- En el pH promedio medido para ambas poblaciones, no se observan diferencias significativas entre ellos.
- La concentración de proteínas totales no presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados.
- La comparación de concentración de iones fosfato, aunque no presentó diferencia significativa, no se considera un resultado concluyente puesto que el tamaño de muestra fue limitado. Además la varianza entre los datos fue alta.
- En la concentración de IgA secretora total, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, pero al observar cada dato de cada población, sí se observan diferencias marcadas, por lo que inferimos que de aumentar la muestra sí se evidencien diferencias entre las poblaciones cuya tendencia sea menor concentración del anticuerpo en los autistas.
- Entre las concentraciones de iones calcio en saliva se observó diferencia estadísticamente significativa, donde el promedio para los pacientes con autismo fue mucho menor que para los controles. Este resultado muy probablemente se debe a la dieta que siguen la mayoría de la población con autismo libre de gluten y caseína (proteína presente en los lácteos).
- En el perfil electroforético no se observaron bandas de proteínas características para ningún grupo, ambas poblaciones presentaron patrones de corrida muy similares. Sólo la masa de la banda 7, que se podría asociar a la proteína albúmina basados en su masa molecular, se encontró ligeramente más concentrada en los autistas que en los controles.
- En los perfiles electroforéticos de la zimografía observamos que la actividad proteolítica en los pacientes con autismo era más baja y homogénea que en los pacientes

controles. Lo asociamos a la presencia de caries en los controles, donde el recambio tisular puede ser más continuo por la inflamación del tejido periodontal, dada la respuesta inmunitaria a la infección. Además de la posible presencia de proteólisis de origen bacteriano.

- Con las comparaciones entre las poblaciones principales demostramos que: en autistas, la presencia de caries no es dependiente de su dieta, pero que la disminución de la concentración calcio en su saliva sí lo era y confirmamos que en presencia de caries, en ambas poblaciones, la concentración del ión fosfato disminuye. Sin embargo, en la misma comparación pero del ión calcio, también importante en este equilibrio del esmalte del diente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la presencia o ausencia de caries.

- Se demostró una alta variabilidad de los factores bioquímicos, presentes en la saliva total, al realizar una pequeña prueba donde se analizó saliva del mismo paciente pero tomando la muestra en fechas diferentes y ninguno de los datos coincidió para el mismo análisis.

- La hipótesis principal planteada en este trabajo no se cumplió. Aunque los pacientes con autismo presentan índices de caries mucho menores que los pacientes control, no encontramos la explicación directa a este fenómeno entre los factores bioquímicos analizados. Aún así, podemos decir, que resulta interesante que aunque los pacientes con autismo tienen factores cariogénicos como bajo consumo de productos lácteos (poco acceso al calcio), una pobre higiene oral con IHO-S=malo y predilección por alimentos blandos, están teniendo una salud bucal tan buena o hasta mejor que la población control respecto a la incidencia de caries en sus dientes.

VII. Recomendaciones

Después de realizar este estudio y analizar el aporte logrado se hizo una recopilación de las recomendaciones y futuros pasos para continuar y extender esta línea de investigación para la condición de autismo en el área biológica y odontológica:

- 1) Aumentar la población en estudio. Pudimos observar a lo largo de este estudio que los factores estudiados en saliva eran ampliamente variables entre individuos de la misma población, hecho que es razonable ya que la saliva es producto de un conjunto de metabolismos que dependen de una cantidad considerable del engranaje genético muy particular de cada paciente. Sin embargo, si notamos una tendencia del resultado, por lo que al aumentar la población podremos observar una disminución de la variabilidad de dicho factor (desviación estándar) y un comportamiento más homogéneo de dicha población para cada caracterización aquí descrita.
- 2) Realizar análisis de laboratorio más específicos. Llevar el estudio a un nivel más especializado, pues por ser éste pionero en el tema se llevó acabo de una manera más general. Por ejemplo, en el caso de los ensayos con IgA secretora total, proponemos hacer más pruebas pero del tipo IgA secretora específica, que pueden ser con ELISA en el que se utilice anticuerpos específicos y además que puedan ser cotejados con IgA secretora específica en intestinos (pruebas con heces). De esta manera se podría hacer un rastreo más detallado del comportamiento del sistema inmune de los pacientes con autismo, ya que vemos que es uno de los sistemas afectados dada su condición (lo pudimos notar comparándolos entre ellos en subpoblaciones con y sin dieta); y así descartar otras afecciones, como presencia de parásitos, virus y/o enfermedades, que son

naturales en los seres humanos pero ajenos al autismo y aún así alteran la presencia de anticuerpos (inmunoglobulinas). En cuanto a los ensayos con proteínas, también proponemos ampliarlos desde el punto de vista más específico, con ensayos del tipo Western Blot por ejemplo o espectrometría de masas, ya que sería sumamente interesante y enriquecedor para esta investigación poder identificar proteínas presentes en estos procesos y clasificarlas de acuerdo a su función y aporte a la condición de autista, y descartar las que pertenezcan a procesos generales que aparezcan en común tanto para los autistas como para los controles. Explotar la proteómica de la condición.

- 3) Proponemos utilizar programas para computadoras avanzados para sacarle más provecho a los geles de zimografía, en los cuales se permite calcular por diferencia de densidad de las bandas, la actividad enzimática; que en conjunto con la identificación de la proteína en cuestión, sería un aporte y avance científico contundente.
- 4) Realizar ensayos microbiológicos. Otra sugerencia es incluir ensayos de este tipo en el estudio, ya que la cavidad oral es un nicho de microorganismos que conviven allí tanto en bocas sanas como con enfermedades y condiciones. Podríamos darle una explicación etiológica a algún fenómeno allí ocurriendo, como el bajo índice de caries en autistas, como también lo podríamos utilizar para aclarar el panorama de nuestras observaciones y datos obtenidos, descartando factores que pertenezcan al metabolismo bacteriano.
- 5) Realizar los ensayos de zimografía con inhibidores de proteasas para ir evaluando la identidad de estas enzimas.

Bibliografía

- Abrahamson M, Barrett AJ, Salvesen G, Grubb A (1986) Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem.* **261**:11282-11289.
- Adams, J., Rondalvik, J., Sadagopa, V., Legator, M. (2007). Mercury, Lead and Zinc in baby teeth of children with Autism versus Controls. *J of Toxicology and Environmental Health.* **70.** 1046-1051.
- Aguilar, L.F., Romero, M.C. (2003). La Saliva: Revisión sobre composición, función y usos diagnósticos. *Universitas Odontológicas.* **23.** 18-24.
- Alvarez Lopez, J., Basantes, C., Gonzalez Sanz, A., Suarez, S., Gonzalez Garcia, M., Fernandez Garcia, C., Perez Alvarez, A., Bilal Alvarez, U., Fernandez Ibañez, A. (2009). La cavidad oral como hábitat para los microorganismos. *Rev. Microbiología Oral.* <https://microral.wikispaces.com/La+cavidad+oral+como+habitat+para+los+microorganismos> [consulta el 26 de marzo de 2015].
- Azen, E.A., Hellekant, G., Sabatini, L.M., Warner, T.F. (1990). mRNA's for PRP's, statherin and histatins in Von Ebner's gland tissues. *J Dent Res.* **69.** 1724-1730.
- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M. (1995). Autism as strongly genetic disorder: evidence from a british twin study. *Psych Med.* **25.** 63-77.
- Benick, A., Chau, G., Goodlin, R., Abrams, S., Tustian, D., Madapallimatta, G. (1983). The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after absorption to the human enamel surface. *Arch Oral Biol.* **28.** 19-27.
- Bradstreet, J., Geier, D., Kartzinell, J., Adams, J., Geier, M. (2003). A case-control Study of mercury burden in children with autistic spectrum disorders. *J of Amer Physicians and Surgeons.* **8.** 76-79.
- Bustos I.P., Zillmann G., Yébenes I., Silva S. N., (1999). Factores de Riesgo Cariogénico: *Streptococcus mutans*, Caries por Superficie, Ca^{2+} y PO_4^{3-} Salival en Niños de 6 Años de Edad. *Revista Dental de Chile.* **90.** 9-12.
- Camacho, J. (2004). Bioquímica de la caries dental: Dinámica de la mineralización biológica aplicada a la caries dental. *Odonto Chile Rev: Cariología&Bioquímica.* 1-4.
- Carins, J., Booth, C. (2002). Salivary immunoglobulin-A as a marker of stress during strenuous physical training. *Aviat Space Environ Med.* **73.** 1203-1207.
- Castagnola, M., Messana, I., Inzitari, R., Fanali, C., Cabras, T., Vento, G., Capoluongo, E. Boccaci, S., Romagnoli, C., Giardina, B. (2007). Proteomic Analysis of Salivary Acidic Proline-Rich proteins in human preterm and at-term newborns. *J. Proteome Res.* **6.** 1371-1377.
- Castagnola, M., Messana, I., Inzitari, R., Fanali, C., Cabras, T., Morelli, A., Pecoraro, A. M., Neri, G., Torrioli, M.G., Gurrieri, F. (2008). Hypo-phosphorylation of salivary peptidome as a clue to the molecular pathogenesis of autism spectrum disorders. *J. Proteome Res.* **7.** 5327-5332.
- Chacón, M., Flores, M., Rodríguez, D., Valles, L., Petrola, C., Torres, A., Pacheco, M., Castro, L. (2002). Niveles de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en saliva en una población sana del Estado Carabobo (Venezuela). *Rev Salus online.* **8.** 8-16.
- Chakrabarti S., Fombonne E. (2001). Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA.* **285.** 3093-3099.
- Chiapin, S., Georgia, A., Gatti, R., De Pablo, E. (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chem Acta.* **383.** 30-40.
- Clavera, M. (2013). Epidemia creciente de autismo. <http://www.medicinadeldesarrollo.com/epidemia-creciente-de-autismo-2-2/> [consultado: 20 de marzo de 2015].
- Conde, M.E; Sileo, E; Aldrey, O. (2001). Estandarización de niveles de IgAs en saliva de 269 niños sanos del Hospital J.M de los Ríos de Caracas. *Alergia, Asma e Inmunología.* **3:** 119 – 28.

- Connerty H.V., Briggs A.R. (1966). Determination of Calcium by means of O-complexona. *Am J. Clin Pathol.* **45**. 290-296.
- Cortés, C., Mejía, J., Escárate, J., Guevara, L. y Salas, V. (2008). Adaptación del método colorimétrico basado en orto-cresolftaleína complexona para la determinación de la concentración de calcio en saliva total humana. *LVIII Convención Anual de ASOVAC, San Felipe, Edo. Yaracuy. Venezuela*.
- De Escriván, A. (2012). Control Nutricional logra mejores conductas en Niños autistas. *LUZ periódico: Universidad del Zulia*. Mes 11.
- De Estrada Riverón, J., Pérez J., Hidalgo-Gato, I. (2006). Caries Dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Rev Cubana Estomatol.* **46**. www.imbiomed.com [consultado: 20 de marzo de 2015].
- Du, R.Y., Yiu, C.K., King, N., Wong, v., McGrath, C. (2015). Oral health among preschool children with autism spectrum disorders: A case-control study. *J Sage Autism*. 1-6.
- Edgar, W.M. (1992). Saliva: It's secretion, composition and fuctions. *Br. Dent. J.* **172**. 305.
- Ericsson, Y. (1959). Clinical investigations of the salivary buffering action. *Acta Odontol Scand.* **17**. 131-165.
- Escárate, J., Gagliardi, J., Mejía, J., Cortés, C., More, J., Carmona, A., Pousa, S., Guevara, L., Salas, M.V. (2008). Determinación de la concentración de Fosfato, proteínas totales y estudio de los patrones electroforéticos de proteínas salivales en pacientes infantiles venezolanos con y sin caries. *Memorias del Instituto de Biología Experimental.* **5**. 17-20.
- Fagin, D. (2006). Controversias sobre o flúor. *J Scientific American Brasil*. http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/controversias_sobre_o_fluor.html.
- Farhat, Y. (2013). Gelatin zymography band interpretation. *Protocol place: Protocols and tutorials for the life science*. <http://protocol-place.com/assays/gelatin-zymography/gelatin-zymography-band-interpretation/>. [consultado: 17 de enero de 2016].
- Fawcett, D. (1999). Jensch, R. editor. Compendio de Histología. McGraw-Hill/ Interamericana. Madrid. Cap. **15**. 196-198.
- Fernandez, M., Barciela, M., Castro, C., Vallard, E., Lezama, G., Carrasco, R. Índices epidemiológicos para medir la caries dental. <http://estsocial.sld.cu/docs/Publicaciones> [consultado: 02 de Febrero de 2015].
- Fiske, C.H. & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem.* **66**. 375-400.
- Fombone E. (1999). The epidemiology of autism: a review. *Psychol Med.* **29**. 769-786.
- Francia, C., Lissera, R., Battellino, L. (2006). Película adquirida salival: revisión de la literatura. *Act odont venez.* **45**. 28.
- Gahnberg, L., Olson, J., Krasse, B., Carlén, A. (1982). Interference of salivary immunoglobulin A antibodies and others salivary fractions with adherence of *Streptococcus mutans* to hidroxiapatite. *Infection immunity.* **37**. 401-406.
- García Triana, B., Soto, O., Lavandero, A., Saldaña, A. (2012). Principales proteínas salivales: estructura, función y mecanismos de acción. *Rev Ciencias Básicas Biomédicas, La Habana.* **11**. 4-12.
- Gartner, L., Hiatt, J. (2002). Texto Atlas de Histología. McGraw-Hill/ Interamericana. 2da ed. México. Cap.**18**. 393-397.
- Grant, D. A., Stern, I.B., Everett, F.G. (1988). Saliva. *In: Periodontics*. Ed. **6th**. St. Louis: C.V. Mosby. 135-146.
- Greene, J C. and Vermillion, J.R. (1964). The Simplified Oral Hygiene Index. *Journal of American Dental Association* **68**: 7-13.
- Groenink, J., Ligtenberg, A. J.M., Veerman, E.C.I., Nieuw Amerongen, A.V. (1995). Interaction of the salivary low molecular weight mucin (MG2) with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **70**. 79-87.
- Gómez de Ferraris, M.E., Campos Muñoz, A. (2009). Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. *Editorial Médica Panamericana*. **3ra edición**. 197-198.
- Gupta S, Aggarwal S, Heads C. (1996). Dysregulated immune system in children with autism: beneficial effects of intravenous immune globulin on autistic characteristics. *Journal of Autism and Developmental Disorders.* **26**:439–452.

- Hagel, I., Ortiz D., Afonso C., Rodríguez O., Ortiz C., Palenque M. y Lynch N. (2000). Influencia de las infecciones helmínticas y el estado nutricional en la respuesta inmunitaria de niños venezolanos. *Pan Am J Public Health*. **8**. 156-163.
- Hakeem, V., Fifield, R., Al-Bayaty, H.F., Aldred, M.J., Walker, D.M., Williams, J. (1992). Salivary IgA and anti gliadin antibody as a marker for celiac disease. *Arch Dis Child*. **67**. 724-727.
- Hatton, M.N., Loomis, R.E., Levine, M.J., Tabak, L.A. (1985). Masticatory lubrication. The role of Carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex. *Biochem*. **230**. 817-820.
- Hay, D., Smith, D., Schluckebier, S., Moreno, E. (1984). Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *J Dent Res*. **63**. 857-863.
- Hay, D., Smith, D., Schluckebier, S., Moreno, E. (1986). Saturation of human salivary secretions with respect to calcite and inhibition of calcium carbonate precipitation by salivary constituents. *Calcif Tissue Int*. **39**. 151-160.
- Hiej H, Doyen C, Couprie C, Kaye K, Contejean Y. (2008). Substitutive and dietetic approaches in childhood autistic disorder: interests and limits. *Encephale*. **3**. 496-503
- Jaber, M.A. (2011). Dental Caries experience, oral health status and treatment needs of dental patients with autism. *J APPL Oral Sci*. **19**. 212-217.
- Jablonski, S. (1982). Illustrated dictionary of dentistry: definition of gingival crevicular fluid. *W.B. Saunders company*.
- Juul-Dam N, Townsend J, Courchesne E. (2001). Prenatal, perinatal and neonatal factors in autismo, pervasive developmental disorder not otherwise specified and the general population. *Pediatrics*. **63**. 107.
- Kanner L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *The nervous child*. **2**. 217-250.
- Klein, A., Carnoy, C., Wieruszeski, J., Strecker, G., Strang, A., Van Halbeek, H. (1992). The broad diversity of neutral and sialylated oligosaccharides derived from human salivary mucins. *Biochem*. **31**. 6152-6165.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**. 680-685.
- Lawrence, H. (2002). Salivary markers of systemic disease: Non-invasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc*. **68**. 170-174.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Randall, R.A. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. **193**. 265-275.
- Mejía, J. (2008). Estudio de parámetros Bioquímicos en saliva de Adultos Venezolanos. *Tesis de Licenciatura*, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Mejía, J. Méndez, M.A., Salas, M.V. (2014). Proteínas salivales en pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento periodontal. *Jornadas de Investigación y Extensión, Facultad de Ciencias, UCV. Caracas, Venezuela*.
- Miles J, McCathren R. (2005). Autism Overview. *Geneclinics*. <http://www.geneclinics.org/>. [consultado: 10 de enero de 2015].
- Montiel-Nava C., Peña J.A. (2008). Epidemiological findings of pervasive developmental disorders in a Venezuelan study. *Autism*. **12**. 191-202.
- Morón, A., Navas, R., Fox, M., Santana, Y., Quintero, L. (2008). Prevalencia de caries dental en las etnias venezolanas. *Cien odont Maracaibo, Venezuela*. **6**. 2-9.
- Nieuw Amerongen, A., Oderkerk, C., Driessen, A. (1987). Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res*. **21**. 297-309.
- Ngounou, W., Wormwood, K., Russell, S., Ryan, J., Darle, C., Woods, A. (2015). A pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Autism Res*. **10**. 1002- 1010.
- Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K., Hayakawa, T. (1992). Matrix Metalloproteinase 9 (92-kDa Gelatinase/Type IV Collagenase) from HT 1080 Human Fibrosarcoma Cells. *J Biol Chem*. **267**. 21712-21719.
- Peña, G. (2009). Estadística inferencial: una introducción para las ciencias del comportamiento. Editorial UCAB. **1ra edición**. 21-30.

- Pérez-Luyo, Ada. (2005). La biopelícula: una nueva visión de la placa dental. *Rev Estomatol Herediana Perú*. **15**. 82-85.
- Piñero, R. (2005). Efecto del bicarbonato de arginina en los índices de caries dental, pH y capacidad amortiguadora de la saliva. Trabajo especial de grado presentado en la Facultad de Odontología de la U.C.V. Postgrado Odontología Infantil.
- Pulido, C., (2008). El pH, Flujo Salival y Capacidad Buffer en Relación a la Formación de la Placa Dental. *Odous científica*. **9**. 25-32.
- Puy, C. (2006). La Saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnostico de algunas patologías. *Med Oral Cir Bucal*. **11**. E449- E450.
- Raj, P., Jonson, M., Levine, M., Nancollas, G. (1992). Salivary statherin. *J Biol Chem*. **267**. 5968-5976.
- Rangel, C. (2014). El autismo gana terreno. *Magazine El Estímulo*. Ciudad Guayana, Venezuela. **4**. 7-8.
- Rodríguez-Franco, D., Vázquez-Moreno, L., Ramos-Clamont Montfort, G. (2005). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev Latinoamericana de Microbiología*. **47**. 102-111.
- Ross, M., Gordon, K., Wojciech, P. (2004). 4ta. Edición, Histología: Texto y atlas a color con biología celular y molecular. Editorial Panamericana. Cap.15. 442-463..
- Schenkels, L., Veerman, E., Nieuw Amerongen, A. (1995). Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med*. **6**. 161-175.
- Solís-Añez E, Delgado W, Hernández ML. (2007). Autismo, cromosoma 15 y la hipótesis de disfunción GABAérgica. *Revisión Invest Clin*. **48**. 529-541.
- Soukup, M., Biesiada, I., Henderson, A., Idowu, B., Rodeback, D., Ridpath, L., Bridges, E., Nazar, A., Grove Bridges, K. (2012). Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. *J. Diabetology and Metabolic Syndrome*. **4**. 10-14.
- Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaun L, McLean JE. (1998). Genetics of autism: overview and new directions. *J Autism Dev Disord*. **28**. 351-368.
- Tenovuo, J. (1997). Salivary parameters of relevance for assesing caries. Activity in individuals and populations. *Community Dent. Oral Epidemiol*. **25**. 82-86.
- Torres Chomón, J. (2005). Alteraciones moleculares de la saliva de pacientes afectados por parotiditis crónica recurrente infantil y su correlación con el compromiso glandular. *Tesis de especialización*. Universidad de Chile. Santiago de Chile, Chile.
- Tulunoglu, O., Demirtas, S., Tulunoglu, I. (2006). Los niveles totales de antioxidante de la saliva en niños relacionados con la caries, edad y género. *Inter journal pediatric dentistry*. **32**. 10-15.
- Warren R., Odell J., Warren W., Burger R., Maciulis A. (1997). Brief report: immunoglobulin A deficiency in a subset of autistic subjects. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. **27**:187–192.

Consultas en línea:

- www.asisccmaxilo.com. [consulta: 09 de Febrero de 2015].

VIII. Anexos



Nº 0421-2013

Caracas, 05 de abril de 2013

Ciudadana
MSc. Mariana C. Morales Ch,

Nos dirigimos a usted en la oportunidad de informarle que el Comité de Bioética de esta Facultad, una vez analizado el proyecto de investigación, presentado por usted bajo el título: **“FACTORES SALIVALES QUE INFLUYEN EN EL ÍNDICE DE CARIES DE PACIENTES AUTISTAS”**.

Concluye que el mismo aprueba su protocolo de investigación, por lo tanto tiene el aval inicial, el cual tiene una validez de un año a partir de la fecha 05-04-2013 al 06-04-2014. Se le informa que al cabo del año debe presentar un informe sobre los resultados parciales o finales de la investigación, ya que el aval es indispensable para defender su presentación o para publicarla. En caso de no concluirla, deberá consignar un informe con los resultados parciales antes mencionados, para prorrogar el aval o en el mejor de los casos un informe con los resultados finales de su investigación para concluir el seguimiento de la investigación por parte del Comité de Bioética.

El Comité no se subroga, ni reemplaza de responsabilidad a quienes han solicitado su aval, para realizar un proyecto de investigación o asesoramiento. Las resoluciones no son un amparo jurídico directo, la ejecución debe estar en manos del profesional responsable.

Sin otro particular a que hacer referencia.

Atentamente.-

Prof. María J. Ferro de Farfante
Coordinadora del Comité de Bioética



MJFF/mjff

Anexo 1. Aprobación del protocolo de investigación del presente estudio otorgado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la UCV a la odontóloga Mariana Morales.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

FACTORES SALIVALES QUE INFLUYEN EN EL

ÍNDICE DE CARIES DE PACIENTES AUTISTAS

Yo, _____, de _____ de edad, identificado con la cédula de identidad N _____, domiciliado en _____ como representante legal o familiar de _____, declaro lo siguiente:

He sido informado (a) sobre el proyecto de investigación llevado a cabo por la Odontóloga Mariana C. Morales Chávez donde será tomada una muestra de saliva de mi representado mediante el uso de algodones.

Me han explicado de forma clara y suficiente los objetivos del proyecto, entre los que se encuentran el determinar los factores salivales en niños autistas, comparándolos con niños regulares para evaluar las diferencias y poder determinar su relación con el desarrollo de caries. Comprendo la vital importancia que puede traer para los pacientes autistas y regulares los resultados que pueda acarrear esta investigación en cuanto a la prevención del desarrollo de caries. Además he recibido material informativo sobre la investigación por lo que considero trascendental la participación de mi representado. Se me ha explicado que le serán introducidos en la boca de mi representado unos rollos de algodón cercanos a la salida del conducto excretor de la glándula parótida (en la cara interna del carrillo, distal al segundo molar temporal) durante un minuto, en el horario comprendido entre 9 y 11 de la mañana, sin haber ingerido alimentos ni bebidas al menos una hora previa al procedimiento.

Comprendo que la atención del paciente con autismo es compleja por lo que a pesar de que la toma de la muestra es mínimamente invasiva y se realizará en una sola sesión, puede generar algún tipo de molestia, al igual que el tiempo invertido para este procedimiento probablemente será mayor debido a la necesidad de adaptación del niño.

Acepto la realización de fotografías y otros medios diagnósticos que sean necesarios; garantizándome la confidencialidad, el resguardo de la identidad de mi representado y la utilización de dichos records solo con fines académicos y científicos.

Se me ha explicado claramente que esta investigación no acarreará ningún costo, ya que los mismos serán cubiertos por la investigadora.

Confirmando que luego que aclararon mis dudas, me siento bien informado (a), comprendo la información, libre, sin persuasión, manipulación ni coacción para decidir voluntariamente, con el tiempo suficiente para meditar o consultar la decisión con quien considere pertinente,

Anexo 2. Consentimiento Informado que se les entrega a los representantes de los niños a los que se les tomará la muestra para que sea firmado en constancia de su aceptación (Lado A).

de acuerdo con mis valores e intereses y me declaro competente para tomar las decisiones que correspondan.

Me siento libre, sin coacción, ni manipulación, para decidir de acuerdo con mis valores e intereses y me declaro competente para tomar las decisiones que correspondan. En tal sentido DOY MI CONSENTIMIENTO A LA ODONTÓLOGA MARIANA C. MORALES CHAVEZ A REALIZAR EL TRATAMIENTO PERTINENTE ____ o NO CONSIENTO ____ con el buen entendido que puedo retirar este consentimiento por escrito cuando así lo desee, sin represalia ni penalidad alguna. Así mismo doy fe de que mi representado FUE ESCUCHADO (se tomó en cuenta su disposición a la participación, realizando los procedimientos con la mayor consideración) SI ____ NO ____ o dio su ASENTIMIENTO SI ____ NO ____.

Mariana C. Morales Chávez

C.I. 14.350.185

Telf. 0416.6334628

COV. 19616 MPPS 19249

Nombre del Paciente: _____

Edad _____ Nombre del Representante legal _____

_____ C.I. _____ Parentesco _____

Firma _____

Testigo, Nombre

Testigo, Nombre

C.I.

C.I.

En, _____ a los _____ del mes _____ de 20____.

Anexo 3. Consentimiento Informado que se les entrega a los representantes de los niños a los que se les tomará la muestra para que sea firmado en constancia de su aceptación (Lado B).