

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DEPTO. ODONTOLOGÍA RESTAURADORA Y CIENCIAS BÁSICAS.

AREA OPERATORÍA DENTAL Y QUÍMICA.

**Implementación de una metodología para la medición de la actividad ureasa  
y arginina deiminasa en saliva y biopelícula oral humana.**

**Evelyn Magdalena Reyes Beltrán.**

TRABAJO DE INVESTIGACION

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

**Prof. Ismael Yévenes López.**

TUTORES ASOCIADOS

**Prof. Dr. Javier Martín Casielles.**

**B.Q. Miguel Neira Jara.**

Santiago – Chile

2012

## **DEDICATORÍA.**

A mi abuelo Ramón Reyes Vivanco.

## **AGRADECIMIENTOS.**

- A mis padres por ser un pilar fundamental en mi vida, en mis proyectos, y por su amor incondicional.
- A mis profesores, Ismael Yévenes por su disposición y apoyo constante, a Gustavo Moncada por estimular mi gusto por la investigación y fomentarla, a Miguel Neira y Javier Martin por el gran aporte en esta tesis.
- A Dios por sostenerme siempre.

## INDICE.

Página.

Introducción.....	1
Marco Teórico.....	2
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	17
Material y Método.....	18
Resultados.....	34
Discusión.....	47
Conclusiones.....	54
Sugerencias.....	55
Referencias Bibliográficas.....	56
Anexo N°1. Preparación de Reactivos.....	64
Anexo N°2. Ficha paciente tesis.....	68

## **RESUMEN.**

### **Introducción.**

La producción de amonio genera alcalinización de saliva y biopelícula dental, este amonio puede ser producido a través de enzimas como la ureasa (U) y arginina deiminasa (ADS), ambas presente en la cavidad oral. Esta mayor producción de amonio puede estar relacionada con un factor protector de caries. Para ello es necesario establecer como primera medida una metodología que permita la medición de la actividad enzimática de U y ADS en saliva y biopelícula oral humana, a través del amonio generado por estas.

### **Material y Método.**

Se recolectaron muestras de saliva y biopelícula dental de 20 sujetos, 10 correspondían al grupo de bajo COPD (COPD = 0) y 10 al grupo de alto COPD (4 o más caries dentinarias). Se construyó una curva estándar de amonio, una curva estándar de proteínas totales y se midió la producción de amonio en las muestras señaladas, siendo este amonio expresado por la cantidad de proteínas totales presente en cada muestra respectiva, lo cual represento la actividad enzimática estudiada.

### **Resultados.**

La metodología establecida permitió medir la actividad de U y ADS en saliva y biopelícula oral humana. El modo de conservación de muestras propuesto no genero pérdidas. La curva de calibración de amonio presentó un coeficiente de correlación 0,976 y la curva de calibración de proteínas un coeficiente de correlación 0,902. La actividad enzimática, al compararla entre grupos de bajo y

alto COPD, fue mayor en el grupo de bajo COPD en todos los sistemas medidos, U en saliva, ADS en saliva, U en biopelícula, ADS en biopelícula, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

### Conclusión.

En la muestra de este estudio se pudo establecer una metodología adecuada para la medición de actividades enzimáticas de ureasa y arginina deiminasa, y su relación con el riesgo de caries.

La metodología presentada permitió la discriminación en la producción de amonio, entre grupos con bajo y alto COPD. Estos resultados sugieren menor presencia de caries en individuos con mayor producción de amonio, a través de los sistemas enzimáticos estudiados, dado por la alcalinización que genera el amonio en el medio oral.

## **INTRODUCCIÓN.**

El análisis de la literatura revela una nueva dimensión preventiva en el conocimiento de la enfermedad caries dental al estudiar la evidencia *in vitro*, donde el amonio producido desde la urea y la arginina del ambiente oral, actuaría como un importante factor endógeno inhibitorio del desarrollo de lesiones de caries dental. Este hecho apoyaría la hipótesis que la producción de amonio por urealisis y por el sistema de arginina deiminasa, podrían inhibir potencialmente el desarrollo de la caries dental por la neutralización de ácidos y la estabilización de la microbiota oral, hacia una compatible con salud, favoreciendo las condiciones para el mantenimiento de la salud oral.

Esta investigación pretende contribuir en el inicio de un camino que se vislumbra prometedor para el campo en cariología, particularmente *in vivo* e *in situ*, con la finalidad futura de establecer asociaciones verificables y con el objetivo mayor de generar una aplicación clínica de estos compuestos en la prevención de caries dental.

Para ello es que creemos fundamental iniciar este camino con el establecimiento de una metodología clara, precisa, accesible y reproducible, que permita a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, generar conocimiento en esta línea.

## **MARCO TEORICO.**

### Contexto epidemiológico.

De las enfermedades que afectan la cavidad bucal, la caries dental es la que presenta la mayor prevalencia en la población mundial, generando un problema epidemiológico que compromete en mayor o menor medida a todos los países, afectando cerca del 100% de la población en la mayoría de ellos.<sup>1</sup> Además, afecta de una manera importante la calidad de vida de quienes la padecen, así lo demuestra la última Encuesta Nacional de Calidad de Vida realizada el año 2006 en Chile, donde un 37% de los mayores de 15 años, dijeron sentir que su Salud Bucal afecta su calidad de vida siempre o casi siempre.<sup>2</sup>

La caries dental representa el mayor problema de salud oral incluso en los países industrializados, afectando entre el 60 al 90% de la población escolar y la gran mayoría de la población adulta. Además, es la enfermedad buco dental mas prevalente en Latinoamérica y Asia, siendo menos común y severa en países africanos<sup>3</sup>. En Estados Unidos todavía constituye un importante problema de salud pública, siendo la enfermedad crónica más frecuente en la población, afectando a más del 96% de los adultos y al 99,5% de individuos de 65 años o más.<sup>4,5</sup>

En Chile la realidad no es distinta, la caries dental aumenta sostenidamente con la edad, según rango etario, corresponde a un 17% a los 2 años, un 48,02% a los 4 años, un 70,36% a los 6 años, un 62,5% a los 12 años, aumentando drásticamente a un 98% en la población entre 35 a 44 años, llegando a un 100% de la población con historia de caries entre los 65 a 74 años.<sup>6-10</sup>



Debido a este panorama mundial, investigadores realizan constantes exploraciones de nuevas estrategias tanto en prevención, tratamiento, así como de la evaluación del riesgo cariogénico en diferentes condiciones.<sup>11</sup>

### Bacterias orales y caries dental

Actualmente, existe consenso al afirmar que las bacterias orales que colonizan los dientes forman, una comunidad denominada biopelícula que está en equilibrio dinámico con las defensas del organismo y generalmente es compatible con la integridad de los tejidos dentarios.<sup>12-14</sup> Entre los microorganismos relacionados con salud dental, encontramos especies como *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*), entre otros.<sup>15-18</sup>

La transición de salud a enfermedad oral, como la caries dental, es caracterizada por cambios composicionales y metabólicos de la biopelícula,<sup>13,19</sup> debido a que la colonización de los tejidos orales está continuamente sujeta a fluctuaciones según las condiciones del medio oral. Los factores que han mostrado una mayor influencia sobre la composición y las actividades bioquímicas de la biopelícula oral y sobre su potencial patógeno, son el pH y la fuente y disponibilidad de sustancias nutritivas como los hidratos de carbono, entre otros.<sup>20</sup>

La fermentación de hidratos de carbono, genera un baja considerable del pH, donde una repetida y mantenida acidificación de la biopelícula promueve el establecimiento de una microbiota acidogénica y acidúrica, con un aumento de la presencia de bacterias como *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y especies

del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus sp*), entre otros, lo que se asocia a un incremento de la vulnerabilidad a la caries dental.<sup>14,21-25</sup>

Los niveles de *S. mutans* observados en sujetos con caries activas fue significativamente alta en comparación con sujetos sin caries. Además, bajos niveles de *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, y *S. salivarius*, fueron observados en los sujetos con caries activas comparados con sujetos libres de caries, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.<sup>11</sup>

La ingestión periódica de hidratos de carbono en la dieta y la acidificación de la biopelícula dental, resultado de la actividad metabólica de esta microbiota cariogénica, genera a través de la biopelícula, ciclos repetidos de desmineralización del esmalte dental producto de los ácidos provenientes de la glucólisis bacteriana. De esta manera el pH de la biopelícula dental disminuye rápidamente, alcanzando valores bajo los 5,5, críticos para el inicio de la desmineralización,<sup>69</sup> que luego gradualmente vuelven a su nivel inicial.<sup>26</sup> Las fases de desmineralización son seguidas de períodos de alcalinización, que promueven la remineralización restaurando la integridad del esmalte. El desarrollo de la caries dental es un proceso prolongado que involucra ciclos de desmineralización y remineralización. Cuando la fase de desmineralización es la dominante, se desarrolla la lesión de caries.

### Álcalis.

Algunos factores de riesgo para la caries han sido identificados y estudiados,<sup>20,27,28</sup> y con ello también la transición, desde un individuo libre de caries a un estado de actividad cariogénica, donde este proceso podría

relacionarse con un reducido potencial de generar álcali en la biopelícula, sumado a un incremento de un medio acidogénico. Aunque muchos estudios se han enfocado en la naturaleza acidogénica de la caries dental, el modo de aumentar la fase de alcalinización y la homeostasis del pH, no ha sido totalmente difundido.

La línea de pensamiento dominante sobre el desarrollo de caries hace aproximadamente 60 años, consistía en la producción ácida como el determinante exclusivo. Sin embargo, a finales de los años 1970 y a principios de los años 1980, el trabajo del laboratorio de Kleinberg, comenzó a ilustrar que la generación de álcali de sustratos salivales, sobre todo de arginina y urea, podrían jugar papeles importantes en el pH de la biopelícula, la homeostasis y en la inhibición de caries dental.<sup>29</sup>

Existen diversos estudios que apuntan en esta dirección, tanto *in vitro*,<sup>26,30-39</sup> en animales,<sup>31</sup> así como por algunas observaciones clínicas indirectas<sup>28,40-43</sup>. La literatura también apoya, pero de forma indirecta, el hecho que el riesgo de caries esta directamente asociado con la pérdida del potencial generador de álcali<sup>28,32,44</sup>. Este potencial alcalinogénico de un biopelícula podría establecerse como una estrategia prometedora en la prevención o el control de la caries dental.

Se ha demostrado que existe una biopelícula dental más alcalina en sujetos caries resistentes, comparado con sujetos caries susceptibles.<sup>36</sup>

Bacterias orales, como *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. salivarius*, podrían contribuir a la alcalinización de la biopelícula, a través de la generación de amonio a partir de la vía de la deiminasa arginina y ureasa. Esta producción de amonio por bacterias orales, podría influir positivamente en el equilibrio entre la nueva

mineralización y la desmineralización del diente y pueden ayudar a prevenir la aparición de la microbiota cariogénica.<sup>40, 30,44-46</sup>

En el estudio de Gordan y cols. (2010), se observó una positiva relación entre el número de *S. salivarius* y niveles de actividad de ureasa, y una negativa relación entre el número de *S. mutans* y niveles de arginina deiminasa.<sup>47</sup>

En esta misma línea, resultados de un estudio *in vitro*, donde se modificó la bacteria *S. mutans* para que produjera ureasa, generó aumentos en la actividad de ésta, disminuyendo considerablemente la acidificación ambiental.<sup>31</sup> En este estudio, ratas fueron infectadas con *S. mutans* modificado para producir álcali a través de la enzima ureasa. Los animales fueron alimentados con una dieta cariogénica suplementada con urea. Las ratas infectadas por *S. mutans* recombinante, tenían una incidencia y severidad francamente inferior en caries comparado con aquellos animales que solo estaban infectados con la bacteria silvestre, mostrando que la generación de álcali inhibe la caries.<sup>31</sup>

Otra observación interesante es la encontrada en pacientes con insuficiencia renal crónica, los cuales presentan altas concentraciones de urea salival,<sup>48,49</sup> y una baja incidencia en los niveles de caries dental,<sup>50-52</sup> a pesar de consumir dieta predominantemente cariogénica.<sup>53</sup>

En los últimos años, se ha iniciado el estudio de la producción de álcali en la biopelícula dental y saliva de individuos con diverso estado cariogénico. Los primeros resultados han determinado una positiva relación entre altos niveles de producción de álcali y resistencia a caries, como niveles considerablemente altos de actividad de ureasa y arginina deiminasa, en individuos sin experiencia de caries, comparados con individuos en actividad de caries.<sup>11</sup> Datos existentes apoyan indirectamente la idea que la producción de álcali tiene efecto en el pH

de la biopelícula y su homeostasis. Parte de este hallazgo estaría relacionado con la mayor concentración de amonio generado en la biopelícula de estos sujetos resistentes a caries.<sup>35</sup>

El amonio producido desde urea y arginina, a través de vías como la urealisis y por el sistema arginina deiminasa, podría ser un importante factor endógeno inhibitorio de la aparición de microbiota cariogénica y de la caries dental. Esto se llevaría a cabo a través de la neutralización de ácidos aportada por la alcalinización que genera el amonio en la saliva y la biopelícula. Además, un medio más alcalinogénico permitiría la estabilización de una microbiota afín con salud oral.<sup>11,20,33,40</sup>

Claramente, la modulación del potencial alcalinogénico de la biopelícula dental y la manipulación de la disponibilidad de sustratos que generan álcali, pueden ser estrategias eficaces que permitan mejorar la salud oral.

### Arginina y urea.

Hay dos sustratos principales para la generación de álcali por la saliva y la biopelícula oral, urea y arginina. La urea está en todas las secreciones de las glándulas salivales en concentraciones aproximadamente similares a las del suero, la cual oscila entre 1 y 10 mM en individuos sanos.<sup>50,55</sup> La urea es rápidamente hidrolizada a amoníaco y CO<sub>2</sub> por ureasas bacterianas, presentes en un subconjunto discreto de bacterias orales, incluyendo *S.salivarius*, *Actinomyces naeslundii* y el grupo *Haemophili*.<sup>20</sup> Llama la atención que el amonio generado desde la urealisis puede llegar a producir un aumento considerable del pH en la biopelícula, a pesar de una dieta rica en

carbohidratos,<sup>44,56</sup> siendo uno de los mejores caminos para la producción de álcali en la cavidad oral.<sup>57</sup>

Podría ocurrir, que individuos que presentan bajos niveles de actividad de ureasa, en realidad posean reducida presencia de bacterias productoras de ureasa.<sup>58</sup> Validando este pensamiento, un reciente estudio mostró una asociación positiva entre el número de *S. salivarius* y los niveles de ureasa. El *S. salivarius* usa la urea como fuente de nitrógeno para su crecimiento, por un camino dependiente de ureasa.<sup>59</sup> Se ha observado la capacidad de la biopelícula oral y del *S. salivarius* para regular la expresión de ureasa en respuesta al aumento del pH, generando un impacto significativo sobre la biopelícula oral, pH, homeostasis, y ecología microbiana.<sup>60</sup>

Para destacar la importancia de esta actividad enzimática, se ha llegado a sugerir que la urealisis en la biopelícula puede ser casi completamente explicada por el porcentaje de bacterias urealíticas presentes en la microbiota de la biopelícula.<sup>38</sup>

Otra variable importante que influye en la actividad de la ureasa, es el entorno oral. El pH del medio afecta la capacidad de *S. salivarius* y el metabolismo de la ureasa. Niveles de pH bajo 4 puede inactivar la ureasa del *S. salivarius*.<sup>61,62</sup>

La arginina es el otro sustrato que genera álcali, esto se produce a través de la acción de la enzima arginina deiminasa. En su forma libre, arginina es secretada en concentraciones promedio de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  y es también abundante en péptidos salivales y proteínas.<sup>28</sup> Por ejemplo, proteínas ricas en histidina contienen aproximadamente 10 a 20% de arginina, que puede ser liberada por proteasas y peptidasas. La arginina es principalmente catabolizada a ornitina, amoníaco y  $\text{CO}_2$  por biopelículas colonizadas por las bacterias *S.*

*gordonii*, *S. parasanguis*, *S. rattus* y *S. sanguis* y algunas bacterias del grupo *Lactobacilli*.<sup>20</sup>

En relación con la actividad arginina deiminasa, se ha podido asociar un elevado nivel de arginina salival con resistencia a caries,<sup>28</sup> y se ha empezado a estudiar clínicamente la capacidad de la biopelícula oral para producir álcali desde arginina y su relación con esta enfermedad. El resultado de un reciente estudio muestra una diferencia significativa entre los niveles de actividad de arginina deiminasa, entre individuos con diferentes estados de caries y una relación positiva, entre el número de *S. sanguinis* y los niveles de actividad de esta enzima.<sup>11</sup>

Hay muchos sistemas para la generación de álcali en el medio oral, basta considerar la variada composición de sustancias nutritivas y la diversidad de bacterias presentes en la biopelícula oral. Pero estos son relativamente menores comparados con la urealisis y arginolisis.<sup>20</sup>

Es importante considerar que la actividad metabólica, de arginina deiminasa y ureasa, es de alta sensibilidad y los resultados de sus mediciones pueden variar dentro de las mismas especies de bacterias, o entre diferentes cepas bacterianas de la misma especie. Otro aspecto importante de destacar, es que las bacterias son dependientes de su entorno, tanto para la producción de ácido como de álcali.<sup>11</sup>

Nuevos estudios apuntan a identificar cepas bacterianas y/o asociaciones microbianas, capaces de contribuir a la arginolisis y urealisis total en la cavidad oral. De igual forma, se pretende establecer la naturaleza y función de los factores que controlan la alcalinogénesis en la microbiota oral.<sup>11</sup>

Sin embargo, son necesarios mayores avances en esta línea de estudio, para la total comprensión del rol bioquímico de cada una de las partes involucradas en este proceso y es de vital importancia establecer protocolos de investigación en la medición de esta actividad alcalinogénica. Estos protocolos deben ser reproducibles, estableciendo líneas de acción en distintos niveles para la medición de esta actividad y con ello establecer las bases que permitan a la Cariología una mayor comprensión de la microbiología, bioquímica y el impacto en la salud y enfermedad de la producción de álcalis en saliva y biopelícula oral humana.

#### Índice para la medición de la caries dental.<sup>68</sup>

Los índices disponibles dan cuenta de diferentes momentos del proceso de salud y enfermedad pudiendo identificarse así:

Índices que miden:

- la historia pasada.
- los factores de riesgo.
- la necesidad de tratamiento.
- el proceso de desarrollo de la caries dental.

Los índices que miden la historia pasada de caries son: CPOD, ceod, CPOS y ceos.

- CPOD (unidades de dientes permanentes cariados, extraídos y obturados).



- ceod (unidades de dientes primarios cariados, con indicación de extracción y obturados).
- CPOS (unidades de superficie dentarias permanentes cariadas, extraídas y obturadas).
- ceos (unidades de superficies dentarias primarias cariadas, con indicación de extracción y obturadas).

El índice que será utilizado en el presente estudio es el COPD.

#### CPOD.<sup>68</sup>

Fue desarrollado por Klein, Palmer y Knutson (1938) durante un estudio sobre el estado y la necesidad de tratamiento dental en niños asistentes a escuelas primarias en Hagerstown (Maryland, EEUU); Aquí se registró la experiencia de caries pasada y presente de 28 dientes (se excluyen los terceros molares), considerando los dientes con lesiones cariosas cavitadas y los tratamientos realizados. Se obtuvo mediante la sumatoria de los dientes permanentes cariados, perdidos y obturados presentes e incluye las extracciones indicadas.

El índice COPD según la OMS se puede categorizar como:

- |             |          |
|-------------|----------|
| • 0.0 – 1.1 | Muy bajo |
| • 1.2 – 2.6 | Bajo     |
| • 2.7 – 4.4 | Moderado |
| • 4.5 – 6.5 | Alto     |
| • > 6.6     | Muy alto |

### Medición de Actividad enzimática.

Una forma para establecer actividad enzimática, es a través de la medición de su producto generado luego del aporte del sustrato utilizado por la enzima. La cantidad de producto generado puede ser determinado a través de la espectrofotometría.

### Espectrofotometría.<sup>63</sup>

Se basa en la relación que existe entre la absorción de la luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir una luz monocromática de una sola longitud de onda sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida. Como consecuencia de las interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes, se provoca que la intensidad del rayo de luz sea atenuada desde  $P_0$  a  $P$ , siendo  $P_0$  la intensidad de la luz incidente y  $P$  la intensidad del rayo de luz transmitido.

Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida (absorbancia) por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto.

El método de la espectrofotometría se rige por dos leyes fundamentales:

- 1- Ley de Lambert: establece que cuando pasa luz monocromática por un medio homogéneo, la disminución de la intensidad del haz de luz incidente es proporcional al espesor del medio, lo que equivale a decir que la

intensidad de la luz transmitida disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente el espesor del medio absorbente.

2- Ley de Beer: la intensidad de un haz de luz monocromática disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente la concentración de la sustancia absorbente, cuando este haz pasa a través de un medio homogéneo.

De ellos obtenemos los términos transmitancia y absorbancia.

Transmitancia (T): Es la razón entre la luz monocromática transmitida (P) por una muestra y la energía o luz incidente ( $P_0$ ) sobre ella.

Absorbancia (A): Se define como el logaritmo negativo de la transmitancia.

#### Mediciones de transmitancia y absorbancia .

En espectrofotometría se mide el porcentaje de transmitancia, ya que su escala de medición es lineal, mientras que la escala de medición de la absorbancia es logarítmica. La medición de absorbancia o transmitancia se hacen por comparación entre la muestra problema y el estándar arbitrario (o referencia).

#### Selección de longitud de onda de trabajo.

La longitud de onda de trabajo corresponde a aquella longitud en la cual la absorbancia del analítico (sustancia a analizar) es máxima, y recibe la denominación de  $\lambda_{\text{máximo}}$ . Para su determinación se hace un espectrograma de absorción o curva espectral, que consiste en una gráfica de la

absorbancia de la sustancia absorbente de concentración adecuada, medida a distintas longitudes de onda, y en ella se determina el  $\lambda$  máximo.

Las mediciones de absorbancia se hacen en la zona de longitudes de onda donde se espera que absorba la sustancia problema. Si se trata de sustancias coloreadas, las mediciones se realizan en la zona visible del espectro electromagnético (320 -800 nm). En el caso de sustancias no coloreadas, las mediciones se realizan en la región ultravioleta del espectro electromagnético (200-320 nm).

Es importante la claridad de estos conceptos, para entender los procedimientos que llevan a la medición de determinadas sustancias, como es el amonio en el presente estudio, producto final de la reacción de urea con su enzima ureasa y arginina con su respectivo sistema de arginina deiminasa.

Este método es el utilizado por otros estudios clínicos en la medición de actividad enzimática, basados en la colorimetría que se obtiene para la medición del producto deseado.<sup>11,47</sup>

La finalidad de alcanzar una metodología que permita la medición de las actividad de las enzimas U y ADS, es el primer paso para el establecimiento de protocolos que conduzcan al estudio de las funciones, interrelaciones, ventajas y alcances que puede abordar esta línea de estudio.

El conocimiento de la actividad de estas enzimas podría proporcionar información valiosa para explicar, por ejemplo, los posibles efectos y mecanismos bioquímicos de acción de elementos terapéuticos que en su

aplicación generan liberación de urea, (blanqueadores dentales) o que en su formulación contengan arginina (pastas dentales).

Las pastas dentales con arginina son actualmente utilizadas para la disminución de la sensibilidad dentinaria, el uso de ellas ha reportado un notable efecto inhibitorio en la aparición de nuevas lesiones cariosas y en su tasa de progresión, observándose que presentan resultados superiores a la sola utilización de fluoruros. Esto constituye una simple y económica herramienta para reducir sustancialmente una de las enfermedades más prevalentes en los niños.<sup>64,65</sup>

## **HIPOTESIS.**

La metodología implementada permitirá la medición de la actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva y biopelícula dental.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Establecer una metodología para la medición de la actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva y biopelícula dental.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

1. Cuantificar la concentración de proteínas totales en saliva y biopelícula dental.
2. Medir la producción de amonio desde urea a través de la ureasa, en saliva y biopelícula dental.
3. Medir la producción de amonio desde arginina a través de arginina deiminasa en saliva y biopelícula dental.
4. Establecer si existen diferencias en la producción de amonio de los sistemas U y ADS desde saliva y biopelícula dental, entre sujetos con bajo COPD y alto COPD, a través de la metodología propuesta.

## **MATERIAL Y METODO.**

### **Tipo de estudio.**

Estudio experimental de estandarización de técnica.

### **Materiales.**

- Tubos falcón y tubos Eppendorf (Falcon 2070, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).
- Curetas (GR 4 and 5, Gracey finishing cures, Ransom and Randolph, Toledo, OH, USA).
- Coleman (Frigo ®).
- Micropipetas (Labopette ®).
- Puntas de micropipetas (mLine®).
- Refrigerador (Sindelen ®).
- Refrigerador de bajas temperaturas (-80°C). (Sanyo Electric Co. Ltda).
- Sonificador (Transsonic 460/H. Elma ®).
- Centrífuga Refrigerada (5417 R. Eppendorf).
- Estufa. (Labtech. Co. Ltd ®).
- Espectrofotómetro. (UNICAM UV/Vis Spectrometer).
- Cubetas plásticas de 1 ml para espectrofotómetro.
- Reactivos. (Anexo N°1)



### **Selección de las muestras.**

Un operador realizó el examen bucal a los 20 sujetos seleccionados para este estudio (13 mujeres y 7 hombres), de ellos 10 pertenecían al grupo de bajo COPD y 10 al grupo de alto COPD. Estos sujetos fueron reclutados en la clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, los cuales cumplieron con los requerimientos de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión: tener sobre 18 años de edad, poseer 20 o más dientes en boca. Para pertenecer al grupo de bajo COPD y alto COPD se establecieron requisitos arbitrarios que permitieron la mayor polarización de las muestras.

Bajo COPD. Se estableció un índice igual a 0 (sin presencia de caries, sin presencia de obturaciones y sin pérdida de dientes por causa de caries).

Alto COP. Se estableció la presencia de mínimo 4 caries dentinarias en boca.

Criterios de exclusión: sujetos menores de 18 años, menos de 20 dientes en boca, flujo salival disminuido (menos de 0,5 ml/min en mujeres y 0,7 ml/min en hombres), uso de antibióticos, clorhexidina en el último mes, sufrir de enfermedades sistémicas como diabetes, hipertensión, inmunodeficiencias u autoinmunes, no haber usado pasta dental que contenga arginina, ni haberse realizado blanqueamientos dentales en el último mes.

A los sujetos seleccionados se les solicitó al momento de la toma de muestras contar con un ayuno de 12 horas, donde debían abstenerse de cualquier tipo de higiene oral (Protocolo usado en estudio, Gordan y cols., 2010),<sup>47</sup> y se les pidió la lectura y firma del consentimiento informado.

### **Obtención de saliva.**

A los 20 sujetos, se les recolectó saliva no estimulada, solicitando la expectoración de 3 ml de saliva en un tubo de plástico estéril, durante un tiempo máximo de 6 minutos. Las muestras se mantuvieron a 4°C durante el procedimiento.

### **Obtención de biopelícula.**

A los 20 sujetos, se les recolectó la biopelícula supragingival, a través del raspado de todas las superficies lisas dentales y regiones molares, con curetas periodontales estériles. Esto fue transferido a tubos Eppendorf estéril que contenían 500 µl de solución de 10 mM  $K_2HPO_4$  (pH 7), el cual se mantuvo a 4°C durante la toma de muestra.

### **Conservación de muestras hasta el momento de estudio.**

Las muestras de saliva y biopelícula fueron congeladas, siendo almacenadas a -80°C hasta el día del análisis. La descongelación de las muestras para el posterior procesamiento se realizó trasladándolas a una refrigeración a 4°C.

## **1- Cuantificación de la concentración de proteínas totales en saliva y biopelícula dental.**

Se determinó la concentración de proteínas totales, como una forma de expresar la liberación de amonio de las muestras, en base a la cantidad de proteínas totales presentes, esto debido a que expresar el amonio por unidad de volumen de biopelícula es difícil, ya que en cada sujeto el volumen extraído de biopelícula es diferente.

Para ello el primer paso es crear una curva de calibración de proteínas totales.

### **Curva de calibración de proteínas totales.**

La presente curva se obtuvo a través del método de Bradford,<sup>67</sup> donde diversas concentraciones conocidas de proteínas de bovino Sigma-Aldrich (BSA) se mezclan con el reactivo de Bradford, generando una coloración azul que varía según la concentración de proteínas. La absorbancia es leída en el espectrofotómetro, con lo cual se construyó una curva de concentración de proteína versus absorbancia.

En la Tabla N° 1 se desglosan las cantidades de los distintos reactivos para confeccionar la curva de calibración.

**Tabla Nº 1. Confección curva calibración proteínas.**

	Volumen ( $\mu$ l)				
<b>Reactivos</b>	Blanco	St 1	St 2	St 3	St 4
		0,2 mg/ml	0,8 mg/ml	1,4 mg/ml	2,0 mg/ml
BSA	---	10	10	10	10
H <sub>2</sub> O	800	790	790	790	790
Reactivo de Bradford	200	200	200	200	200
Volumen total	1000	1000	1000	1000	1000

(St= Estandar)

Posterior a la preparación de las reacciones señaladas en la tabla Nº 1, se continuó con el siguiente protocolo:

- Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.
- Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.
- Se realizó una regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la curva de calibración de proteínas versus la absorbancia obtenida.

### **Cuantificación de proteínas totales de las muestras.**

Para cuantificar las proteínas totales presentes en las muestras, se realizó un protocolo similar al señalado para crear la curva de calibración de proteínas. El reactivo de Bradford, es mezclado con las diversas muestras de saliva y biopelícula, que poseen concentraciones no conocidas de proteínas, generando distintas tonalidades en azul, que fueron leídas en el espectrofotómetro.

En la Tabla Nº 2 se desglosan las cantidades de los distintos reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas.

**Tabla N° 2. Reacción para la cuantificación de proteínas.**

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)		
	Blanco	Saliva	Biopelícula
Muestra	---	10	10
H <sub>2</sub> O	800	790	790
Reactivo de Bradford	200	200	200
Volumen total	1000	1000	1000

Posterior a la preparación de las reacciones señaladas en la Tabla N° 2, se continuó con el siguiente protocolo:

- Se incubo a temperatura ambiente durante 30 min.
- Se leyó la absorbancia a 595 nm.

Para obtener la concentración de proteínas totales (mg/ml), se utilizó la ecuación de regresión obtenida de la curva de calibración de proteínas (Tabla N° 1).

**Medición de la producción de amonio de U y ADS en saliva y biopelícula**

## dental.

La determinación del amonio generado enzimáticamente por las muestras de biopelícula y saliva, se realizó a través de un método espectrofotométrico, que permite leer la absorbancia que presenta cada muestra. Para ello, primero se creó una curva de calibración de amonio.

### Curva de calibración de amonio.

Esta se obtuvo a través de la curva de Nessler,<sup>66</sup> donde diversas concentraciones conocidas de amonio se mezclan con reactivo de Nessler, generando una coloración amarilla que varía según la concentración de amonio. La absorbancia de estos estándares fue leída en el espectrofotómetro creando una curva de concentración de amonio versus absorbancia. Esta curva fue utilizada posteriormente para medir concentración de amonio en las muestras procesadas.

Para obtener la curva de calibración de amonio se mezclaron los siguientes reactivos, mostrados en la Tabla N° 3.

**Tabla N° 3. Confección curva calibración de amonio.**

Reactivos	Volumen (µl)				
	Blanco	50	150	300	400
H <sub>2</sub> O	900,0	897,5	892,5	885,0	880,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 mM	---	2,5	7,5	15,0	20,0
Reactivo Nessler	100	100	100	100	100
Volumen total	1000	1000	1000	1000	1000

Posterior a la preparación de las reacciones señaladas en la tabla N° 3, se continuó con el siguiente protocolo:

- Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 395 nm.
- Se realizó una regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la curva estándar de la concentración de amonio versus la absorbancia obtenida.

Luego de creada la curva de calibración de amonio, se procedió a preparar las 20 muestras de biopelícula y las 20 muestras de saliva para medir la producción de amonio.

### **Preparación de las muestras de saliva.**

Para la manipulación de la saliva, se trabajó con el siguiente protocolo:

- Se reunieron 2 tubos Eppendorf con 1,5 ml de saliva por cada muestra de saliva.
- Se dispersó la saliva a través de sonificación externa por dos ciclos de 30 s., ocupando refrigeración sobre hielo durante los intervalos.
- Se centrifugó durante 2 min. a 14000 rpm y 4 °C.
- El pellet obtenido fue utilizado, eliminando el sobrenadante.
- Se lavó una vez con 10 mM de tris Maleato (pH 6).
- Se centrifugó nuevamente durante 2 min. a 14000 rpm y 4 °C.
- El pellet obtenido fue utilizado, eliminando el sobrenadante.
- Los dos pellet obtenidos por cada muestra se resuspendieron en un solo tubo Eppendorf con 500 µl de 10 mM tris Maleato (pH 6).

## **Preparación de las muestras de biopelícula dental.**

Para la manipulación de la biopelícula dental, se trabajó con el siguiente protocolo:

- Se reunió la biopelícula dental obtenida en un tubo estéril que contenía 500  $\mu$ l de 10mM  $K_2HPO_4$  (pH7).
- Se dispersó la biopelícula obtenida a través de sonicación externa por dos ciclos de 30 s., ocupando refrigeración sobre hielo durante los intervalos.
- Se realizó una centrifugación durante 2 min. a 14000 rpm y 4 °C.
- El pellet obtenido fue utilizado, eliminando el sobrenadante.
- Se lavó una vez con 10 mM de tris Maleato (pH 6).
- Se centrifugó nuevamente durante 2 min. a 14000 rpm y 4 °C.
- El pellet obtenido es utilizado eliminando el sobrenadante.
- Se Resuspendió en 500  $\mu$ l de 10 mM tris Maleato (pH 6).

Luego se procede a realizar las reacciones correspondientes para determinar la actividad enzimática de U y ADS en las muestras.

### **2- Producción de amonio desde urea a través de ureasa en saliva y biopelícula dental.**

El procedimiento para determinar la actividad de ureasa tanto en saliva como en biopelícula, consiste en adicionar a las distintas muestras (20 muestras de biopelícula y 20 muestras de saliva), una cantidad fija de urea, que es el sustrato utilizado por la enzima ureasa para producir amonio. La actividad de esta enzima será medida a través de la cantidad de amonio generado.



- Los reactivos utilizados para generar la reacción enzimática de U en saliva y biopelícula se muestran en la Tabla N° 4 y N° 5 respectivamente.

**Tabla N° 4. Reacción para la actividad enzimática de U en saliva.**

Reactivos	Volumen (µl)	
	Control negativo	Actividad Ureasa
Saliva	---	20
Tris Maleato 0,5 M	20	20
Arginina-HCl 1M	---	---
Urea 1M	---	25
H <sub>2</sub> O	5	---
Total volumen	500	500

**Tabla N° 5. Reacción para la actividad enzimática de U en Biopelícula.**

Reactivos	Volumen (µl)	
	Control negativo	Actividad Ureasa
Biopelícula	---	25
Tris Maleato 0,5 M	20	20
Arginina-HCl 1M	---	---
Urea 1M	---	25
H <sub>2</sub> O	5	---
Total volumen	500	500

Posterior a la preparación de las reacciones, se continuó con el siguiente protocolo:

- Se incubó a 37°C durante 90 minutos.
- Se detuvo la reacción por incubación de la muestras sobre hielo durante 5 min.
- Se centrifugaron los tubos durante 1 min. a 14000 rpm a 4°C.
- Se utilizó el sobrenadante en las siguientes reacciones. Detalladas en la Tabla N° 6 y N° 7.

### **Cuantificación de amonio producido desde Ureasa.**

Para cuantificar el amonio producido por la actividad enzimática U, se utilizó el reactivo de Nessler, el cual genera una tonalidad amarilla según la cantidad de amonio con la cual es mezclada.

Los reactivos utilizados para medir el amonio generado por U en saliva y biopelícula se detallan en las Tablas N° 6 y N° 7 respectivamente.

**Tabla N° 6. Reacción para la cuantificación de amonio desde U en saliva**

Reactivo	Volumen (µl)	
	Blanco	Actividad U
H <sub>2</sub> O	900	875
Sobrenadante saliva	---	25
Reactivo Nessler	100	100
Volumen Total	1000	1000

**Tabla N° 7. Reacción para la cuantificación de amonio desde U en biopelícula.**

Reactivos	Volumen (µl)	
	Blanco	Actividad U
H <sub>2</sub> O	900	875
Sobrenadante Biopelícula	---	25
Reactivo Nessler	100	100
Volumen total	1000	1000

Luego de llevar a cabo las reacciones para la cuantificación del amonio, se continuó con el siguiente protocolo:

- Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 395 nm.
- Para obtener los mM de NH<sub>4</sub> producidos, se utilizó la ecuación obtenida de la curva de calibración de amonio, (Tabla N° 3).

### **3- Producción de amonio desde arginina a través de arginina deiminasa en saliva y biopelícula dental.**

El procedimiento para determinar la actividad de arginina deiminasa tanto en Saliva como en biopelícula, consiste en adicionar a las distintas muestras (20 muestras de biopelícula y 20 muestras de saliva), una cantidad fija de arginina, que es el sustrato utilizado por la enzima arginina deiminasa para producir amonio. La actividad de esta enzima será medida a través de la cantidad de amonio generado.

- Los reactivos utilizados para generar la reacción enzimática de ADS en saliva y biopelícula se muestran en la Tabla N° 8 y N° 9, respectivamente.

**Tabla N° 8. Reacción para la actividad enzimática de ADS en saliva.**

Reactivos	Volumen (µl)	
	Control negativo	Actividad ADS
Saliva	---	20
Tris Maleato 0,5 M	20	20
Arginina-HCl 1M	---	25
Urea 1M	---	---
H <sub>2</sub> O	5	---
Volumen total	500	500

**Tabla N° 9. Reacción para la actividad enzimática de ADS en biopelícula.**

Reactivos	Volumen (µl)	
	Control negativo	Actividad ADS
Biopelícula	---	25
Tris Maleato 0,5 M	20	20
Arginina-HCl 1M	---	25
Urea 1M	---	---
H <sub>2</sub> O	5	---
Volumen total	500	500

Posterior a la preparación de las reacciones, se continuó con el siguiente protocolo:

- Se incubó a 37°C durante 90 minutos.
- Se detuvo la reacción por incubación de la muestras sobre hielo durante 5 min.
- Se centrifugaron los tubos durante 1 min. a 14000 rpm a 4°C.
- Se utilizó el sobrenadante en las siguientes reacciones.

### **Cuantificación de amonio producido desde ADS.**

Para cuantificar el amonio producido por la actividad enzimática ADS, se utilizó el reactivo de Nessler, el cual genera una tonalidad amarilla según la cantidad de amonio con la cual es mezclada.

Los reactivos utilizados para medir el amonio generado por ADS en saliva y biopelícula se detallan en las Tablas N° 10 y N° 11, respectivamente.

### **Tabla N° 10. Reacción para la cuantificación de amonio desde ADS en saliva.**

Reactivo	Volumen (µl)	
	Blanco	Actividad ADS
H <sub>2</sub> O	900	875
Sobrenadante saliva	---	25
Reactivo Nessler	100	100
Volumen Total	1000	1000

**Tabla N° 11. Reacción para la cuantificación de amonio desde ADS en biopelícula.**

Reactivos	Volumen (µl)	
	Blanco	Actividad ADS
H <sub>2</sub> O	900	875
Sobrenadante biopelícula	---	25
Reactivo Nessler	100	100
Volumen total	1000	1000

Posterior a la preparación de las reacciones, se continuó con el siguiente protocolo:

- Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 395 nm.
- Para obtener los mM de NH<sub>4</sub> producidos, se utilizó la ecuación obtenida de la curva de calibración de amonio (Tabla N° 3).

#### **Expresión de la Actividad Enzimática de las muestras.**

Luego de obtener los valores de amonio liberado (mM), estos son expresados en base a la cantidad de proteínas totales presentes (mg/ml) en las respectivas muestras. Expresando la actividad enzimática como mM/mg/ml, ordenadas del 1 al 10 aquellas muestras que pertenecen al grupo de bajo COPD, y del 11 al 20 aquellas que pertenecen al grupo de alto COPD, tanto para saliva como para biopelícula.

**4- Establecer si existen diferencias en la producción de amonio de los sistemas U y ADS desde saliva y biopelícula dental, entre sujetos con bajo COPD y alto COPD, a través de la metodología propuesta.**

Estas diferencias se establecieron a través del análisis de los resultados obtenidos en pacientes con bajo y alto COPD. Los datos obtenidos fueron sometidos al test estadístico Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución y luego al test de Mann Whitney para establecer la significancia de las diferencias encontradas.

**Consideraciones éticas y de bioseguridad.**

El presente trabajo de investigación pertenece al proyecto de investigación en odontología (PRI-ODO), denominado “*Producción de Alkali a través de enzimas presentes en la cavidad oral y su rol en el control de la enfermedad de caries dental*”. Este proyecto de investigación se encuentra presentado y en etapa de revisión en la dirección de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y sus respectivos comités.

Cabe señalar que este paso es obligatorio para todos los trabajos presentados a partir del año 2012.

## **RESULTADOS.**

### **Obtención y conservación de muestras.**

El procedimiento de toma, recolección y conservación de muestras a través de la congelación propuesta y posterior descongelación, permitió la utilización del total de muestras tomadas, sin sufrir pérdidas de estas, logrando las mediciones de actividad enzimática necesarias del total muestreado (20 muestras de biopelícula y 20 muestras de saliva).

### **1- Cuantificación de la concentración de proteínas totales en saliva y biopelícula dental.**

#### **Curva de calibración de proteínas.**

Esta curva se construyó en base a los valores obtenidos de las reacciones expresadas en la Tabla N° 1, con lo cual se obtienen los valores de absorbancias según concentración de proteínas. Datos mostrados en la Tabla N° 12.

**Tabla N° 12. Valores de concentración proteínas y absorbancias respectivas.**

<b>Estándar</b>	<b>Concentración Proteína (BSA) mg/ml</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>Estándar01</b>	0,200	0,065
<b>Estándar02</b>	0,800	0,221
<b>Estándar03</b>	1,400	0,285
<b>Estándar04</b>	2,000	0,322



Se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos, esto permitió la confección de una curva de calibración (Figura N° 1).

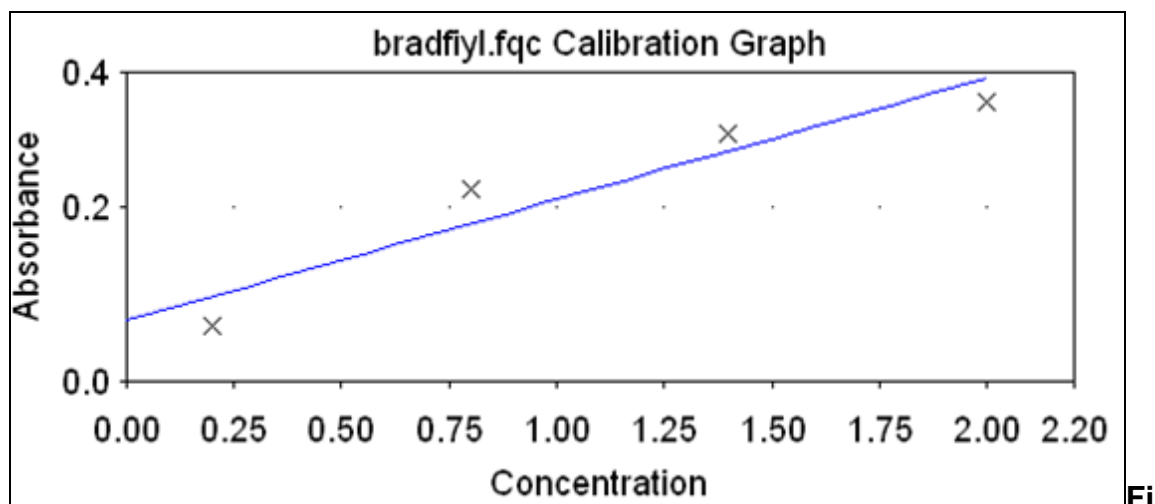


Figura N° 1. Curva calibración de proteína totales, Absorbancia versus concentración (mg/ml).

Datos de la curva.

Ecuación 1:  $A = 0,1388 \times \text{Conc} + 0,0705$

Coefficiente correlación (r): 0,902

### Concentración de proteínas totales en saliva y biopelícula dental.

Estos resultados se obtuvieron en base a las reacciones señaladas en la Tabla N° 2, y el protocolo ahí señalado. La concentración de proteínas totales se calculó utilizando la curva de calibración de proteínas (Figura N° 1).

Los resultados fueron ordenados del 1 al 20, siendo del 1 al 10 aquellas muestras pertenecientes a los sujetos del grupo de bajo COPD, y del 11 al 20 aquellas muestras pertenecientes a los sujetos de alto COPD (Tabla N° 13).

**Tabla N° 13. Concentración de proteínas totales en muestras de saliva y biopelícula dental de sujetos con bajo y alto COPD.**

<b>COPD</b>	<b>Muestra</b>	<b>*[Proteínas] Saliva</b>	<b>*[Proteínas] Biopelícula</b>
<b>Bajo</b>	<b>1</b>	0,185	0,185
<b>Bajo</b>	<b>2</b>	0,596	0,072
<b>Bajo</b>	<b>3</b>	1.438	0,022
<b>Bajo</b>	<b>4</b>	0,211	0,596
<b>Bajo</b>	<b>5</b>	1,129	1,138
<b>Bajo</b>	<b>6</b>	0,719	0,811
<b>Bajo</b>	<b>7</b>	1,616	0,719
<b>Bajo</b>	<b>8</b>	1,176	0,072
<b>Bajo</b>	<b>9</b>	0,692	1,043
<b>Bajo</b>	<b>10</b>	0,790	0,79
<b>Alto</b>	<b>11</b>	2,016	1,578
<b>Alto</b>	<b>12</b>	0,79	1,95
<b>Alto</b>	<b>13</b>	1,924	1,54
<b>Alto</b>	<b>14</b>	1,732	1,732
<b>Alto</b>	<b>15</b>	1,743	1,271
<b>Alto</b>	<b>16</b>	1,954	1,281
<b>Alto</b>	<b>17</b>	1,052	1,142
<b>Alto</b>	<b>18</b>	1,792	1,176
<b>Alto</b>	<b>19</b>	2,044	1,792
<b>Alto</b>	<b>20</b>	1,662	1,954

**\*[Concentración de proteínas totales mg/ml]**

## Medición de la producción de amonio .

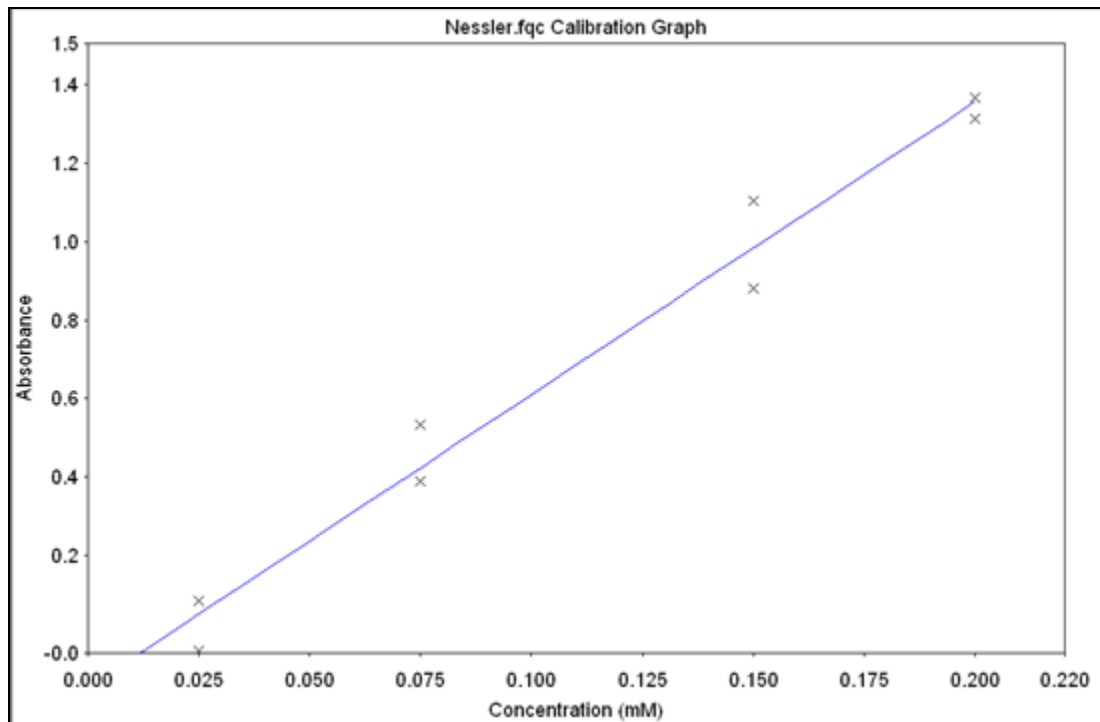
### Curva de calibración de amonio.

Esta curva se construyó en base a los valores obtenidos de la reacciones expresadas en la Tabla N° 3, con lo cual se obtienen los valores de absorbancias según concentración de amonio (Tabla N° 14).

**Tabla N° 14. Valores de concentración de amonio y absorbancias respectivas.**

<b>Estándar</b>	<b>Concentración Amonio (mM)</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>Estándar 1</b>	0,025	1	-0,040
		2	0,085
		Promedio	0,022
<b>Estándar 2</b>	0,075	1	0,389
		2	0,533
		Promedio	0,461
<b>Estándar 3</b>	0,150	1	0,880
		2	1,104
		Promedio	0,992
<b>Estándar 4</b>	0,200	1	1,365
		2	1,312
		Promedio	1,339

Se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos, lo que permitió la confección de una curva de calibración de amonio (Figura N° 2).



**Figura N° 2. Curva calibración de amonio, absorbancia versus concentración de amonio (mM).**

**Datos de la curva:**

**Ecuación 2:  $A = 7,4526 \times \text{Conc} - 0,1349$**

**Coefficiente correlación (r): 0,976**

## **2- Medición de la producción de amonio desde ureasa en saliva y biopelícula dental.**

Estos resultados se obtuvieron en base a las reacciones señaladas en la Tabla N° 4 para saliva y Tabla N° 5 para biopelícula con su respectivo protocolo. La medición del amonio generado por estas reacciones, fue medido a través de la reacción mostrada en la Tabla N° 6 para saliva y Tabla N° 7 para biopelícula, y

su posterior lectura en el espectrofotómetro utilizando la curva de calibración de amonio (Figura N° 2).

Los valores de absorbancia y concentración de cada muestra, fueron ordenados del 1 al 20, siendo del 1 al 10 aquellas muestras pertenecientes a sujetos del grupo de bajo COPD, y del 11 al 20 aquellas muestras pertenecientes a sujetos de alto COPD (Tabla N° 15).

**Tabla N° 15. Valores de absorbancia y concentración de amonio por actividad de ureasa para muestras de saliva y biopelícula dental.**

<b>COPD</b>	<b>Muestra</b>	<b>*A (saliva)</b>	<b>+C (saliva)</b>	<b>*A (biopelícula)</b>	<b>+C (biopelícula)</b>
<b>Bajo</b>	<b>1</b>	0,503	0,086	0,853	0,133
<b>Bajo</b>	<b>2</b>	1,308	0,194	1,711	0,248
<b>Bajo</b>	<b>3</b>	0,340	0,064	0,540	0,091
<b>Bajo</b>	<b>4</b>	0,447	0,078	0,646	0,105
<b>Bajo</b>	<b>5</b>	0,624	0,102	0,752	0,119
<b>Bajo</b>	<b>6</b>	0,382	0,069	0,436	0,077
<b>Bajo</b>	<b>7</b>	0,506	0,086	0,447	0,078
<b>Bajo</b>	<b>8</b>	0,327	0,062	0,522	0,088
<b>Bajo</b>	<b>9</b>	0,693	0,111	1,035	0,157
<b>Bajo</b>	<b>10</b>	0,120	0,034	0,082	0,029
<b>Alto</b>	<b>11</b>	0,009	0,019	0,004	0,019
<b>Alto</b>	<b>12</b>	0,007	0,019	0,040	0,023
<b>Alto</b>	<b>13</b>	0,264	0,054	0,188	0,043
<b>Alto</b>	<b>14</b>	0,119	0,034	0,036	0,023
<b>Alto</b>	<b>15</b>	0,465	0,081	0,157	0,039
<b>Alto</b>	<b>16</b>	0,059	0,026	0,057	0,026
<b>Alto</b>	<b>17</b>	0,091	0,030	0,090	0,030
<b>Alto</b>	<b>18</b>	0,265	0,054	0,082	0,029
<b>Alto</b>	<b>19</b>	0,058	0,026	0,035	0,023
<b>Alto</b>	<b>20</b>	0,269	0,054	0,328	0,062

[Absorbancia \*(A), mM de amonio +(C)]

### **3- Medición de la producción de amonio desde arginina deiminasa en saliva y biopelícula dental.**

Estos resultados se obtuvieron en base a las reacciones señaladas en la Tabla N° 8 para saliva y Tabla N° 9 para biopelícula, con su respectivo protocolo. La medición del amonio generado por estas reacciones, fue medido a través de la reacción mostrada en la Tabla N° 10 para saliva y Tabla N° 11 para biopelícula, y su posterior lectura en el espectrofotómetro utilizando la curva de calibración de amonio (Figura N° 2).

Los valores de absorbancia y concentración de cada muestra, fueron ordenados del 1 al 20, siendo del 1 al 10 aquellas muestras pertenecientes a los sujetos del grupo de bajo COPD, y del 11 al 20 aquellas muestras pertenecientes a los sujetos de alto COPD (Tabla N° 16).

**Tabla N° 16. Valores de absorbancia y concentración de amonio por actividad de arginina deiminasa para muestras de saliva y biopelícula dental.**

COPD	Muestra	*A (saliva)	+C (saliva)	*A (biopelícula)	+C (biopelícula)
Bajo	1	0,541	0,091	0,384	0,070
Bajo	2	0,532	0,090	0,275	0,055
Bajo	3	0,510	0,087	0,479	0,082
Bajo	4	0,575	0,095	0,426	0,075
Bajo	5	0,514	0,087	0,743	0,118
Bajo	6	0,455	0,079	0,421	0,075
Bajo	7	0,316	0,060	0,268	0,054
Bajo	8	0,482	0,083	0,296	0,058
Bajo	9	0,366	0,067	0,405	0,073
Bajo	10	0,812	0,127	0,238	0,050
Alto	11	0,191	0,044	0,271	0,055
Alto	12	0,185	0,043	0,174	0,042
Alto	13	0,497	0,085	0,416	0,074
Alto	14	0,319	0,061	0,178	0,042
Alto	15	0,255	0,052	0,379	0,069
Alto	16	0,303	0,059	0,205	0,046
Alto	17	0,438	0,077	0,124	0,035
Alto	18	0,325	0,062	0,238	0,050
Alto	19	0,247	0,051	0,154	0,039
Alto	20	0,208	0,046	0,271	0,054

**[Absorbancia \*(A), mM de amonio +(C)]**

### **Expresión de la Actividad Enzimática de ureasa en las muestras.**

Los valores de amonio liberado (mM) desde U en saliva y biopelícula (Tabla N° 15), y desde ADS en saliva y biopelícula (Tabla N° 16), son expresados en base a la concentración de proteínas totales presentes (mg/ml) en cada una de muestras (Tabla N° 13).

La actividad enzimática de ureasa será expresada como mM/mg/ml, ordenadas del 1 al 10 aquellas muestras que pertenecen al grupo de bajo COPD, y del 11 al 20 aquellas que pertenecen al grupo de alto COPD, tanto para saliva como para

biopelícula (Tabla N° 17). El mismo orden se realizara para la actividad enzimática de arginina deiminasa (Tabla N° 18)

**Tabla N° 17.** Actividad enzimática de ureasa en muestras de saliva y biopelícula, de bajo y alto COPD.

<b>COPD</b>	<b>Muestra</b>	<b>Saliva *Act. Enzimática (mM/mg/ml)</b>	<b>Biopelícula *Act. Enzimática (mM/mg/ml)</b>
<b>Bajo</b>	<b>1</b>	0,465	0,719
<b>Bajo</b>	<b>2</b>	0,18	3,444
<b>Bajo</b>	<b>3</b>	0,043	4,136
<b>Bajo</b>	<b>4</b>	0,09	0,176
<b>Bajo</b>	<b>5</b>	0,072	0,105
<b>Bajo</b>	<b>6</b>	0,056	0,095
<b>Bajo</b>	<b>7</b>	0,120	0,095
<b>Bajo</b>	<b>8</b>	0,066	1,222
<b>Bajo</b>	<b>9</b>	0,078	0,151
<b>Bajo</b>	<b>10</b>	0,043	0,037
<b>Alto</b>	<b>11</b>	0,017	0,012
<b>Alto</b>	<b>12</b>	0,043	0,012
<b>Alto</b>	<b>13</b>	0,036	0,028
<b>Alto</b>	<b>14</b>	0,047	0,013
<b>Alto</b>	<b>15</b>	0,015	0,031
<b>Alto</b>	<b>16</b>	0,013	0,02
<b>Alto</b>	<b>17</b>	0,04	0,026
<b>Alto</b>	<b>18</b>	0,015	0,025
<b>Alto</b>	<b>19</b>	0,026	0,013
<b>Alto</b>	<b>20</b>	0,032	0,032

[\*(Act. Enzimática) Actividad Enzimática mM de amonio/ mg/ml de proteínas]



**Tabla Nº 18.** Actividad enzimática de arginina deiminasa en muestras de saliva y biopelícula de bajo y alto COPD.

<b>COPD</b>	<b>Muestra</b>	<b>Saliva *Act. Enzimática (mM/mg/ml)</b>	<b>Biopelícula *Act. Enzimática (mM/mg/ml)</b>
<b>Bajo</b>	<b>1</b>	0,492	0,378
<b>Bajo</b>	<b>2</b>	0,112	0,764
<b>Bajo</b>	<b>3</b>	0,058	3,727
<b>Bajo</b>	<b>4</b>	0,204	0,126
<b>Bajo</b>	<b>5</b>	0,046	0,104
<b>Bajo</b>	<b>6</b>	0,042	0,092
<b>Bajo</b>	<b>7</b>	0,056	0,075
<b>Bajo</b>	<b>8</b>	0,081	0,806
<b>Bajo</b>	<b>9</b>	0,123	0,07
<b>Bajo</b>	<b>10</b>	0,077	0,063
<b>Alto</b>	<b>11</b>	0,063	0,035
<b>Alto</b>	<b>12</b>	0,077	0,022
<b>Alto</b>	<b>13</b>	0,041	0,048
<b>Alto</b>	<b>14</b>	0,05	0,024
<b>Alto</b>	<b>15</b>	0,034	0,054
<b>Alto</b>	<b>16</b>	0,026	0,036
<b>Alto</b>	<b>17</b>	0,066	0,031
<b>Alto</b>	<b>18</b>	0,033	0,043
<b>Alto</b>	<b>19</b>	0,023	0,022
<b>Alto</b>	<b>20</b>	0,037	0,028

[(Act. Enzimática) Actividad Enzimática mM de amonio/ mg/ml de proteínas]

**4- Diferencias en la producción de amonio de los sistemas U y ADS desde saliva y biopelícula dental, entre sujetos con bajo COPD y alto COPD, a través de la metodología propuesta.**

Mediante el test estadístico Shapiro-Wilk, se determinó que los grupos de bajo COPD no poseen distribución normal, por lo que se utilizó estadística no paramétrica, usando el test de Mann Whitney, para el análisis de los resultados.

Al comparar la actividad enzimática entre las muestras de sujetos con bajo y alto COPD, encontramos que la actividad de la ureasa es mayor en saliva ( $p=0,000$ ) y en la biopelícula ( $p=0,000$ ) en el grupo de bajo COPD. Lo mismo sucedió con la actividad de arginina deiminasa, mostrando una mayor actividad en saliva ( $p=0,007$ ) y en la biopelícula ( $p=0.007$ ) en el grupo con bajo COPD.

Todas las diferencias encontradas a favor de una mayor actividad enzimática en el grupo de bajo COPD, fueron estadísticamente significativas (Tabla N° 19).

**Tabla N° 19. Análisis estadístico de la actividad enzimática de ureasa y arginina deiminasa, en muestras de saliva y biopelícula con bajo y alto COPD.**

	<b>Bajo COPD</b>	<b>Alto COPD</b>	<b>valor p</b>
<b>Saliva Ureasa</b>			0,000
Promedio	0,121	0,028	
Mediana	0,075	0,029	
SD	0,128	0,013	
<b>Saliva ADS</b>			0,007
Promedio	0,129	0,045	
Mediana	0,079	0,039	
SD	0,136	0,018	
<b>Biopelícula Ureasa</b>			0,000
Promedio	1,018	0,021	
Mediana	0,164	0,023	
SD	1,517	0,008	
<b>Biopelícula ADS</b>			0,000
Promedio	0,621	0,034	
Mediana	0,115	0,033	
SD	1,129	0,011	

Los promedios de la actividad enzimática de U y ADS mostradas en la Tabla N° 19 en sujetos con bajo y alto COPD, son presentados de forma gráfica a través de las Figuras N° 3 y N° 4, para la mayor comprensión de las diferencias encontradas entre estos grupos en estudio.

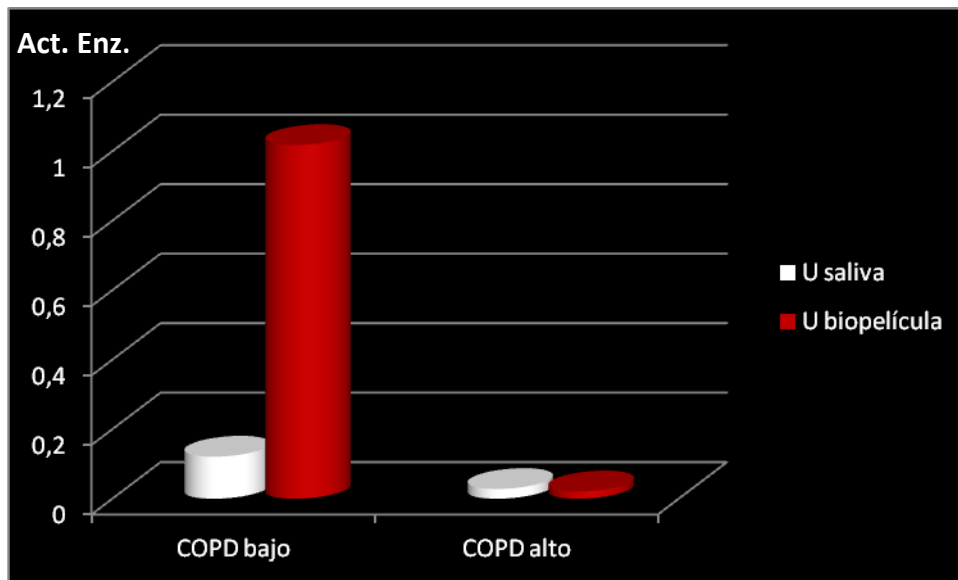


Figura N° 3. Comparación de la actividad enzimática (Act. Enz. mM/mg/ml) de ureasa (U), en saliva y biopelícula, en grupos de bajo y alto COPD.

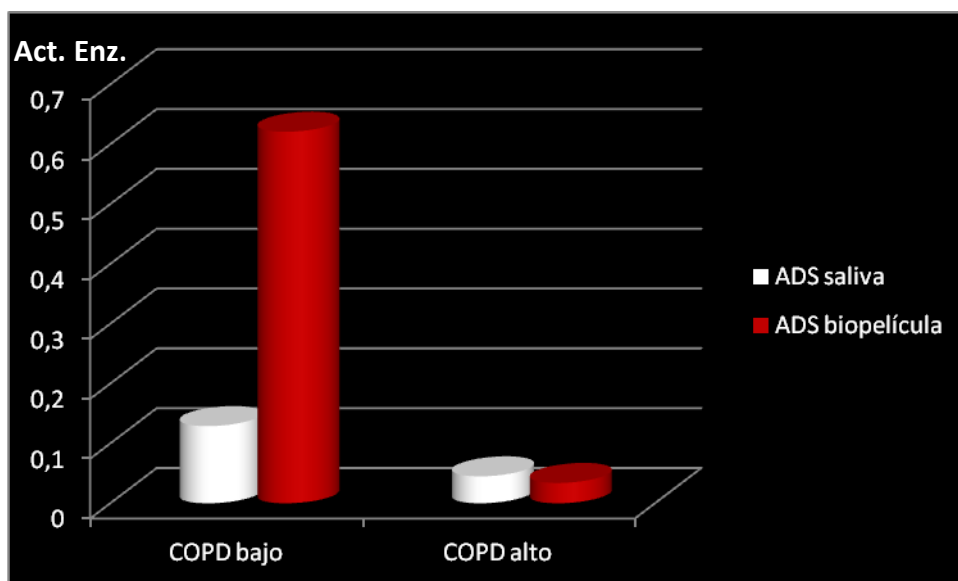


Figura N° 4. Comparación de la actividad enzimática (Act. Enz. mM/mg/ml) de arginina deiminasa (ADS), en saliva y biopelícula, en grupos de bajo y alto COPD.

## **DISCUSIÓN.**

La liberación de amonio abre un campo a la homeostasis del organismo en defensa de mecanismos que generan injurias en todo nivel, como lo que ocurre en la cavidad oral y la producción ácida por parte de una microbiota patógena. La capacidad alcalina intrínseca del sistema bucal, a través de sistemas enzimáticos acá estudiados, apuesta a una nueva línea de prevención en Odontología.

En el presente estudio las comparaciones entre grupos respecto a la liberación de amonio desde distintos sistemas enzimáticos, entregó resultados que nos inclinan a avalar el rol protector que pudiesen tener estos sistemas.

En saliva y biopelícula, el grupo de bajo COPD posee mayor actividad enzimática de ureasa como de arginina deiminasa, dando como resultado una mayor liberación de amonio en este grupo respecto al grupo con alto COPD.

En saliva la actividad enzimática de ureasa, fue 4,3 veces mayor en el grupo de bajo COPD respecto al grupo de alto COPD, presentando diferencias significativas. En otros estudios clínicos, se encontraron diferencias a favor del grupo libre de caries pero estas no fueron estadísticamente significativas.<sup>11,47</sup>

La actividad enzimática de ADS, tuvo una liberación promedio, en el grupo de bajo COPD, 2,8 veces mayor que el grupo de alto CODP, también siendo esta diferencia significativa, similar a lo encontrado en los estudios de Nascimento 2009 y Gordan 2010 donde también fueron encontradas diferencias significativas en ambos grupos, siendo la liberación de amonio 5 veces más alta en el grupo libre de caries al compararlo con el de caries activas.<sup>11,47</sup>

En la biopelícula, la actividad enzimática de ureasa en el grupo de bajo COPD fue 40 veces más alta que en el grupo con alto COPD, existiendo diferencias significativas entre estos dos grupos. En estudios similares también se encontró una diferencia significativa, pero la diferencia fue menor entre los grupos.<sup>11,47</sup>

Respecto a la liberación de amonio desde ureasa en biopelícula, Nascimento (2009), encontró 2,7 veces más liberación en el grupo libre de caries, y Gordan (2010), 3,2 veces más en el mismo grupo.<sup>11,47</sup> Esta diferencia podría ser atribuida a una gran polarización de los grupos muestrales perseguida en este estudio.

En el sistema ADS en biopelícula la diferencia entre ambos grupos fue 18 veces más alta en el grupo de bajo COPD, siendo significativa. En lo encontrado por Nascimento (2009), sí se observó valores más altos en grupos libres de caries pero su diferencia no fue estadísticamente significativa, mientras que en el estudio de Gordan (2010), la diferencia fue 3 veces más alto en el grupo libre de caries y sus diferencias fueron estadísticamente significativas.<sup>11,47</sup>

En saliva, los sistemas enzimáticos ureasa y ADS, en sujetos de bajo COPD, generan una actividad enzimática similar, siendo levemente superior para el sistema ADS. Mientras que en la biopelícula el sistema ureasa posee una notable mayor actividad en la producción de amonio al compararlo con el sistema ADS en sujetos de bajo COPD.

Si se compara la actividad enzimática en sujetos de bajo COPD, la biopelícula dental es donde se genera la mayor actividad. Esto es compatible con lo encontrado en otro estudio, donde la actividad ureasa en la biopelícula dental de

los individuos con bajo COPD eran más altos que en las muestras de saliva del mismo individuo.<sup>38</sup>

El presente estudio establece una relación intensa entre la nula historia de caries y la protección del amonio como agente alcalinizador endógeno.

La producción de amonio a través de los sustratos de arginina y urea por determinados sistemas enzimáticos, podría tener un fuerte impacto en la microbiota que se establece en la cavidad oral. Estos factores son perfectamente asociables si existe una microbiota compatible con salud en sujetos de bajo COPD y existe una liberación de amonio mayor en estos mismos sujetos. Pueden estos complejos enzimáticos ser parte de este tipo de microbiota, que a la vez genera alcalinización, estimulando el establecimiento de más microbiota de este tipo, afines a alcalinidad y generando una inhibición de una microbiota más patógena acostumbrada a un medio ácido.<sup>20</sup>

En cuanto a la microbiota patógena y específicamente *S. mutans*, un atributo de virulencia clave, lo genera su capacidad de proliferar y seguir produciendo ácido en ambientes de bajo pH, pero es relativamente débil al competir *in vitro* con organismos asociados a una microbiota sana con potenciales de hidrógeno neutros<sup>56</sup>. Por otro lado, pHs elevados pueden ser asociados a la actividad aumentada de ureasa y ADS, esto generaría una inhibición inespecífica contra las especies acidúricas como el *S. mutans*.<sup>20</sup>

Los individuos que tienen bajos niveles de ureasa, poseen una reducida capacidad para neutralizar la acidificación glicolítica, aún cuando estén provisto de una gran cantidad de urea.<sup>58</sup> Así se demostró en el presente estudio, en el cual frente a la misma cantidad de sustrato agregada, existían muestras que generaban diferentes concentraciones de amonio, explicado por la distinta

actividad enzimática que poseían estos individuos. Es posible que individuos con bajos niveles de actividad de ureasa en realidad puedan tener una reducida presencia de bacterias portadoras de ureasa,<sup>47</sup> pero esto es un tema interesante de abordar e incluir en futuros estudios en esta misma línea, ampliándose no solo a la medición de la liberación de amonio, sino también a la detección de ciertos tipos de bacterias productoras de ureasa y arginina deiminasa.

Otra variable importante en el impacto de la actividad de estas enzimas es el entorno oral. El pH ambiental afecta la actividad enzimática, estudios han mostrado que niveles de pH bajo 4 pueden inactivar la ureasa.<sup>61,62</sup> También se debe considerar que la actividad metabólica de ureasa y de arginina deiminasa, son sensibles a las características del medio oral donde se encuentran y los resultados pueden variar aún dentro de la misma especie bacteriana.<sup>11</sup>

La metodología presentada en este trabajo permite un manejo estricto pero factible y adecuado tanto de la saliva como de la biopelícula, teniendo siempre en consideración la labilidad de los sistemas enzimáticos que estamos midiendo.

Las diferencias que presenta la metodología establecida en este estudio con otras para el mismo fin, son menores. Una de estas diferencias la encontramos en la conservación de las muestras. Estudios como el de Nascimento (2009),<sup>11</sup> previo al congelamiento de las muestras realizaron un proceso de inmersión en baño de etanol-dióxido de carbono. Ahora bien, en nuestra metodología eso fue reemplazado por un manejo en cadena de frío de 4° C desde la toma de la muestra (que dura aproximadamente dos a tres horas), hasta su congelamiento en -80 °C, donde se mantiene hasta el momento de su procesamiento. La



descongelación se hace traspasando las muestras a una temperatura de 4°C. Este procedimiento no generó pérdidas de muestras, por lo que se puede considerar simplificado y exitoso para su fin.

En la estandarización de la curva de calibración de amonio, se obtuvo una curva con una adecuada pendiente, permitiendo la discriminación en la medición de concentraciones de amonio que generó cada muestra. La ecuación de la curva con un coeficiente de correlación de 0,976 es adecuado para mediciones cuantitativas. La realización de esta curva es el paso previo obligado para realizar las mediciones posteriores de amonio desde las muestras, lamentablemente las publicaciones sobre mediciones de amonio no revelan este paso,<sup>11,20,45,47</sup> debido a la necesidad de la simplificación de datos a publicar, además las publicaciones sobre metodología propiamente tal no se han encontrado, por ello la comparación con curvas utilizadas para el mismo fin no es posible de realizar. Esto lleva a que la elección de la curva es en base a las características de ésta, principalmente su coeficiente de correlación.

La preparación de la curva de calibración de proteínas totales tuvo un proceso más laborioso, esto debido a la sensibilidad del reactivo de Bradford a cualquier tipo de proteína que pudiese contaminar la medición, por lo que su manipulación debió ser extremadamente rigurosa. La comparación con curvas confeccionadas en otros estudios no es posible de realizar por los mismos motivos antes expuestos con respecto a la curva de amonio, por ello su selección es en base a las características de la ecuación de la curva, que generó un coeficiente de correlación de 0,902, adecuado para su posterior uso en la medición de proteínas totales de las muestras.

En la manipulación de las muestras para la medición de proteínas totales en el estudio de Nascimento (2009)<sup>11</sup> y Gordan (2010),<sup>47</sup> las muestras fueron mezcladas con un aditivo denominado glass bead, cuya finalidad es la mayor dispersión de la muestra. Este paso no fue realizado en nuestra metodología, ya que nos basamos en la sonificación para obtener la dispersión de la muestra. Los valores de proteínas netos, encontrados por muestra no son mostrados en los estudios publicados, solo expresan el valor total del amonio en base a la cantidad de proteínas, por lo que solo contamos con estos para determinar si nuestra metodología se acerca a los valores por ellos obtenidos.

En el presente trabajo los valores de actividad enzimática en todos los grupo son en promedio levemente más bajos, que los encontrados en estudios similares<sup>11,47</sup>, esto podría deberse a los altos valores de proteínas totales medidos con nuestra metodología.

Podemos señalar que el objetivo principal del presente trabajo, fue cumplido a cabalidad, presentando una metodología abordable y reproducible, facilitando futuras investigaciones en esta línea. Los reactivos utilizados poseen un costo no menor, por lo que fue prudente generar y manejar una buena metodología para su utilización adecuada en estudios venideros. Además, se pudo corroborar que los equipos y el instrumental con los que cuenta la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, son adecuados y permiten la implementación de la metodología presentada.

Todos los esfuerzos acá invertidos van encaminados en abrir paso a una novedosa línea preventiva y de conocimiento de la enfermedad más común en la población mundial que es la caries dental, a través de una herramienta poderosa

y poco difundida como lo es la alcalinización generada por los sistemas ureasa y ADS.

## **Conclusiones.**

La metodología presentada permite la medición de la actividad específica enzimática de Ureasa y ADS en saliva y biopelícula dental.

Las muestras analizadas, establecen una diferencia estadísticamente significativa en la liberación de amonio entre sujetos de bajo COPD y alto COPD siendo mayor en el primero, tanto en saliva como en placa dental.

En saliva los sistemas enzimáticos ADS y ureasa en sujetos de bajo COPD, generan una liberación similar de amonio, siendo levemente mayor el primero.

En biopelícula, los sujetos con bajo COPD generan una mayor producción de amonio a través del sistema enzimático ureasa.

## **Sugerencias.**

Para futuros estudios en la línea de la producción de amonio a través de los sistemas enzimáticos Ureasa y ADS, se podría realizar la comparación de tres grupos, sin experiencia de caries, con experiencia pasada de caries y con presencia de caries activas.

Además, sería provechoso ampliar el campo de acción hacia el estudio bacteriano asociado a esta actividad enzimática y comprender de forma más completa la naturaleza bioquímica de estos sistemas, sus influencias e interacciones con otros sistemas enzimáticos y microorganismos presentes en la cavidad oral.

Es necesario tener presente en cada paso la labilidad de los sistemas que estamos manejando, y ser rigurosos en los criterios de inclusión y exclusión para que la generación de la muestra sea válida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. Bull World Health Organ. 2005; 83 (9) 661-669.
2. II Encuesta de calidad de vida y salud Chile 2006, Subsecretaría de salud pública, división de planificación sanitaria, Departamento de Epidemiología, Unidad de Estudios y Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles. Ministerio de Salud, Chile.
3. Petersen PE. Continuous improvement of oral health in the 21st century-the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol. 2003; 31 (suppl 1): 3-23.
4. Beltrán-Aguilar ED, Barker LK, Canto MT, Dye BA, Gooch BF, Griffin SO et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism, and enamel fluorosis-United States, 1988-1994 and 1999-2002. MMWR Surveill Summ 2005; 54(3): 1-43.
5. US Department of Health and Human Services. Oral health in America: a report of the surgeon general. Rockville: US Department of Health and Human Service, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health; 2000.
6. MINSAL, Ceballos M, Acevedo C y col. Diagnóstico en Salud Bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar. Región Metropolitana 2007.
7. MINSAL, Soto L, Tapia R y col. Diagnóstico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años. Chile, 2007.

8. Soto L, Tapia R y col. Chile, 2007. Diagnóstico Nacional de Salud Bucal del Adolescente de 12 años y Evaluación del Grado de Cumplimiento de los Objetivos Sanitarios de Salud Bucal 2000-2010.
9. Badenier O, Cueto A, Moya R y cols. Estudio de Prevalencia de las enfermedades bucodentales y necesidades de tratamiento en la V Región. Chile 2007.
10. Gamonal J. Prevalencia de enfermedades periodontales y de caries dental en la población de 35-44 y de 65 a 74 años de nivel socioeconómico bajo y medio-bajo de la provincia de Santiago, Región Metropolitana, y determinación de los recursos humanos necesarios para su tratamiento. Región Metropolitana 1996. MSc Tesis, Facultad Odontología, Universidad de Chile.
11. Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(2): 89-95.
12. Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res* 1998; 32(6): 456-462.
13. Burne RA. Oral streptococci: products of their environment. *J Dent Res* 1998; 77(3): 445-452.
14. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; 8(2): 263-271.
15. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE y cols. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008; 46(4): 1407-1417.
16. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG y cols. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 1001-1009.

17. Bowden GH. Possibilities for modifying the caries attack by altering the oral microflora. J Can Dent Assoc 1984; 50(2): 169-172.
18. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T y cols. Microbial risk indicators of early childhood caries. J Clin Microbiol 2005; 43(11): 5753-5759.
19. Van Houte J, Lopman J, Kent R. The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces. J Dent Res 1994; 73(11): 1727-1734.
20. Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol Lett 2000; 193(1): 1-6.
21. Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities. J Dent Res 1989; 68(9): 1298-1302.
22. Dennis DA, Gawronski TH, Sudo SZ, Harris RS, Folke LA: Variations in microbial and biochemical components of four-day plaque during a four-week controlled diet period. J Dent Res 1975; 54(4): 716-722.
23. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. J Am Dent Assoc 2000; 131(7): 887-899.
24. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986; 50(4): 353-380.
25. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. J Ind Microbiol 1995; 15(3): 169-175.
26. Stephan RM. Changes in hydrogenion concentration on tooth surfaces and in carious lesions. J Am Dent Assoc 1940; 27(5): 718-723.



27. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13(2): 108-125.
28. Van Wuyckhuysse BC, Perinpananayam HER, Bevacqua D, Raubertas RF, Billings RJ, Bowen WH y cols. Associations of free arginina and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. J Dent Res 1995; 74(7): 686-690.
29. Kleinberg, I., Jenkins, G.N., Chatterjee, R., Wijeyeweera, L. The antimony pH electrode and its role in the assessment and interpretation of dental plaque pH. J. Dent. Res 1982; 61(10): 1139–1147.
30. Dibdin GH, Dawes C. A mathematical model of the influence of salivary urea on the pH of fasted dental plaque and on the changes occurring during a cariogenic challenge. Caries Res 1998; 32(1): 70-74.
31. Clancy KA, Pearson S, Bowen WH, Burne RA. Characterization of recombinant, ureolytic *Streptococcus mutans* demonstrates an inverse relationship between dental plaque ureolytic capacity and cariogenicity. Infect Immun 2000; 68(5): 2621-2629.
32. Imfeld TN, Birkhed D, Lingstrom P. Effect of urea in sugar-free chewing gums on pH recovery in human dental plaque evaluated with three different methods. Caries Res 1995; 29(3): 172–180.
33. Kleinberg I. Effect of urea concentration on human plaque pH levels in situ. Arch Oral Biol 1967; 12(12): 1475-1484.
34. Kleinberg I. Prevention and dental caries. J Prev Dent 1978; 5(3): 9-17.

35. Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC. Composition and buffer capacity of pooled starved plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res* 1988; 67(12): 1476-1482.
36. Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC. Composition of pooled resting plaque fluid from cariesfree and caries-susceptible individuals. *J Dent Res* 1988; 67(12): 1468-1475.
37. Shu M, Browgardt CM, Chen YY, Burne RA. Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. *Infect Immun* 2003; 71(12): 7188–7192.
38. Sissons CH, Cutress TW. PH changes during simultaneous metabolism of urea and carbohydrate by human salivary bacteria in vitro. *Arch Oral Biol* 1988; 33(8): 579-587.
39. Turtola LO, Luoma H. Plaque pH in caries-active and inactive subjects modified by sucrose and fluoride, with and without bicarbonate-phosphate. *Scand J Dent Res* 1972; 80(4): 334-343.
40. Dawes C, Dibdin GH. Salivary concentrations of urea released from a chewing gum containing urea and how these affect the urea content of gel-stabilized plaques and their pH after exposure to sucrose. *Caries Res* 2001; 35(5): 344-353.
41. Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC. Composition and buffer capacity of pooled starved plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res* 1988; 67(12): 1476-1482.
42. Peterson S, Woodhead J, Crall J. Caries resistance in children with chronic renal failure: plaque pH, salivary pH, and salivary composition. *Pediatr Res* 1985; 19(8): 796-799.

43. Shu M, Morou-Bermudez E, Suarez-Perez E, Rivera-Miranda C, Browngardt CM, Chen YY y cols. The relationship between dental caries status and dental plaque urease activity. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22(1): 61-66.
44. Kleinberg I. Effect of urea concentrations on plaque pH in vivo. *J Dent Res* 1961; 40(4): 751-752.
45. Sissons CH, Hancock EM, Cutress TW. The source of variation in ureolysis in artificial plaques cultured from human salivary bacteria. *Arch Oral Biol* 1988; 33(10): 721-726.
46. Sissons CH, Hancock EM, Perinpanayagam HE, Cutress TW. The bacteria responsible for ureolysis in artificial dental plaque. *Arch Oral Biol* 1988; 33(10): 727-733.
47. Gordan VV, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D y cols. Could alkali production be considered an approach for caries control? *Caries Res* 2010; 44(6): 547-554.
48. Shannon IL, Feller RP, Eknoyan G, Suddick RP. Human parotid saliva urea in renal failure and during dialysis. *Arch Oral Biol* 1977; 22(2): 83-86.
49. Epstein SR, Mandel I, Scoop IW: Salivary composition and calculus formation in patients undergoing hemodialysis. *J Periodontol* 1980; 51(6):336-338.
50. Al-Nowaiser A, Roberts GJ, Trompeter RS, Wilson M, Lucas VS. Oral health in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 2003; 18(1): 39-45.
51. Ertugrul F, Elbek-Cubukcu C, Sabah E, Mir S. The oral health status of children undergoing hemodialysis treatment. *Turk J Pediatr* 2003; 45(2):108-113.
52. Sirrakou M. Plaque pH and plaque organic acid production in end-stage renal dialysis patients on hemodialysis. Rochester: University of Rochester Press; 1994. MSc thesis.

53. Peterson S, Woodhead J, Crall J. Caries resistance in children with chronic renal failure: plaque pH, salivary pH, and salivary composition. *Pediatr Res* 1985; 19(8): 796-799.
54. Golub LM, Borden SM, Kleinberg I. Urea content of the gingival crevicular fluid and its relationship to periodontal disease in humans. *J Periodontal Res* 1971; 6(4): 243-251.
55. Kopstein J, Wong OM. The origin and fate of salivary urea and ammonia in man. *Clin Sci Mol Med* 1977; 52(1): 9-17.
56. Clancy KA, Burne RA. Construction and characterization of a recombinant ureolytic *Streptococcus mutans* and its use to demonstrate the relationship of urease activity to pH modulating capacity. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 151(2): 205-211.
57. Biswas SD, Kleinberg I. Effect of urea concentration on its utilization, on the pH and the formation of ammonia and carbon dioxide in a human salivary sediment system. *Arch Oral Biol* 1971; 16(7): 759-780.
58. Sissons CH, Cutress TW, Pearce EI. Kinetics and product stoichiometry of ureolysis by human salivary bacteria and artificial mouth plaques. *Arch Oral Biol* 1985; 30(11-12): 781-790.
59. Chen YY, Weaver CA, Burne RA. Dual functions of *Streptococcus salivarius* urease. *J Bacteriol* 2000; 182(3): 4667-4669.
60. Li YH, Chen YY, Burne RA. Regulation of urease gene expression by *Streptococcus salivarius* growing in biofilms. *Environ Microbiol* 2000; 2(2): 169-177.
61. Sissons CH, Perinpanayagam HE, Hancock EM, Cutress TW. PH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. *J Dent Res* 1990; 69(5): 1131-1137.

62. Sissons CH, Hancock EM. Urease activity in *Streptococcus salivarius* at low pH. Arch Oral Biol 1993; 38(6): 507-516.
63. J. Reyes, I Yevenes, Fundamentos de espectrofotometría. Primera edición, 1995. pag 2-10.
64. Acevedo AM, Machado C, Rivera LE, Wolff M, Kleinberg I. The inhibitory effect of an arginine bicarbonate/calcium carbonate CaviStat-containing dentifrice on the development of dental caries in Venezuelan school children. J Clin Dent 2005; 16(3): 63-70.
65. Acevedo AM, Montero M, Rojas-Sánchez F, Machado C, Rivera LE, Wolff M y cols. Clinical evaluation of the ability of CaviStat in a mint confection to inhibit the development of dental caries in children. J Clin Dent 2008; 19(1): 1-8.
66. Lloret SM, Andrés JV, Legua CM, Falcó PC. Determination of ammonia and primary amine compounds and Kjeldahl nitrogen in water samples with a modified Roth's fluorimetric method. Talanta. 2005;28;65(4):869-75.
67. Fujimoto EK , Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150 (1) : 76-85.
68. Piovanos S, Squassi A, Bordoni N. Estado del arte de indicadores para la medición de caries dental. Rev Odon UBA 2010; 25 (58): 29-43.
69. Dorransoso de Cattoni S. Procesos de desmineralización y remineralización del esmalte dental. Rev Dent Chile 1996; 87(1):23-36.

## ANEXO 1.

### Preparación de reactivos utilizados.

#### 1- Preparación de 100 ml de $K_2HPO_4$ 10mM a pH 7.

Origen reactivo: Mallinckrodt Baker SA. AR: Reactivo grado analítico

PM  $K_2HPO_4$  anhidro: 174,18 g/mol

100 ml de  $K_2HPO_4$  10mM= 100 ml de  $K_2HPO_4$  0,01 M

0,01 M= 0,01 mol/1000 ml = 0,001 mol en 100 ml

1 mol / 174,18 g=0,001 mol / x g = 0,17418 g

Se pesan 0,17418 g y se disuelven en 80 ml de agua. Da pH 8,8. Se lleva a pH 7 con HCl 0,1 M hasta ajuste

#### 2- Preparación de 100 ml de tris Maleate 10mM a pH 6.

Origen reactivo: Sigma-Aldrich. Trizma maléate. Grado reactivo.

$C_4H_{11}NO_3 \cdot C_4H_4O_4$   $NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot C_4H_4O_4$

PM  $C_4H_{11}NO_3 \cdot C_4H_4O_4$  = 237,21 g/mol

Solubilidad en agua: 118,61 g/l a 20 °C

100 ml de tris Maleate 10mM= 100 ml de tris Maleate 0,01 M

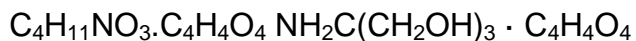
0,01 M= 0,01 mol/1000 ml = 0,001 mol en 100 ml

1 mol / 237,21 g=0,001 mol / x g = 0,23721 g

Se pesan 0,23721 g y se disuelven en 80 ml de agua. Da pH 3,8. Se lleva a pH 6 con NaOH 0,1 M hasta ajuste.

### 3- Preparación de 50 ml de Tris Maleate 0,5 M a pH 6.

Origen reactivo: Sigma-Aldrich. Trizma maléate. Grado reactivo.



$$\text{PM } \text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 = 237,21 \text{ g/mol}$$

Solubilidad en agua: 118,61 g/l a 20 °C

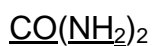
$$0,5 \text{ M} = 0,5 \text{ mol}/1000 \text{ ml} = 0,025 \text{ mol en } 50 \text{ ml}$$

$$1 \text{ mol} / 237,21 \text{ g} = 0,025 \text{ mol} / x \text{ g} = 5,93025 \text{ g}$$

Se pesan 5,93025 g y se disuelven en 30 ml de agua. Da pH 3,6. Se lleva a pH 6 con NaOH 0,1 M hasta ajuste.

### 4- Preparación de 50 ml de Urea 1 M .

Origen reactivo: Eastman Kodak Company. Grado Practical.



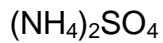
$$\text{PM } \text{CO}(\text{NH}_2)_2 = 60,06 \text{ g/mol}$$

$$1 \text{ M} = 1 \text{ mol}/1000 \text{ ml} = 0,05 \text{ mol en } 50 \text{ ml}$$

$$1 \text{ mol} / 60,06 \text{ g} = 0,05 \text{ mol} / x \text{ g} = 3,003 \text{ g}$$

### **5- Preparación de 50 ml de sulfato de amonio 10mM.**

Origen reactivo: Sigma-Aldrich. Grado reactivo.



Molecular Weight: 132,14 g/mol

50 ml de sulfato de amonio 10mM= 50 ml de sulfato de amonio 0,01 M

0,01 M= 0,01 mol/1000 ml = 0,0005 moles/50 ml

1 mol / 132,14 g=0,0005 mol / x g =0,06607 g

Se pesan 0,06607 g y se disuelven en 30 ml de agua y se completa a 50 ml en matraz aforado.

### **6- Preparación de 50 ml de arginina · HCl 1M.**

Origen reactivo: Sigma-Aldrich. Grado reactivo.

Empirical Formula (Hill Notation):  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$

Molecular Weight: 210,66 g/mol

1 M= 1 mol/1000 ml = 0,05 mol en 50 ml

1 mol / 210,06 g=0,05 mol / x g = 10,503 g

Se pesan 10,503 g y se disuelven en 30 ml de agua y se completa a 50 ml en matraz aforado.



## 7- Curva de calibración de proteína.

Solución estándar de proteínas: 10 mg/ml.

Origen reactivo: Sigma-Aldrich. Grado reactivo.

Para 10 ml de 10 mg/ml.

$$10 \text{ g/ ml} = X \text{ mg} / 10 \text{ ml} \quad X = 100 \text{ mg}$$

Pesar 100 mg, disolver y completar a 10 ml en matraz aforado.

St1.- Preparar 10 ml de estándar de 2 mg/ ml

$$10 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/ ml} = X \text{ ml} \times 10 \text{ mg/ml} \quad X = 2 \text{ ml}$$

Tomar 2 ml y completar a 10 ml en matraz aforado.

St2.- Preparar 10 ml de estándar de 1,4 mg/ ml

$$10 \text{ ml} \times 1,4 \text{ mg/ ml} = X \text{ ml} \times 10 \text{ mg/ml} \quad X = 1,4 \text{ ml}$$

Tomar 1,4 ml y completar a 10 ml en matraz aforado.

St3.- Preparar 10 ml de estándar de 0,8 mg/ ml

$$10 \text{ ml} \times 0,8 \text{ mg/ ml} = X \text{ ml} \times 10 \text{ mg/ml} \quad X = 0,8 \text{ ml}$$

Tomar 0,8 ml y completar a 10 ml en matraz aforado.

St4.- Preparar 10 ml de estándar de 0,2 mg/ ml

$$10 \text{ ml} \times 0,2 \text{ mg/ ml} = X \text{ ml} \times 10 \text{ mg/ml} \quad X = 0,2 \text{ ml}$$

Tomar 0,2 ml y completar a 10 ml en matraz aforado.

## ANEXO 2.

### FICHA PACIENTES TESIS

**“Implementación de metodología para la medición de la actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva y placa dental.”**

Fecha:

#### **Identificación Paciente.**

NOMBRE:

EDAD:

RUT:

TELEFONOS:

DIRECCIÓN:

Cumple con ayuno de 10 horas \_\_\_\_\_

Cumple con abstenerse de cualquier procedimiento de higiene oral en últimas 10 horas  
\_\_\_\_\_

No presenta alteraciones sistémicas. \_\_\_\_\_

Nº dientes presentes en boca. \_\_\_\_\_

COPD. C\_\_\_\_ O\_\_\_\_ P\_\_\_\_

#### **Consentimiento Informado.**

Yo \_\_\_\_\_, rut \_\_\_\_\_, autorizo la utilización de las muestras de saliva y Biopelícula oral, donadas voluntariamente, para ser estudiadas y analizadas en el marco de la tesis “Implementación de metodología para la medición de la actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva y placa dental” realizada por la alumna Evelyn Reyes Beltrán. Además fui informada que para este estudio solo se utilizara de mis datos aportados, el de COPD, el resto de mis datos personales serán absolutamente resguardados.

Firma.