



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPTO. ODONTOLOGÍA RESTAURADORA  
ÁREA OPERATORIA DENTAL  
DEPTO. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
ÁREA QUÍMICA.**

**Producción de álcali por actividad de ureasa y arginina deiminasa  
en saliva y biofilm dental en niños de 8 años con distinta historia  
de caries dental.**

**Jéssica Andrea Maureira Chicahual**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dr. Gustavo Moncada Cortés.**

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

**Adscrito a Proyecto Investigación en Salud Fonis SAE 13 120 205  
Santiago - Chile  
2013**

*Dedico este trabajo a Dios, a mi amado esposo Carlos Bustos, a mis padres, hermanos y sobrina que viene en camino.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Luego de haber realizado este trabajo agradezco a cada uno de los que formaron parte de mi carrera y el desarrollo de esta tesis.

Gracias a mi tutor Ismael Yévenes y a mis profesores Gustavo Moncada y Miguel Neira por su paciencia, apoyo, dedicación y calidad humana.

Gracias a Karlita por su buena acogida en el Laboratorio de Química y al Proyecto de Investigación en Salud Fonis SAE 13 120 205.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS.....	48

## **RESUMEN**

### **Introducción**

La generación de álcali en saliva y biofilm dental (biopelícula) es producto de la actividad de dos vías enzimáticas productoras de amonio: a) hidrólisis de urea por la enzima ureasa y b) hidrólisis de arginina a través de enzimas del sistema arginina deiminasa (SAD), ambas provenientes de bacterias presentes en la cavidad oral. El potencial alcalinogénico de estos mecanismos enzimáticos podría estar asociado positivamente con un menor índice de caries. Por lo tanto, es primordial, a través de métodos establecidos, cuantificar la actividad de ambos mecanismos enzimáticos y correlacionarlos con índice de caries en una población infantil.

### **Materiales y Métodos**

Fueron examinados, mediante métodos visual y táctil, por examinadores calibrados (índice de Kappa= 0,77) según criterios OMS, 65 niños de 8 años de edad de tres colegios seleccionados. Se recolectaron muestras de saliva y biofilm dental de todos los niños. Se determinó la suma del índice COPD y ceod de cada niño y se agruparon en; Bajo, Moderado, Alto. En muestras de saliva y biofilm dental se determinó concentración de amonio, proteínas y actividad específica de ureasa y SAD.

### **Resultados**

Con curvas de calibración de amonio y proteínas con coeficiente de correlación cercano a 1, se determinó la actividad enzimática medida a través de la cuantificación de amonio. Al medir actividad de ureasa en saliva se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ). Al medir actividad de ureasa en biopelícula y SAD en saliva y biopelícula no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p > 0,05$ ). Al comparar índice de caries entre colegios de zona urbana y rural, existe tendencia al aumento en ambos índices en niños de colegio rural, pero estos no son estadísticamente

significativos ( $p > 0,05$ ).

### Conclusión

El aumento de actividad de ureasa en saliva se asocia con la disminución de índices de COPD-ceod en niños de 8 años provenientes de la R.M.

La actividad de ureasa en biopelícula no se asocia con la disminución de índices de COPD y ceod en niños de 8 años.

Existe unan clara tendencia al aumento de la producción de álcali de ambos sistemas enzimáticos en saliva, en niños con menores índices de caries, que pueden influir en el equilibrio ácido-base del medio ambiente oral.

Existe tendencia a mayores índices de caries en niños de 8 años que habitan en zona rural de la Región Metropolitana.

Son necesarios nuevos estudios que controlen factores externos que puedan influir considerablemente en los resultados.

## **INTRODUCCIÓN**

Un gran número de investigaciones han tratado de establecer modelos que expliquen la etiología de la caries, sin embargo éstas no son suficientes para entender las variaciones de las experiencias de caries en distintas poblaciones. Por lo tanto la caries dental sigue constituyendo uno de los principales problemas de salud oral y es necesario explorar nuevas estrategias que apunten hacia la prevención de caries.

La evidencia acumulada en análisis de estudios *in vitro* e *in vivo* confirman que la modulación alcalinogénica de saliva y biopelícula oral a través de la producción de amonio por bacterias orales, influyen de forma beneficiosa en la integridad de la estructura dental, mediante la neutralización de ácidos y el control de la aparición de microbiota cariogénica, constituyendo de esta manera una estrategia prometedora en el control de las caries dental.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo medir la producción de álcali por actividad microbiana y correlacionarla con el índice de caries en niños, aportando así un paso a una nueva estrategia dirigida a la prevención de caries en las poblaciones vulnerables.

La pronta identificación del potencial de generación de álcali por las bacterias orales, permitirá a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile abrir nuevos horizontes, apoyado en evidencia experimental, que permitan aplicar en clínica nuevas medidas preventivas que aumenten la eficiencia en el control de salud oral.

## MARCO TEÓRICO

La caries dental es uno de los problemas de salud más comunes en los países desarrollados y en desarrollo. Los datos epidemiológicos de muchos países han demostrado claramente la alta prevalencia de ésta enfermedad (1). Este aumento global de la prevalencia de caries dental afecta tanto a niños (60 a 90%) como a la mayoría de adultos, en dentición primaria como en dentición permanente (2,3).

En Chile, la caries dental aumenta sostenidamente con la edad. Según rango etario, corresponde a un 17% a los 2 años, un 48% a los 4 años, un 70,4% 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 (4-7), señalando una crisis de salud pública pendiente.

La caries dental es una enfermedad con múltiples factores causales, que se manifiesta en la estructura de los dientes como una lesión destructiva y progresiva. Tales manifestaciones pueden variar desde cambios microscópicos a cambios macroscópicos del diente. El proceso causal subyacente ha sido atribuido a alteraciones en los procesos de homeostasis oral, como resultado de ciclos alternos orquestados por un conjunto de factores que implican ciclos de desmineralización y remineralización. Cuando la fase de desmineralización domina, se desarrolla la lesión de caries (8,9). El resultado de la acidificación prolongada en la biopelícula dental conduce a la aparición de microbiota acidogénica y acidúrica, incluyendo *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y *Lactobacillus species* (*Lactobacillus spp.*). Esta acidificación conduce a la alteración de las proporciones de estos patógenos que fermentan carbohidratos de la dieta rápidamente, disminuyendo el pH a valores críticos bajo 5.5, los cuales aceleran la desmineralización del diente (10,11). La presencia de estos microorganismos es significativamente mayor en sujetos con caries activas, comparado con sujetos sin caries (12,13).



En condiciones de salud, las bacterias orales al colonizar los dientes, forman una comunidad llamada biofilm (biopelícula o placa dental), la cual se encuentra en equilibrio dinámico con el sistema de defensa del organismo, y generalmente es compatible con la integridad de los tejidos dentarios (14-16). En estas condiciones de salud, encontramos microorganismos tales como; *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*), *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*), entre otros. Se ha observado que en sujetos con caries activas, los niveles de estos microorganismos son más bajos que los niveles presentes en sujetos libres de caries, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (12,13).

Distintos estudios se han enfocado en la naturaleza acidogénica de la caries dental, sin embargo, recientemente se ha propuesto que el desarrollo de caries no puede estar asociada solamente con producción de ácido en placa, sino también con una capacidad reducida de generar álcali por parte de la microbiota oral (10). Cabe mencionar que el consumo frecuente de azúcar puede conducir no sólo a un aumento de las proporciones de bacterias cariogénicas, sino también a una disminución concomitante en la proporción de microbiota productora de álcali (17).

La capacidad de los biofilms orales para generar álcali, parece ser un importante factor inhibitor de caries, por lo tanto, la producción de éste en forma de amoníaco puede influir positivamente en el equilibrio entre la remineralización y desmineralización del diente y puede ayudar a prevenir la aparición de una microbiota cariogénica (11).

Las fuentes principales de generación de álcali en biofilms dentales siguen dos rutas: a) hidrólisis de urea por la enzima ureasa y b) hidrólisis de arginina a través de las enzimas del sistema arginina deiminasa (SAD).

La urea, compuesto químico que resulta del metabolismo de las proteínas, siempre está presente en secreciones salivales y exudados gingivales. Las concentraciones de urea en humanos sanos son más o menos equivalentes a las

de suero, que van desde 3 a 10 mM. Ésta es rápidamente hidrolizada por una enzima llamada ureasa proveniente de un pequeño subconjunto de bacterias orales compuesto por *S. salivarius*, *A. naeslundii* y *Haemophili*, y que la convierten en amoníaco y CO<sub>2</sub> (9). La expresión de ésta enzima en las bacterias es altamente regulada en respuesta a factores ambientales tales como disponibilidad de sustrato, carbohidratos y pH (17).

Se ha observado una menor proporción de bacterias ureolíticas en biopelícula de sujetos que consumen dietas ricas en sacarosa. Así mismo, se ha observado que el pH del medio afecta la capacidad de *S. salivarius* para metabolizar ureasa. La caracterización bioquímica de la enzima ureasa muestra que niveles de pH por debajo de 4 pueden inactivar la enzima, además muestra un máximo de actividad a pH 7 y con respecto a la temperatura la máxima actividad se alcanzó a los 60°C (18).

En biopelícula los niveles de ureasa son altos, por ende la urea es rápidamente hidrolizada. Se ha demostrado que individuos que producen bajos niveles de ureasa tienen reducida capacidad para compensar la acidificación glucolítica. Estos niveles de ureasa se deben a la baja cantidad de bacterias productoras de esta enzima. Recientemente, se ha encontrado que la actividad de ureasa en biopelícula en sujetos libres de caries es tres veces más alta que en sujetos con caries activas (9).

La generación de amoníaco a partir de urea a través de la actividad de ureasa, puede causar un aumento significativo en el pH de la biopelícula, ayudando a neutralizar los ácidos generados a partir de la actividad glucolítica de carbohidratos de la dieta mediante bacterias de biopelícula y también puede proteger a las bacterias del daño inducido por el ácido. Por estas razones se ha planteado la hipótesis de que la actividad de ureasa en biopelícula y en saliva puede prevenir el desarrollo de caries (17).

Así mismo, la arginina es un aminoácido abundante en péptidos y proteínas salivales y es liberada por peptidasas y proteasas, originando concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  en su forma libre. En bacterias existe un sistema enzimático que utiliza arginina como sustrato produciendo otro aminoácido llamado ornitina, amoníaco,  $\text{CO}_2$  y ATP. La enzima encargada del catabolismo de arginina es la arginina deiminasa. Las bacterias positivas para este Sistema Arginina Deiminasa (SAD) son miembros abundantes de la microbiota oral normal que coloniza los dientes y los tejidos blandos e incluyen *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis* y *S. mitis*, ciertas especies de *Lactobacillus*, *Actinomyces* y algunas *espiroquetas* (11-13). SAD incrementa el pH local, el cual puede neutralizar los efectos de la acidificación por metabolismo de azúcar y reducir las caries producidas por biofilms orales (19).

Por otra parte, el amonio producido por SAD podría proteger las bacterias contra el daño producido por ambientes ácidos. Esta protección se debe principalmente por los procesos moleculares de la bacteria por sobre la acción protectora de su membrana. Se ha visto que SAD es activo a pH cercano a 3 y su actividad se reduce al 10% del máximo cuando el pH llega a valores entre 2,1 y 2,6 (20).

Existe suficiente evidencia para apoyar la hipótesis de que la producción de amoníaco desde urea y arginina puede ser un inhibidor endógeno de caries. Por lo tanto, la producción de amoníaco a través de hidrólisis de urea y el sistema SAD podrían inhibir el desarrollo de la caries dental por neutralización de ácidos y estabilización de una microbiota oral que es compatible con salud dental (9).

Un estudio en pacientes con insuficiencia renal crónica, demostró que rara vez los pacientes desarrollan caries, incluso con dieta rica en hidratos de carbono, llegando a producir 10 a 50 veces mayores niveles de urea en saliva en relación a una persona sana (10,12).

Otro estudio, reveló que niveles elevados de arginina libre en saliva, estaban fuertemente correlacionados con resistencia a caries dental. Así mismo, un potente efecto inhibitor en el desarrollo de caries se observó en ratas que fueron

infectadas con una cepa genéticamente modificada de *S. mutans* que expresa los genes de ureasa de *S. salivarius*. Específicamente, las ratas colonizadas por la cepa *S. mutans* que expresa altos niveles de ureasa, tuvieron menos lesiones de caries y menor severidad de caries que los animales control (11).

En un estudio reciente, se midió la actividad de ureasa en niños en condiciones de ayuno, encontrándose que en aquellos libres de caries existe una mayor actividad de ureasa en biopelícula, comparada con niños que presentan caries (6). Por lo tanto, el aumento de actividad de ureasa en placa dental podría estar asociado con un menor riesgo de caries en niños (10).

Es por esto que se ha demostrado que en biopelícula de individuos resistentes a caries, existen valores más altos de pH en comparación a valores encontrados en biopelícula de individuos susceptibles a caries. Este aumento de pH se ha correlacionado con niveles elevados de amoníaco. Los diferentes hallazgos sugieren que el aumento de riesgo de caries se asocia con una reducción de la capacidad de generación de álcali en poblaciones microbianas que colonizan la cavidad oral (9).

Por lo tanto, la producción de amoníaco a partir de urea y el metabolismo de arginina, han sido identificados como un mecanismo por el cual las bacterias orales:

- a) Están protegidas contra la muerte ácida.
- b) Mantienen un pH ambiental relativamente neutro que puede suprimir la actividad de la microbiota cariogénica.
- c) Obtienen ventajas bioenergéticas mediante el metabolismo de arginina al generar adenosintrifosfato (9).

La evidencia continúa acumulándose en estudios *in vitro* y observaciones clínicas de que el riesgo de caries se asocia con una menor capacidad de generar álcali. A pesar de los recientes avances en este campo, siguen existiendo importantes lagunas en nuestro conocimiento sobre las diferencias en el potencial alcalinogénico de biopelícula y saliva en diferentes grupos etarios, como también

en la base microbiológica y ecológica. No se sabe si los niveles normales de actividad de ureasa y SAD en biopelícula y saliva, son estables en el tiempo, o cómo se relacionan con otros factores de riesgo de caries dental (9).

Sería relevante estudiar la producción de álcali en infantes en condiciones que favorecen el desarrollo de caries. En niños de 8 años se da esta situación ya que presentan un período de transición de la dentición, con muchos dientes primarios en exfoliación y dientes permanentes en erupción. Especialmente la última condición puede aumentar el riesgo de caries debido a algunas características tales como:

- a) Un contenido más alto de carbonato en el esmalte dental que provoca cambios en la red cristalina de hidroxiapatita, dando como resultado que la superficie del esmalte sea más susceptible al ácido (19).
- b) En dientes en erupción no hay contacto oclusal funcional, lo que puede aumentar la acumulación de biofilm y obstaculizar la higiene oral (19).

El riesgo de caries en la población estudiada, puede verse agravado dependiendo de la zona geográfica donde vivan, debido a la privación de oportunidades en salud oral y a variaciones en la concentración de fluoruros presentes en el agua y algunos alimentos (1). En Chile, se observa un mayor daño bucal en la población de áreas rurales al compararlos con los que residen en zonas urbanas (4).

Resultados de diversos estudios destacan la escasez de información disponible sobre el metabolismo de urea y arginina, así como de la microbiología, la importancia de la producción de álcali por bacterias salivales y biopelícula, y su influencia en la formación de caries. Se requieren análisis bioquímicos y microbiológicos detallados, para revelar la base de las diferencias sustanciales en el potencial alcalinogénico en niños (12).

Por lo tanto, existe una clara necesidad de avances en esta línea de investigación que permitan obtener pruebas sólidas y una mejor comprensión del rol bioquímico de cada participante, ureasa y SAD, a través de mediciones de actividad alcalinogénica que demuestren que los álcalis producidos por la microbiota en

saliva y biopelícula oral ofrecen una buena estrategia de prevención y control de caries principalmente en salud oral infantil. Para ello, es necesario responder nuestra interrogante: ¿Existe relación entre la producción de sustancias alcalinas orales por bacterias del biofilm dentario y saliva, y el índice de caries en niños de 8 años de área urbana y rural de la Región Metropolitana?

## **HIPÓTESIS**

El aumento de la producción de álcali en saliva y biofilm oral, por parte de la actividad microbiana oral, disminuye el índice de caries (COPD/ceod) en niños de 8 años de edad de zona urbana y rural de la Región Metropolitana.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar niveles de álcali en saliva y biofilm oral y correlacionarlos con índice de caries (COPD/ceod) en niños de 8 años de edad, de zona urbana y rural de la Región Metropolitana.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar índice COPD y ceod en niños de 8 años de zona urbana y rural de la Región Metropolitana.

Determinar concentración de amonio en muestras de saliva y biofilm producto de la actividad de los sistemas enzimáticos ureasa y SAD.

Determinar concentración de proteínas en muestras de saliva y biofilm en niños de 8 años de zona urbana y rural de la Región Metropolitana.

Determinar actividad específica de ureasa y SAD en biopelícula y saliva de niños con diferente índice de caries dental que viven en zona urbana y rural de la Región Metropolitana.

Establecer relaciones estadísticas entre niveles de actividad específica de ureasa y SAD de muestras de biofilm dental y saliva de niños de 8 años con diferente índice de caries.



## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo de estudio:** Estudio de asociación simple, de corte transversal, aleatorio y descriptivo a realizarse en niños de 8 años que asisten a colegios de zona norte y rural de la Región Metropolitana.

### **Muestra:**

**Tamaño Muestral:** El tamaño muestral del Proyecto FONIS SAE 13 120 205, fue de 60 alumnos por grupo de estudio, como los grupos de estudio son 3: de 6, 7 y 8 años de edad, totalizan 180 niños, asumiendo una pérdida de 10% el total sería de 162 niños. Para esta muestra se determinó una potencia de 0,80 y alfa 0,05 (Software Stata v11). Se tomó una parte de la población a estudiar, correspondiente a 65 niños de 8 años, de estos todos cumplieron con los criterios de inclusión establecidos. La población fue escogida por presentar un mayor riesgo de caries debido a que se encuentran en un periodo de transición de la dentición y sus piezas dentarias son más susceptibles al ambiente ácido (Figura N°1).

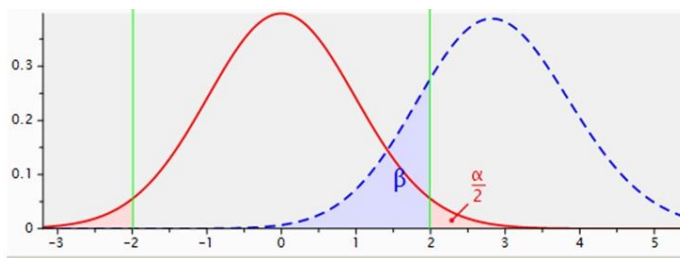


Figura N°1. Resolución del tamaño muestral usando Software Stata v11.

### **Materiales:**

- Kit de examen bucal.
- Tubos falcón y tubos Eppendorf (Falcon 2070, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).
- Gradillas.
- 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.<sup>1</sup>
- Softwares: Stata v11, SPSS para Windows, versión 18.0.

### **Procedimientos clínicos:**

**Evaluación clínica:** índices de caries fueron evaluados por investigadores calibrados (índice de Kappa= 0,77) de acuerdo a las normas emitidas por la OMS (22).

**Examen clínico<sup>2</sup>:** Un solo operador realizó todos los exámenes bucales a 65 niños de 8 años de edad (57% varones, 43% niñas) con diferente historia de caries, en tres colegios de la Región Metropolitana: Colegio Adelaida de la Fetra, Pje. Los Cerezos #606, Huechuraba. Colegio Pedro Marín Alemany, calle Los Plátanos s/n°, Melipilla. Colegio Santa Rosa Esmeralda, sector de Esmeralda s/n°, Melipilla. Todos los niños debieron cumplir con los criterios de inclusión y exclusión, previa lectura y firma de consentimiento informado<sup>3</sup> por el apoderado,

---

<sup>1</sup>Ver anexo N° 1: Reactivos.

<sup>2</sup>Ver anexo N° 2: Certificado Comité de Bioseguridad.

<sup>3</sup>Ver anexo N° 3: Consentimiento informado.

visado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología. La ficha clínica<sup>4</sup> que se utilizó corresponde a una modificación de la ficha para examen oral establecida por la OMS.

Criterios de inclusión: niños sanos de 8 años de edad de ambos sexos, con 20 o más piezas dentarias presentes en boca, con y sin lesiones de caries dentarias y sin historia previa de lesiones. Los niños deben presentar ayuno de 12 hrs.

Criterios de exclusión: niños con enfermedades que afecten la tasa de secreción salival (diabetes, hipertensión, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias), flujo salival disminuido (menos de 0,5 ml/min en mujeres y 0,7 ml/min en hombres), ingesta de antibióticos, uso de enjuagatorios bucales en el último mes o pastas dentales que contengan arginina.

#### **Obtención de muestras<sup>5</sup>:**

Los niños examinados debían cumplir con ayuno y abstención de cualquier procedimiento de higiene oral por 12 horas, según protocolo usado en estudio de Gordan y cols. (9).

#### **Obtención de muestra de saliva:**

A 65 niños, se les recolectó 3 ml de saliva no estimulada en un tubo de plástico estéril (Falcón), mediante su expectoración, el cual se mantuvo a 4°C durante la toma de muestra.

#### **Obtención de muestra de biopelícula:**

A 65 niños se les recolectó la biopelícula supragingival, a través del raspado completo de todas las superficies lisas dentales y regiones molares, con curetas periodontales estériles. Luego se llevó a tubos Eppendorf estériles que contenían 500 µl de solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (pH 7), a 4°C durante la toma de muestra.

---

<sup>4</sup>Ver anexo N° 4: Ficha clínica.

<sup>5</sup> Ver anexo N° 2: Certificado Comité de Bioseguridad.

La biopelícula obtenida de cada individuo es diferente, en composición microbiológica, por lo que se determinó la cantidad de proteínas presente en un volumen determinado de muestra, para normalizar la cantidad de amonio liberado por cantidad de proteínas presentes, tanto para saliva como para biopelícula, de esta forma poder comparar de manera adecuada los distintos individuos.

### **Determinación de COPD y ceod:**

Una vez examinados clínicamente los 65 niños y completadas las fichas clínicas se determinó el número de dientes cariados, obturados y con indicación de extracción por caries en dentición temporal (índice ceod) y el número de dientes cariados, obturados y perdidos por caries en dentición permanente (índice COPD). Una vez determinados, se sumaron ambos índices para cada niño (COPD y ceod), y se clasificaron en uno de los siguientes grupos:

Bajo: Se estableció la suma de índices (COPD/ceod) igual a 0 (sin presencia de caries, sin presencia de obturaciones y sin pérdida de dientes o indicación de extracción por causa de caries).

Moderado: Se estableció la presencia entre 1 y 3 caries dentinarias en boca.

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

### **Informe de caries<sup>6</sup>:**

A los padres o apoderados de los niños participantes se les entregó un informe de estado de salud bucal donde se especificó, presencia o ausencia de caries, cantidad de caries, alternativas de tratamiento y necesidad de sellantes, de acuerdo a las pautas emitidas por la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. A la vez se les indicó que deben acudir al consultorio correspondiente.

---

<sup>6</sup>Ver anexo N° 5: Informe de caries.

### **Procedimientos de Laboratorio<sup>7</sup>:**

**Conservación de muestras hasta análisis enzimático:** Las muestras de saliva y biofilm dental fueron almacenadas en refrigerador de baja temperatura a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día del análisis donde fueron trasladadas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Cuantificación de la concentración de proteínas totales en saliva y biopelícula dental:** Se determinó la concentración de proteínas totales, para expresar la liberación de amonio de las muestras, en base a la cantidad de proteínas totales presentes, 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 se creará una curva de calibración de proteínas totales.

**Curva de calibración de proteínas totales:** La curva se obtuvo a través del método de Bradford, donde diversas concentraciones de proteínas de bovino Sigma-Aldrich (BSA) se mezclarán con el reactivo de Bradford generando una coloración azul dependiente de la concentración de proteínas. La absorbancia fue leída en el espectrofotómetro, con lo cual se construyó una curva de concentración de proteína versus absorbancia (23).

---

<sup>7</sup>Ver anexo N° 2: Certificado Comité de Bioseguridad.

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

**Tabla N° 1. Curva de calibración proteínas totales.**

Reactivos	Volumen (µl)				
	Blanco	St 1 0,2 mg/ml	St 2 0,8 mg/ml	St 3 1,4 mg/ml	St 4 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

(BSA= proteínas de bovino Sigma-Aldrich      St= Estándar proteínas)

Posterior a la preparación de las soluciones de la Tabla N° 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 polinómica y se obtuvo la ecuación de la curva de calibración de proteínas totales versus absorbancia.

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

Para cuantificar las proteínas totales presentes en las muestras, se siguió el protocolo señalado en la curva de calibración de proteínas. El reactivo de Bradford, se mezcló con las muestras de saliva y biopelícula, generando distintas tonalidades en azul, que fueron leídas en el espectrofotómetro.

En la Tabla N° 2 se indican los reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas en la muestras.

**Tabla N° 2. Cuantificación de proteínas en muestras de saliva y biopelícula.**

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

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 amonio de ureasa (U) y arginina deiminasa (SAD) en saliva y biopelícula dental.**

La determinación de amonio generado enzimáticamente en las muestras de biopelícula y saliva, se realizó a través de un método espectrofotométrico, que lee la absorbancia de cada muestra. Para ello, se construyó una curva de calibración de amonio.

### **Curva de calibración de amonio.**

Esta se obtuvo a través del método de Nessler (24), donde concentraciones conocidas de amonio se mezclan con reactivo de Nessler (KI 5%, HgCl 2,5%, KOH 16%) generando una coloración amarilla que varía según la concentración de amonio. La absorbancia de estos estándares fue leída en el espectrofotómetro. Para obtener la curva de calibración de amonio se mezclaron los siguientes reactivos, mostrados en la Tabla N° 3.

**Tabla N° 3. Curva calibración de amonio.**

Reactivos	Volumen (µl)				
	Blanco	St1	St2	St3	St4
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 soluciones de 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.

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

#### Preparación de las muestras de saliva.

- Se utilizaron 2 tubos Eppendorf con 1,5 ml de saliva por cada muestra de saliva.
- Se dispersó la saliva a través de sonicación externa por dos ciclos de 30 segundos., 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.

- Se reunió la biopelícula dental obtenida en un tubo estéril que contenía 500 µl de  $K_2HPO_4$  10mM (pH7).
- Se dispersó la biopelícula obtenida a través de sonicación externa por dos ciclos de 30 s., ocupando refrigeración sobre hielo durante los intervalos a 4°C.
- 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 µl de 10 mM tris Maleato (pH 6).

Luego se determinó la actividad enzimática de U y SAD en las muestras.

**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, 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.

**Tabla N° 4. Actividad enzimática de Ureasa en saliva y biopelícula.**

Reactivos	Volumen (µl)		
	Saliva	Biopelícula	Blanco
Muestra	20	25	0
Tris Maleato 0,5 M	20	20	20
Urea 1M	25	25	0
H <sub>2</sub> O	435	430	480
Total volumen (µl)	500	500	500

Posterior a la preparación de las soluciones, 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 los siguientes pasos detallados en la Tabla N° 5.

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

Para cuantificar el amonio producido por la actividad enzimática de ureasa, se siguió el protocolo señalado en la curva de calibración de amonio. El reactivo de Nessler, se mezcló con las muestras de saliva y biopelícula, generando distintas tonalidades en amarillo, que fueron leídas en el espectrofotómetro.

En la Tabla N° 5 se indican los reactivos utilizados para la cuantificación de amonio en la muestras.

**Tabla N° 5. Cuantificación de amonio por actividad enzimática de Ureasa desde saliva y biopelícula.**

Reactivos	Volumen (µl)		
	Saliva	Biopelícula	Blanco
Muestra	25	25	0
Reactivo Nessler	100	100	100
H <sub>2</sub> O	875	875	900
Total volumen (µl)	1000	1000	1000

Para obtener la concentración de amonio (mM), se utilizó la ecuación de regresión obtenida de la curva de calibración de amonio (Tabla N° 3).

**Producción de amonio desde arginina a través de la actividad de arginina deiminasa (SAD) 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, una cantidad fija de arginina-HCl, 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 SAD en saliva y biopelícula se muestran en la Tabla N° 6.

**Tabla N° 6. Actividad enzimática de ADS en saliva y Biopelícula.**

Reactivos	Volumen (µl)		
	Saliva	Biopelícula	Blanco
Muestra	20	25	0
Tris Maleato 0,5 M	20	20	20
Arginina-HCl 1M	25	25	0
H <sub>2</sub> O	435	430	480
Total volumen (µl)	500	500	500

Posterior a la preparación de las soluciones, 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 SAD.**

Para cuantificar el amonio producido por la actividad enzimática de la SAD, se siguió el mismo protocolo utilizado para Ureasa.

Los reactivos utilizados para medir el amonio generado por SAD en saliva y biopelícula se detallan en las Tabla N° 7.

**Tabla N° 7. Cuantificación de amonio por actividad enzimática de SAD desde saliva y biopelícula.**

Reactivos	Volumen (µl)		
	Saliva	Biopelícula	Blanco
Muestra (sobrenadante)	25	25	0
Reactivo Nessler	100	100	100
H <sub>2</sub> O	875	875	900
Total volumen (µl)	1000	1000	1000

- 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).

Luego de obtener los valores de amonio liberado (mM), y determinada la cantidad de proteínas totales presentes (mg/ml) en las respectivas muestras y considerando el tiempo de incubación de las enzimas en minutos se expresa la actividad específica enzimática como  $\text{mmol min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$

**Estadística clínica:** Se estableció si existían diferencias en la producción de amonio de los sistemas U y SAD desde saliva y biopelícula dental, entre sujetos con diferentes índices de caries, a través de la metodología propuesta. Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 18.0. Para caracterizar la muestra se realizó análisis descriptivo de las variables. Se compararon los resultados de pacientes con diferentes CPOD y ceod. Se realizarán los test de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos. Para todas las muestras se utilizó un nivel de significancia de 0,05. Se realizaron diferentes combinaciones entre actividad enzimática e índice de caries (COPD + ceod) para determinar las correlaciones. Los diferentes grupos en estudio se compararán mediante la prueba de Kruskal-Wallis y Mann Whitney.

## RESULTADOS

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

Según la metodología propuesta por Reyes E (13), se siguió el protocolo rigurosamente, en la toma, conservación y posterior manipulación. No hubo pérdidas de saliva ni biopelícula oral.

### **2.- Cuantificación de la concentración de proteínas totales**

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

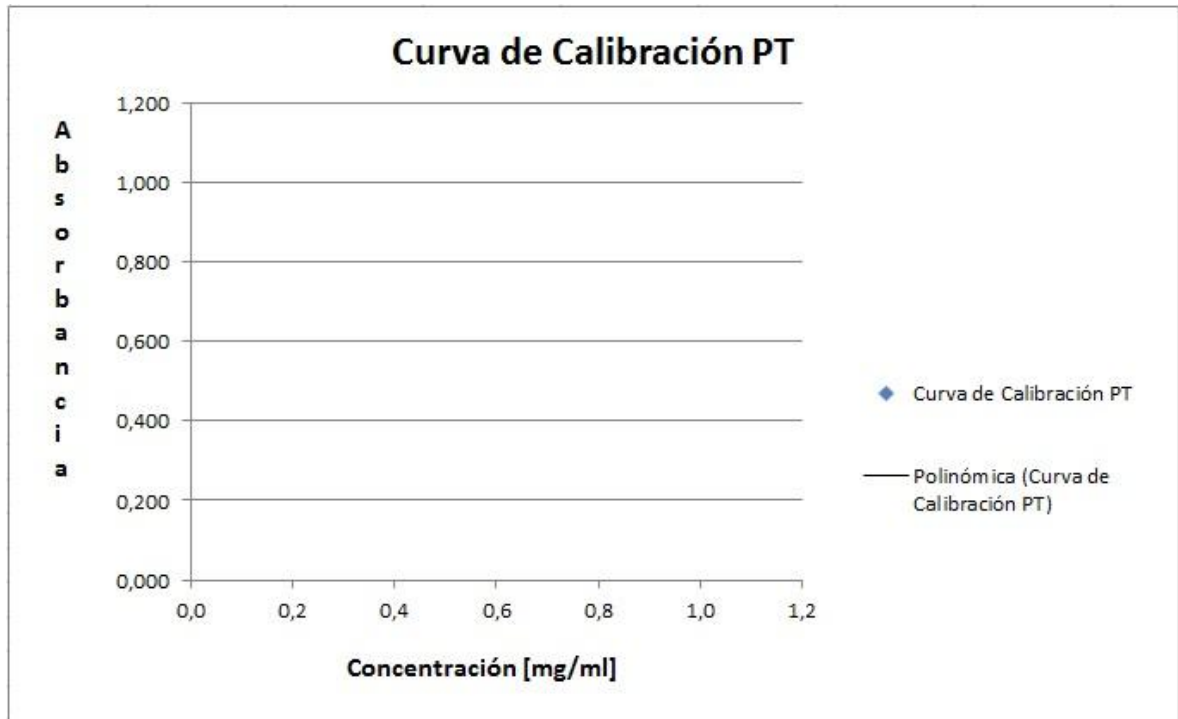
La curva de calibración se obtuvo en base a los resultados obtenidos de las reacciones expresadas en la Tabla N° 1, con lo cual se obtuvo valores de absorbancias según concentración de proteínas. Estos resultados se muestran en la Tabla N° 8.

**Tabla N° 8. Valores de curva de calibración de proteínas totales.**

<b>Estándar</b>	<b>Concentración Proteína (BSA) mg/ml</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>St. 0</b>	0,000	0,160
<b>St. 1</b>	0,200	0,265
<b>St. 2</b>	0,800	0,469
<b>St. 3</b>	1,400	0,541
<b>St. 4</b>	2,000	0,542

Se realizó una regresión polinómica con los datos obtenidos, esto permitió la confección de una curva de calibración (Figura N° 2). Se utilizó esta regresión ya que el coeficiente de correlación es cercano a 1.

**Figura N° 2. Curva calibración de proteínas totales en saliva y biopelícula.**



**Datos de la curva.**

**Ecuación 1:  $A = -0,1514C^2 + 0,4879C + 0,1671$**

**Coefficiente correlación (r): 0,9972**

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

Los siguientes resultados se obtuvieron en base a las reacciones señaladas en la metodología de la Tabla N° 2. La concentración de proteínas totales se calculó utilizando la curva de calibración de proteínas (Figura N° 2).

Los resultados fueron ordenados según grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries (Tabla N° 10-11-12).

### **3.- Curva de calibración de amonio**

La presente curva se realizó de acuerdo a las reacciones determinadas en el protocolo de la Tabla N° 3. Los resultados de esta curva se muestran en la Tabla N° 9.

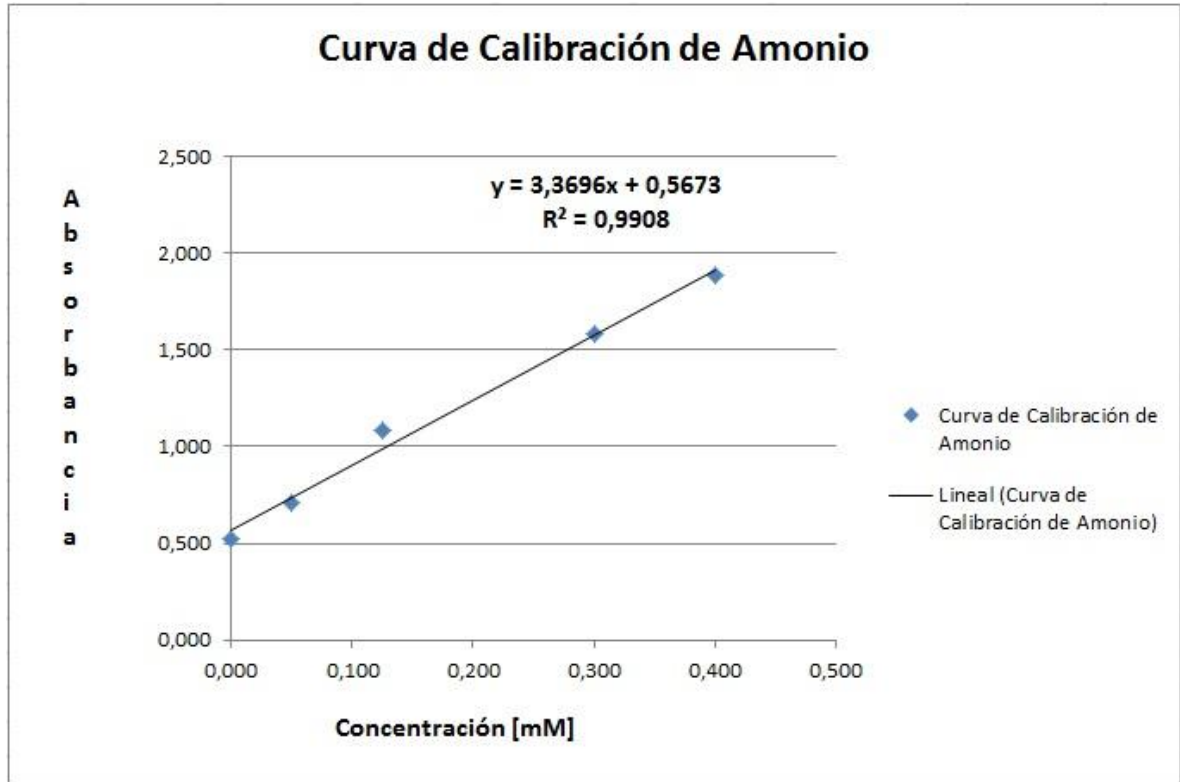
**Tabla N°9. Valores de curva de calibración de amonio.**

<b>Estándar</b>	<b>Concentración Amonio (mM)</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>St. 0</b>	0,000	0,522
<b>St. 1</b>	0,025	0,713
<b>St. 2</b>	0,075	1,081
<b>St. 3</b>	0,150	1,585
<b>St. 4</b>	0,200	1,884

La gráfica de los datos Absorbancia versus concentración de amonio permitió la confección de la curva de calibración para amonio (Figura N° 3).



**Figura N° 3. Curva calibración de Amonio Absorbancia versus concentración.**



Se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos, determinándose así la ecuación de la Curva de calibración de amonio.

**Datos de la curva:**

**Ecuación 2:  $A = 3,3696 \times \text{Conc} + 0,5673$**

**Coefficiente correlación (r): 0,9908**

### **Medición de la producción de amonio desde sistema enzimático ureasa en saliva y biopelícula dental.**

Los resultados se obtuvieron en base a reacciones explícitas en el protocolo de la Tabla N° 4. La medición del amonio producto de estas reacciones, se obtuvo a través de la reacción señalada en la Tabla N° 5 y posterior lectura en el espectrofotómetro utilizando la curva de calibración de amonio (Figura N° 3).

Los valores de concentración de cada muestra, fueron ordenados en grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries (Tabla N° 10-11-12).

### **Medición de la producción de amonio desde el sistema enzimático SAD en saliva y biopelícula dental.**

Los resultados se obtuvieron en base a reacciones explícitas en protocolo de la Tabla N° 6. La medición del amonio producto de estas reacciones, se obtuvo a través de la reacción mostrada en la Tabla N° 7, y posterior lectura en el espectrofotómetro utilizando la curva de calibración de amonio (Figura N° 3).

Los valores de concentración de cada muestra, fueron ordenados según grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries (Tabla N° 10-11-12).

### **Expresión de la Actividad Enzimática de ureasa y SAD en saliva y biopelícula dental.**

Los valores de amonio liberado (mM) desde U y SAD en saliva y biopelícula, son expresados en base a la concentración de proteínas totales presentes (mg/ml) en cada una de las muestras (Tabla N° 10-11-12).

La actividad enzimática de ureasa y SAD fueron expresada como:

**$\text{mmol min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$**

Los resultados obtenidos fueron ordenados en grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries (Tabla N° 10-11-12).

**Tabla N° 10.** Concentración de amoniaco, proteínas, actividad específica (AE) para ureasa (U) y arginina deiminiasa (SAD) en saliva y biofilm dental en pacientes de **Bajo** COPD/ceod.

COPD / ceod	Muestra	Proteína Saliva mg/ml	Proteína Biofilm mg/ml	Ureasa Saliva mM	Ureasa Biofilm mM	SAD Saliva mM	SAD Biofilm mM	AE Ureasa Saliva	AE Ureasa Biofilm	AE ADS Saliva	AE ADS Biofilm
Bajo	A7	0,35	0,19	0,01	0,01	0,10	0,07	0,29	0,48	3,10	3,37
Bajo	A9	0,76	0,27	0,01	0,01	0,08	0,08	0,14	0,33	1,21	2,77
Bajo	A20	0,71	0,06	0,01	0,01	0,13	0,10	0,15	1,22	1,99	14,25
Bajo	B3	0,31	0,12	0,01	0,01	0,11	0,14	0,50	0,99	4,10	10,26
Bajo	B5	1,19	0,17	0,26	0,01	0,10	0,13	2,43	0,63	0,98	6,94
Bajo	B6	0,62	0,15	0,10	0,01	0,11	0,14	1,70	0,60	2,04	8,23
Bajo	B10	0,58	0,11	0,04	0,01	0,08	0,15	0,81	0,82	1,56	12,58
Bajo	B13	0,30	0,19	0,03	0,01	0,16	0,17	1,28	0,51	6,16	7,86
Bajo	B14	0,59	0,16	0,01	0,01	0,18	0,19	0,21	0,54	3,37	10,35
Bajo	B26	0,61	0,13	0,04	0,02	0,16	0,15	0,69	1,27	2,80	9,96
Bajo	C3	0,87	0,19	0,01	0,01	0,13	0,11	0,15	0,47	1,64	5,48
Bajo	C7	0,92	0,14	0,01	0,02	0,13	0,11	0,12	1,44	1,54	7,07
Bajo	C9	1,22	0,16	0,03	0,03	0,15	0,09	0,23	1,56	1,34	5,22
Bajo	C12	0,35	0,21	0,01	0,02	0,13	0,09	0,35	0,86	4,09	3,75
Bajo	C18	0,95	0,32	0,12	0,02	0,18	0,11	1,34	0,50	2,09	3,04
<b>Promedio</b>		<b>0,69</b>	<b>0,17</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,13</b>	<b>0,12</b>	<b>0,69</b>	<b>0,81</b>	<b>2,53</b>	<b>7,41</b>
<b>DE</b>		<b>0,30</b>	<b>0,06</b>	<b>0,07</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,70</b>	<b>0,39</b>	<b>1,42</b>	<b>3,55</b>

AE=Actividad específica,  $\text{mmol min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$  DE= Desviación Estándar

**Tabla N°11.** Concentración de amoniaco, proteínas, actividad específica (AE) para ureasa (U) y arginina deiminasa (SAD) en saliva y biofilm dental en pacientes de **Moderado COPD/ceod.**

COPD / ceod	Muestra	Proteina Saliva mg/ml	Proteina Biofilm mg/ml	Ureasa Saliva mM	Ureasa Biofilm mM	SAD Saliva mM	SAD Biofilm mM	AE Ureasa Saliva	AE Ureasa Biofilm	AE ADS Saliva	AE ADS Biofilm
Moderado	A1	0,27	0,04	0,01	0,01	0,09	0,06	0,36	2,28	3,65	13,45
Moderado	A2	0,49	0,07	0,01	0,01	0,08	0,08	0,23	1,03	1,87	10,82
Moderado	A3	0,38	0,07	0,01	0,01	0,11	0,05	0,26	1,13	3,26	5,88
Moderado	A4	0,57	0,14	0,01	0,01	0,12	0,07	0,18	0,53	2,35	4,54
Moderado	A12	0,49	0,16	0,01	0,01	0,08	0,12	0,18	0,51	1,76	6,53
Moderado	A13	0,66	0,18	0,01	0,01	0,09	0,01	0,15	0,39	1,58	0,49
Moderado	A15	0,60	0,22	0,01	0,01	0,12	0,13	0,17	0,37	2,12	5,23
Moderado	A17	0,80	0,15	0,07	0,01	0,08	0,12	0,91	0,52	1,15	6,68
Moderado	A18	0,61	0,20	0,02	0,01	0,11	0,07	0,38	0,31	2,03	3,31
Moderado	A19	0,69	0,07	0,01	0,01	0,09	0,09	0,16	1,19	1,39	11,81
Moderado	A21	0,55	0,05	0,01	0,01	0,09	0,12	0,18	1,60	1,81	20,62
Moderado	B1	1,13	0,11	0,10	0,06	0,13	0,14	1,01	4,53	1,27	11,52
Moderado	B7	1,00	0,08	0,12	0,02	0,07	0,16	1,28	2,38	0,83	17,24
Moderado	B8	1,78	0,07	0,13	0,01	0,14	0,15	0,82	1,16	0,87	19,71
Moderado	B12	0,50	0,36	0,01	0,02	0,18	0,15	0,22	0,54	3,95	3,65
Moderado	B16	1,08	0,25	0,06	0,01	0,15	0,17	0,66	0,43	1,50	6,15
Moderado	B17	0,60	0,20	0,01	0,01	0,15	0,16	0,18	0,45	2,70	7,15
Moderado	B18	1,33	0,13	0,06	0,02	0,15	0,17	0,50	1,56	1,21	11,74
Moderado	B20	1,06	0,19	0,01	0,01	0,16	0,18	0,11	0,46	1,67	8,47
Moderado	B21	0,57	0,27	0,10	0,02	0,16	0,18	1,85	0,52	3,09	5,94
Moderado	B22	0,74	0,14	0,03	0,02	0,01	0,20	0,51	1,00	0,14	12,21
Moderado	B24	1,09	0,45	0,01	0,07	0,13	0,16	0,10	1,39	1,27	3,17
Moderado	B25	0,50	0,27	0,03	0,04	0,08	0,17	0,69	1,31	1,82	5,67
Moderado	B27	0,61	0,20	0,07	0,03	0,38	0,16	1,34	1,16	6,82	7,28
Moderado	B28	0,43	0,23	0,01	0,02	0,16	0,18	0,26	0,70	4,07	6,82
Moderado	C1	0,68	0,07	0,01	0,01	0,09	0,11	0,16	1,29	1,53	13,91
Moderado	C6	0,32	0,14	0,01	0,01	0,21	0,12	0,35	0,80	7,14	7,65
Moderado	C8	0,62	0,29	0,01	0,12	0,19	0,12	0,18	3,67	3,44	3,51
Moderado	C10	0,65	0,55	0,01	0,07	0,14	0,11	0,15	1,12	2,45	1,77
Moderado	C13	1,13	0,46	0,04	0,05	0,13	0,13	0,37	0,89	1,31	2,55
Moderado	C15	1,25	0,38	0,02	0,02	0,19	0,11	0,15	0,57	1,66	2,57
<b>Promedio</b>		<b>0,75</b>	<b>0,20</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>0,13</b>	<b>0,13</b>	<b>0,45</b>	<b>1,15</b>	<b>2,31</b>	<b>8,00</b>
<b>DE</b>		<b>0,34</b>	<b>0,13</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>	<b>0,05</b>	<b>0,43</b>	<b>0,95</b>	<b>1,57</b>	<b>5,15</b>

AE=Actividad específica,  $\text{mmol min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$  DE= Desviación Estándar

**Tabla N°12.** Concentración de amoniaco, proteínas, actividad específica (AE) para ureasa (U) y arginina deiminasa (SAD) en saliva y biofilm dental en pacientes de **Alto** COPD/ceod.

COPD / ceod	Muestra	Proteína Saliva mg/ml	Proteína Biofilm mg/ml	Ureasa Saliva mM	Ureasa Biofilm mM	SAD Saliva mM	SAD Biofilm mM	AE Ureasa Saliva	AE Ureasa Biofilm	AE ADS Saliva	AE ADS Biofilm
Alto	A5	0,51	0,22	0,01	0,01	0,09	0,07	0,20	0,36	2,00	2,95
Alto	A8	0,38	0,08	0,01	0,01	0,12	0,09	0,26	0,95	3,64	9,95
Alto	A10	0,67	0,13	0,01	0,01	0,05	0,08	0,13	0,61	0,82	5,29
Alto	A11	0,48	0,06	0,01	0,01	0,08	0,08	0,23	1,36	1,82	11,45
Alto	A14	0,89	0,31	0,01	0,01	0,12	0,07	0,15	0,29	1,52	2,10
Alto	A16	0,56	0,10	0,01	0,01	0,10	0,08	0,18	0,84	1,90	7,67
Alto	B2	1,35	0,06	0,20	0,02	0,10	0,15	1,65	2,96	0,85	21,73
Alto	B4	0,68	0,22	0,12	0,03	0,10	0,12	1,98	1,06	1,56	4,73
Alto	B9	1,05	0,07	0,01	0,01	0,10	0,01	0,11	1,25	1,05	1,25
Alto	B11	0,63	0,37	0,01	0,02	0,00	0,20	0,18	0,51	0,02	4,70
Alto	B15	1,21	0,32	0,03	0,02	0,17	0,18	0,25	0,66	1,52	4,91
Alto	B23	0,61	0,26	0,01	0,02	0,04	0,15	0,24	0,73	0,73	5,22
Alto	B29	0,22	0,49	0,02	0,03	0,19	0,17	1,13	0,45	9,62	3,09
Alto	C2	1,03	0,24	0,01	0,10	0,12	0,13	0,11	3,61	1,32	4,66
Alto	C4	0,93	0,17	0,01	0,01	0,12	0,11	0,12	0,46	1,47	5,52
Alto	C14	0,89	0,48	0,01	0,02	0,17	0,12	0,13	0,29	2,16	2,13
Alto	C16	1,09	0,17	0,00	0,01	0,19	0,16	0,04	0,68	1,93	8,42
Alto	C19	0,90	0,25	0,01	0,13	0,19	0,17	0,11	4,68	2,31	6,14
Alto	C20	0,75	0,14	0,01	0,01	0,09	0,01	0,15	0,66	1,25	0,66
<b>Promedio</b>		<b>0,78</b>	<b>0,22</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,11</b>	<b>0,11</b>	<b>0,39</b>	<b>1,18</b>	<b>1,97</b>	<b>5,92</b>
<b>DE</b>		<b>0,29</b>	<b>0,13</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>0,55</b>	<b>1,22</b>	<b>2,00</b>	<b>4,76</b>

AE=Actividad específica,  $\text{mmol min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$  DE= Desviación Estándar

**Diferencias en la producción de amonio de los sistemas U y SAD desde saliva y biopelícula dental, entre sujetos con distinto índice de caries.**

Mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov para una muestra, se determinó que los grupos Bajo, Moderado y Alto, no poseen distribución normal, por lo que se utilizó test estadístico no paramétrico para el análisis de los resultados, llamado test de Kruskal-Wallis.

Al comparar la actividad enzimática entre muestras de sujetos de los distintos grupos, encontramos que a menor índice de caries (COPD + ceod), existe mayor actividad enzimática de ureasa en saliva, con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,048$ ).

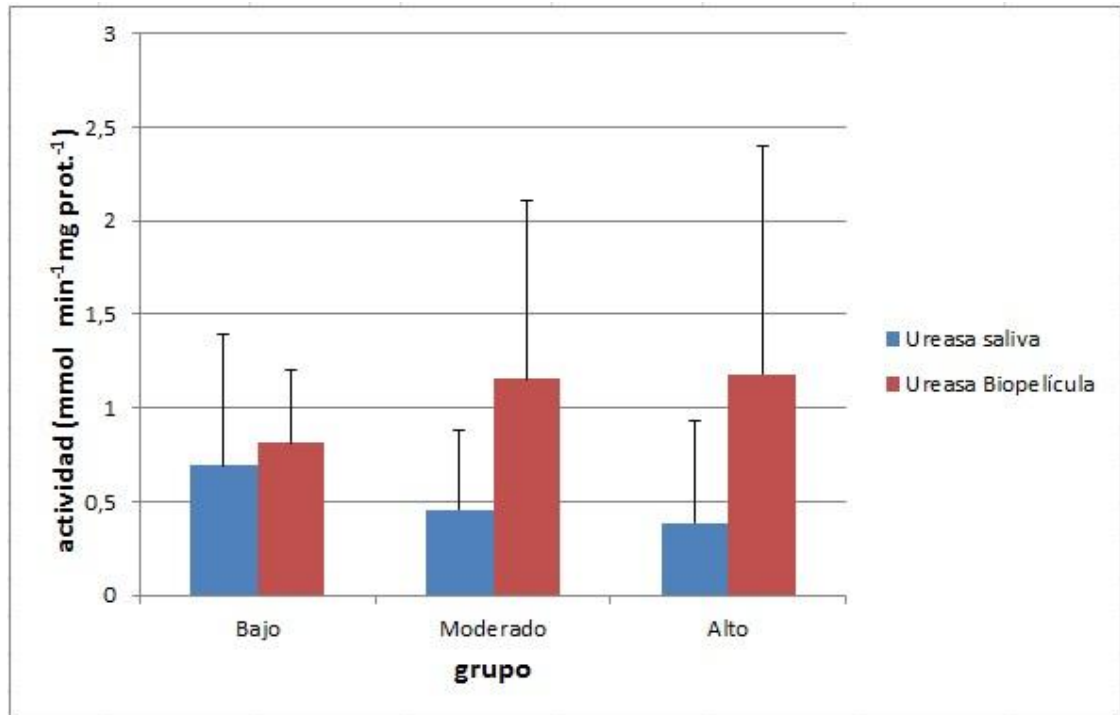
Al analizar ureasa en biopelícula, encontramos oscilaciones en la actividad enzimática de ureasa con diferencias no significativas entre los grupos ( $p=0,642$ ). De la misma manera se comportó la actividad de SAD en saliva ( $p=0,162$ ) y biopelícula oral ( $p=0,154$ ). (Tabla N° 13). La gráfica de los promedios obtenidos, se pueden observar en las Figuras N°4 y N°5.

**Tabla N°13.** Actividad específica (AE) para ureasa (U) y arginina deiminasa (SAD) en saliva y biofilm dental en pacientes de **Bajo, Moderado, Alto** COPD/ceod.

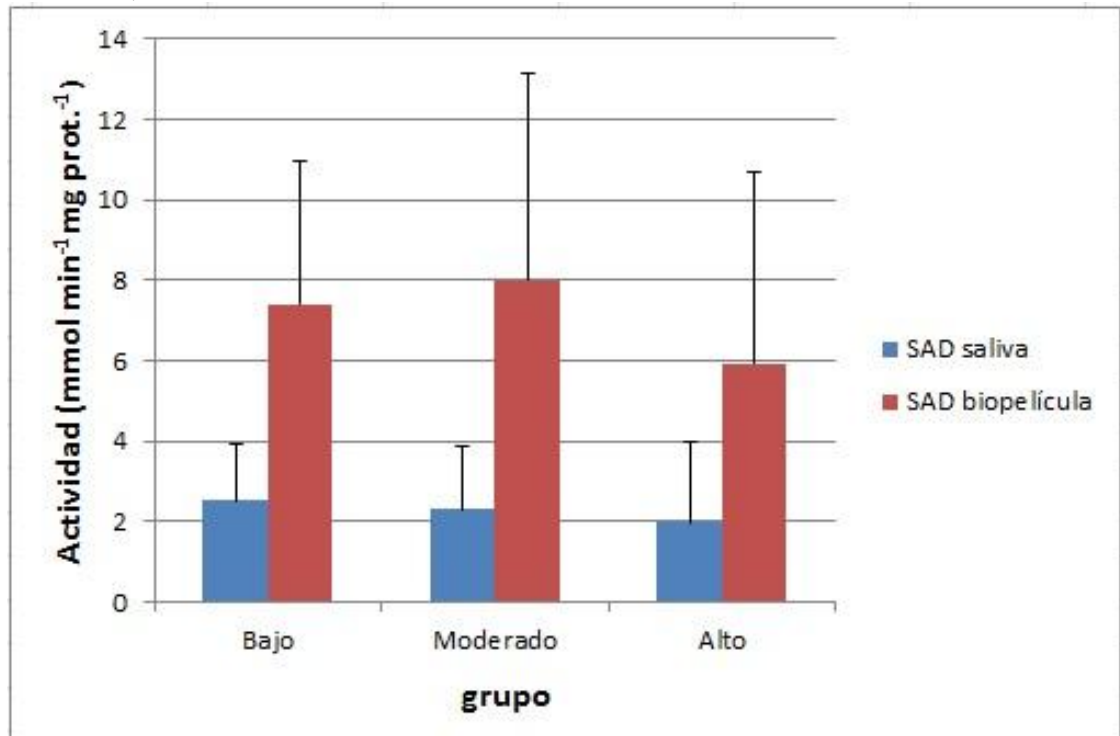
			COPD/ceod			
			Bajo	Moderado	Alto	p
<b>Urea</b>	Saliva	Media	0,69	0,45	0,39	0,048
		DE	0,70	0,43	0,55	
		Mediana	0,35	0,26	0,17	
	Biofilm	Media	0,81	1,15	1,18	0,642
		DE	0,39	0,95	1,21	
		Mediana	0,63	1,00	0,68	
<b>SAD</b>	Saliva	Media	2,53	2,31	1,97	0,162
		DE	1,42	1,57	2,00	
		Mediana	2,04	1,81	1,52	
	Biofilm	Media	7,41	8,00	5,92	0,154
		DE	3,55	5,15	4,76	
		Mediana	7,07	6,68	4,91	

AE=Actividad específica,  $\text{mmol min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$  DE= Desviación Estándar

**Figura N° 4. Comparación de la actividad enzimática (Act. Enz.  $\text{mmol min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$ ) de ureasa (U), en saliva y biopelícula, en grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries.**



**Figura N° 5. Comparación de la actividad enzimática (Act. Enz.  $\text{mmol min}^{-1}\text{mg prot.}^{-1}$ ) de arginina deiminasi en saliva y biopelícula, en grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries.**



### **Diferencias en índices de caries de niños provenientes de zona urbana y rural de la Región Metropolitana.**

Mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov para una muestra, se determinó que los grupos de zona urbana y rural de la región Metropolitana, no poseen distribución normal, por lo que se utilizó test estadístico Mann-Whitney, un test no paramétrico para el análisis de los resultados.

Separados por grupo, urbano / rural y expresado como valor promedio: Índice COPD: 0,345/0,390; dientes permanentes con caries: 0,241/0,268. Índice ceod: 2,586/2,878 (Figuras N° 6 y N°7), dientes temporales con caries: 1,862/2,195. Dientes temporales con indicación de extracción: 0.610/0.621. Dientes permanentes obturados: 0,103/0,122. Dientes temporales obturados: 0,172/0,073. Se aprecia tendencia a presentar índices más altos en niños de zona rural, pero dichas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,473$ ).



Figura Nº 6. Comparación de índices COPD/ceod, en niños de 8 años proveniente de zona urbana y rural de la Región Metropolitana.

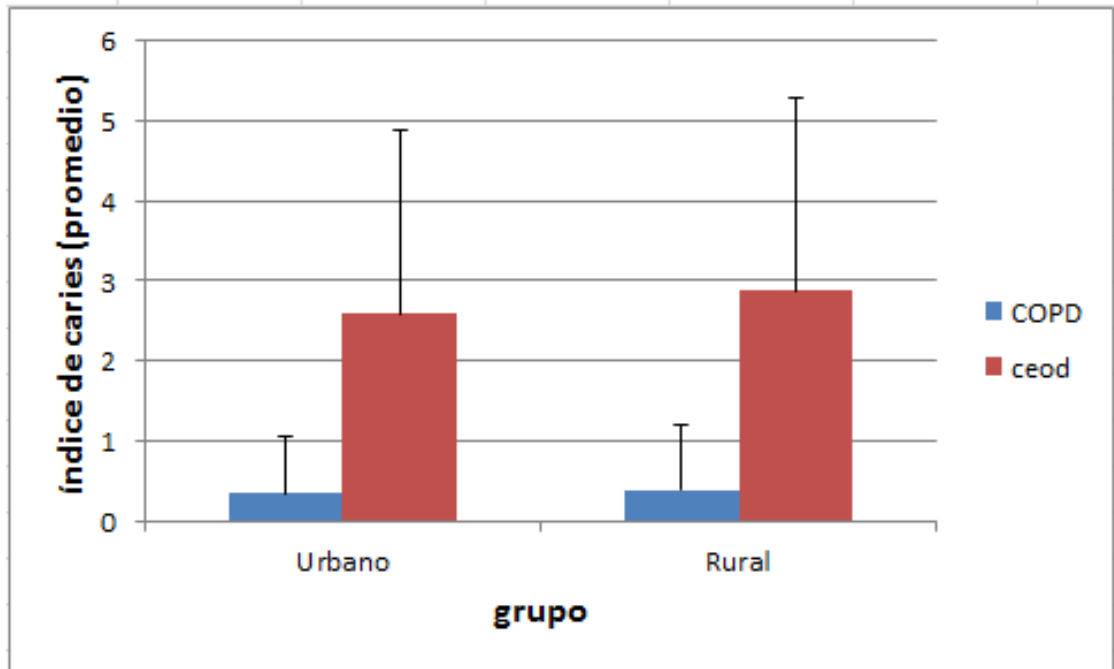
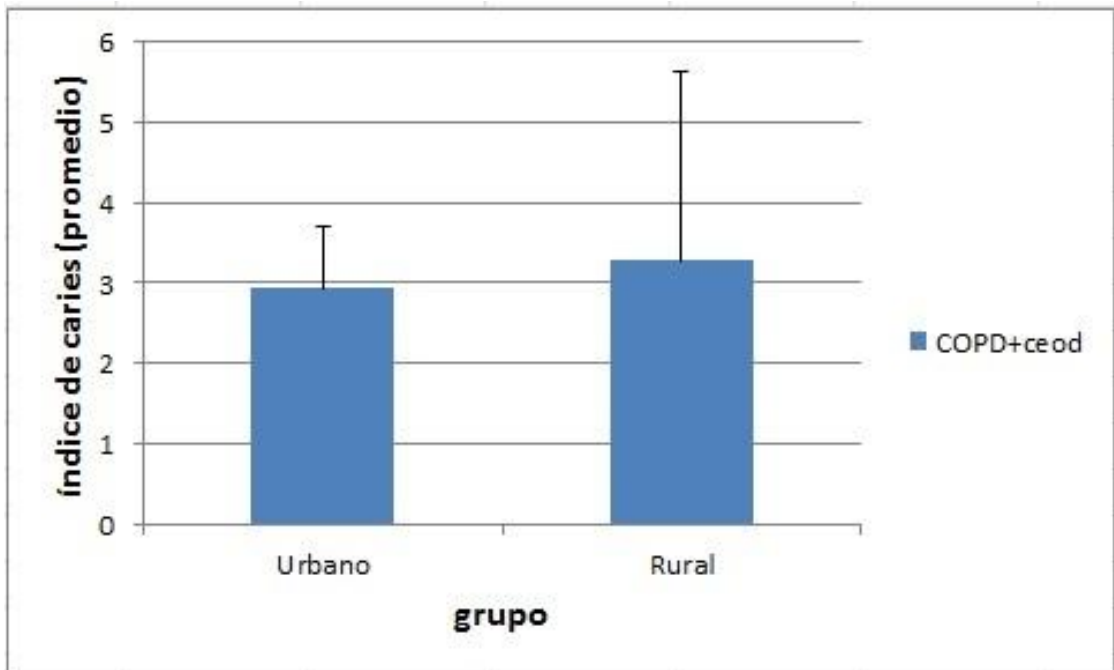


Figura Nº 7. Comparación de índices de caries en niños de 8 años proveniente de zona urbana y rural de la Región Metropolitana.



## DISCUSIÓN

La producción de amonio por parte de microbiota oral y su influencia en el equilibrio ácido-base para la mantención de salud oral, es apoyada por numerosas investigaciones que plantean la hipótesis que la generación de álcali podría ser un importante factor inhibidor de caries, y un nuevo horizonte con lo que respecta a la prevención de caries dental (11-13).

La metodología propuesta por Reyes (13), fue llevada a cabo rigurosamente en el presente estudio, tanto en la conservación, como en manipulación de muestras y reactivos. No hubo pérdidas de muestras de biopelícula, ni de saliva.

En este estudio, al comparar la actividad de los diferentes sistemas enzimáticos, encontramos que en el grupo de bajo índice de caries (COPD + ceod=0), existe una mayor actividad enzimática de ureasa en saliva, siendo ésta casi 2 veces mayor que la actividad enzimática del grupo de alto índice de caries. Las diferencias de actividad en el presente estudio fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Al igual que en nuestro estudio, una investigación longitudinal en niños, presentó resultados inesperados sobre la actividad de ureasa en saliva, se encontró diferencias significativas entre grupos con distintos riesgo de caries, encontrando que la actividad de ureasa en saliva tenía efecto significativo en el riesgo de caries (10). Los resultados de la actividad enzimática de ureasa en saliva apoya la hipótesis del rol protector de este sistema, considerando que la saliva es la principal fuente de urea oral.

Al comparar la actividad enzimática de ureasa en biopelícula de grupos de menor y mayor índice de caries, las diferencias entre los grupos no son estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), a consecuencia de las oscilaciones de los valores de actividad en los grupos intermedios. Estos resultados concuerdan con la investigación longitudinal que se realizó durante 3 años en niños escolares, donde tampoco hubo diferencias entre los grupos (10). La razón para los resultados del presente estudio, podría deberse a la mala reproductibilidad de la actividad de ureasa en biopelícula, ya que las muestras de biopelícula se tomaron de distintas

superficies dentales, con distinta susceptibilidad a caries dental, por lo tanto su composición podría ser distinta. Otro factor que pudo haber influido considerablemente en las mediciones, es que no existió manera de controlar el ayuno antes de la toma de muestras debido a la corta edad de los niños, además el horario de toma de muestras no pudo ser regulado dadas las limitaciones de cada colegio participante. De acuerdo a estudios actuales, el consumo de azúcar previo a la toma de muestras, se encuentra asociado negativamente con la actividad de ureasa en biopelícula, ya que el consumo de éstos produce bajas de pH, que deprimen la actividad de este sistema (17). Esta asociación entre el consumo de carbohidratos y niveles de ureasa en biopelícula, refleja a la vez, una menor proporción de bacterias ureolíticas. El consumo frecuente de azúcares, tales como la sacarosa, no sólo conduce a un aumento de las bacterias cariogénicas, sino que también a la disminución de la producción de amonio protector de especies beneficiosas para la salud oral (25-26).

Al comparar actividad enzimática de SAD entre los distintos grupos estudiados, tanto en saliva como en biopelícula, los resultados no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0,05$ ). Similares resultados obtuvo Nascimento y colaboradores en la actividad de SAD en biopelícula oral, contrariamente Gordan y colaboradores (9) en el año 2009, encontró que la actividad de SAD en biopelícula era tres veces más alta en aquellos sujetos libre de caries.

Sin embargo, aunque los valores de éste estudio no son estadísticamente significativos, los mayores niveles del sistema enzimático SAD en biopelícula y saliva, si podrían ser biológicamente significativos, si estos son capaces de impactar el balance ácido-base en boca, lo mismo sucedería con la actividad de ureasa. Siguiendo la misma línea, en un estudio *in vitro*, donde niveles de ureasa que pueden ser manipulados y producidos por *S. mutans* recombinante, se observó que pequeños incrementos en la actividad de esta enzima originaban disminuciones significativas en la acidificación del entorno (27-28). Por lo tanto, La generación de álcali en el medio bucal por parte de ambos sistemas enzimáticos, ureasa y SAD crea un ambiente protector de la microbiota compatible con salud e inhibe a la vez la microbiota cariogénica.

Los resultados de este estudio muestran que existe mayor actividad específica de SAD al compararla con actividad de ureasa, tanto en saliva como en biopelícula. Como se mencionó anteriormente, se observó que el pobre control de ayuno tuvo mayor impacto sobre las mediciones de ureasa en biopelícula, ya que según Nascimento (12), en adultos la actividad de esta enzima en biopelícula debió ser mayor que la actividad de SAD. Sin embargo, no existen referencias que nos permitan comparar el comportamiento de la actividad de ambas enzimas en niños.

Se observó también que en ambos sistemas enzimáticos, la mayor actividad se presenta en biopelícula oral, en desmedro de la actividad en saliva. Este aumento de álcali en biopelícula por parte de ambos sistemas enzimáticos, es similar a otros estudios transversales donde la actividad ureasa en la biopelícula de sujetos con bajo índice de caries, eran más altos que en muestras de saliva del mismo sujeto (9,12).

Es importante mencionar que algunos estudios reflejan que la capacidad de generar álcali y por consiguiente, la actividad enzimática medida en saliva y biopelícula oral, es influenciada por un sin número de factores dependientes del huésped; cómo microbiota oral presente, dieta, condiciones de higiene oral, y la presencia de factores que tienen efecto en las células al internalizar los sustratos o la misma enzima. Estudios *in vitro* han demostrado que la enzima ureasa en saliva y biopelícula, rara vez se expresa constitutivamente. En la mayoría de las veces esta enzima es regulada de acuerdo a factores ambientales, como la disponibilidad de sustrato, la presencia de nitrógeno, la disponibilidad de carbohidratos y variaciones de pH (29-34).

Al analizar y comparar este estudio con un estudio longitudinal realizado en niños de 3 a 5 años (10), nos damos cuenta de varias limitantes en el método de muestreo, al no evidenciarse un equilibrio entre varios factores que pudieron afectar los resultados, tales como; el consumo de azúcar durante las últimas horas, horario de muestreo, recolección de biopelícula en diferentes sitios, distintos suministros de agua fluorurada. Sobre ésta última es importante señalar,

que los colegios estudiados correspondían a distintas zonas geográficas abastecidas con distintas concentraciones de agua fluorurada, y diferentes fuente de fluoruros, considerando que la presencia de flúor puede influir, debido a que se ha comprobado que éste actúa disminuyendo la producción alcalina a partir de urea a través de mecanismos inhibitorios directos o indirectos (29).

Se encontró también, que los índices de caries COPD y ceod, presentan tendencia a aumentar en niños que habitan en zona rural. Las diferencias no significativas entre las poblaciones urbano y rural ( $p > 0,05$ ), pueden deberse a la implementación de un Programa Piloto de Alimentación Escolar de fluoruración de la leche, llamado PAE Fluorurado (0,625 mg de flúor por porción), aplicado a niños de primero a octavo básico de colegios de zonas rurales con difícil acceso al abastecimiento de agua fluorurada, tal como lo es Melipilla (35).

Aunque las variaciones de actividad enzimática entre los grupos no fueron significativas, excepto en ureasa en saliva, existe tendencia de mayor actividad de ureasa y SAD en saliva al disminuir el índice de caries, resultados que pueden abalar el rol protector de ambos sistemas enzimáticos contra las caries. Considerando que la medición de actividad enzimática de SAD y ureasa es sensible y los resultados de estudios pueden variar, incluso dentro de la misma especie y cepas bacterianas, debido a que enzimas y bacterias orales son dependientes del ambiente, y en consecuencia, también lo es la producción de álcali, son necesarias nuevas investigaciones para el análisis de la producción de álcali en niños, con un protocolo más normalizado de muestreo de saliva y biopelícula, y control de factores relacionados con la producción de amonio.

En futuros estudios de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, focalizados a la generación de álcali como un modelo de control y prevención de caries, es recomendable agregar nuevos parámetros para tipificar de mejor manera la evidencia clínica de caries dental, tales como profundidad, etapa, actividad, además de un acucioso análisis microbiológico para la obtención de resultados más certeros y confiables.

## **CONCLUSIONES**

Las muestras analizadas indican que el aumento de actividad de ureasa en saliva se asocia con la disminución de índices de COPD/ceod en niños de 8 años provenientes de la R.M., generando producción de álcali de forma significativa.

El aumento de actividad de ureasa en biopelícula y SAD en saliva y biopelícula no se asocia con la disminución de índices de COPD y ceod en niños de 8 años.

En saliva el sistema enzimático SAD presenta tendencia al aumento en niños de menores índices de COPD/ceod., aunque esta disminución no es significativa, estos resultados se deben probablemente a factores externos no controlados.

En saliva y biopelícula dental en niños de 8 años de edad existe una mayor producción de amonio por parte del sistema enzimático SAD.

Los sistemas enzimáticos SAD y ureasa, presentan mayor actividad en biopelícula dental de niños de 8 años de edad.

Se requiere mayor normalización en toma de muestras para la medición de actividad de ambos sistemas enzimáticos en biopelícula oral.

Se aprecia tendencia a presentar índices de caries más altos en zona rural con respecto a zona urbana, en niños de 8 años de edad.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1). Hoo-Yeon Lee, Youn-HeeChoi, Hyoung W. Park, Sang G Lee (2012). Changing patterns in the association between regional socio-economic context and dental caries experience according to gender and age: A multilevel study in Korean adults. *International Journal of Health Geographics*; 11:30.
- (2). Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. (2009). The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent*; 22(1):3-8.
- (3). Alkarimi H, Watt R, Pikhart H, Jawadi A, Sheiham A, Tsakos G (2012). Impact of treating dental caries on schoolchildren's anthropometric, dental, satisfaction and appetite outcomes: a randomized controlled trial. *BMC PublicHealth*; 12:706.
- (4). Ceballos M, Acevedo C y col. (2007). Diagnóstico en Salud Bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar en la Región Metropolitana. Minsal.
- (5). Soto L, Tapia R, Jara G, Rodríguez G, Urbina T, Venegas C y cols. (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. Minsal.
- (6). Badenier O, Cueto A, Moya R y col (2007). Estudio de Prevalencia de las enfermedades bucodentales y necesidades de tratamiento en la V Región. Minsal.
- (7). Gamonal J. (1996). 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. MSc Tesis, Facultad Odontología Universidad de Chile.

- (8). Usha Carounanidy y R Sathyanarayanan (2009). Dental caries: A complete changeover (Part II)-Changeover in the diagnosis and prognosis. *J Conserv Dent*; 12 (3): 87–100.
- (9). Gordan VV, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D y col. (2011). Could Alkali Production Be Considered an Approach for Caries Control?. *Caries Res*; 44(6): 547–554.
- (10). Morou E, Elías-Boneta A, Billings R, Burne R, García-Rivas V, Brignoni-Nazario V y col. (2011). Urease activity as a risk factor for caries development in children during a three-year study period: A survival analysis approach. Volume 56, Issue 12; Pages 1560-1568.
- (11). Ya-Ling Liu, Nascimento M y Burne RA. (2012). Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *International Journal of Oral Science*; 4(3): 135–140.
- (12). Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA (2009). Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol*; 24(2): 89-95.
- (13). Reyes É, Martín J, Yevenes I, Neira M, Palma P, Gordan V y cols. (2012). Actividad y efectos de ureasa y arginina deiminasa en saliva y biopelícula oral humana. *Rev. Fac. Odontol. Univ. Antioq.* 2012; 23(2): 343-352.
- (14). Bradshaw DJ, Marsh PD (1998). Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res*; 32(6): 456-462.
- (15). Burne RA (1998). Oral streptococci: products of their environment. *J Dent Res*; 77(3): 445-452.
- (16). Marsh PD (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*; 8(2): 263-271.



- (17). Morou-Bermudez E, Elías-Boneta A, Billings RJ y col. (2011). Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors. *Arch Oral Biol*; 56(11): 1282–1289.
- (18). Chen YY, Clancy K A, Burne R A (1996). *Streptococcus salivarius* urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque streptococcus. *Infect. Immun.* ; 64(2): 585.
- (19). Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X y cols (2013). Oral Arginine Metabolism May Decrease the Risk for Dental Caries in Children. *J Dent Res*; 92(7):604-608.
- (20). Casiano-Colón A, Marquis R E (1988). Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol*; 54(6):1318.
- (21). Correa AB, Pereira da Silva E, Cortelazzi KL, Bovi GM, Videira A; Marcelo de Castro My col. (2010). Epidemiological assessment of predictors of caries increment in 7-10- year-olds: a 2-year cohort study. *Journal of Applied Oral Science*; 1678-7757.
- (22). Holmgren C.J y col (1997). Encuesta de salud bucodental, métodos básicos. Organización Mundial de la Salud. Cuarta Edición; 99/11416.
- (23). Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 150 (1): 76-85.
- (24). Lloret SM, Andrés JV, Legua CM, Falcó PC (2005). Determination of ammonia and primary amine compounds and Kjeldahl nitrogen in water samples with a modified Roth's fluorimetric method. *Talanta* 28; 65(4):869-75.

- (25). Sissons CH, Perinpanayagam HE, Hancock EM, Cutress TW(1990). pH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. *J Dent Res.*; 69:1131–1137.
- (26). Chen YY, Burne RA (1996). Analysis of *Streptococcus salivarius* urease expression using continuous chemostat culture. *FEMS Microbiol Lett.* ;135:223–229.
- (27). Clancy A, Burne RA (1997). 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.*; 151:205–211
- (28). Marsh PD (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.*; 8:263–271.
- (29). Barboza-Silva E, Castro AC, Marquis RE (2005).Mechanisms of inhibition by fluoride of urease activities of cell suspensions and biofilms of *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* and of dental plaque. *Oral Microbiol Immunol.* ; 20(6):323-32.
- (30). Curran TM, Ma Y, Rutherford GC, Marquis RE (1998).Turning on and turning off the arginine deiminase system in oral streptococci. *Can J Microbiol.*; 44(11):1078-85.
- (31). Liu Y, Hu T, Jiang D, Zhang J, Zhou X (2008).Regulation of urease gene of *Actinomyces naeslundii* in biofilms in response to environmental factors. *FEMS Microbiol Lett.*; 278(2):157-63.
- (32). Ma Y, Rutherford GC, Curran TM, Reidmiller JS, Marquis RE (1999). Membrane locus and pH sensitivity of paraben inhibition of alkali production by oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* ; 14(4):244-9.

- (33). Phan TN, Buckner T, Sheng J, Baldeck JD, Marquis RE (2004). Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* ; 19(1):31-8.
- (34). Burne RA, Marquis RE (2000). Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett.*; 193(1): 1-6.
- (35). Barría M S (2008). Exenta N° 518. Minsal, Subsecretaría de Salud Pública.

## ANEXOS

### ANEXO N° 1.

#### Preparación de reactivos utilizados.

##### 1- Preparación de 100 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM a pH 7.

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

PM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro: 174,18 g/mol

100 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM= 100 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> · C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

PM C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> = 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.

C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> · C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

PM C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> = 237,21 g/mol

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

0,5 M= 0,5 mol/1000 ml = 0,025 mol en 50 ml

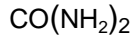
1 mol / 237,21 g=0,025 mol / x g = 5,93025 g

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.



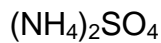
PM  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 = 60,06 \text{ g/mol}$

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

1 mol / 60,06 g = 0,05 mol / x g = 3,003 g

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

Origen reactivo: Sigma-Aldrich. Grado reactivo.



Molecular Weight: 132,14g/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 N° 2: Certificado Comité de Bioseguridad



Comité Institucional de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte

FDO N°9

Santiago, 3 de Agosto de 2013.

### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso Fonis 2013, titulado “**Cuantificación y caracterización de la producción de álcali por cepas bacterianas del biofilm dentario y saliva en pacientes con o sin lesiones activas de caries**”. El investigador responsable de este proyecto es el Dr. Gustavo Moncada.

Los procedimientos experimentales, que involucran tanto el manejo de material biológico y de microorganismos patógenos, así como el uso de agentes químicos de riesgo, se realizarán en el Laboratorio de Química perteneciente al Departamento de Ciencias Básicas y Comunitarias y en el laboratorio de Microbiología, perteneciente al Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

El CIB certifica que los laboratorios y la Facultad mencionada anteriormente, cuentan con las facilidades para el manejo y desecho del material químico y biológico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Moncada para ser presentado al Concurso FONIS 2013.

**Dr. Mario Chiong**  
**Presidente**

**Dra. Andrea Paula-Lima**  
**Secretaria**

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 9781793-9781832, Fax: 9781748, Santiago. <http://odontologia.uchile.cl>  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 9781792 Fax: 9781748, Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>

## Anexo N° 3: Consentimiento informado



### Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación

**Título del Protocolo:** Caracterización de la producción de álcali por cepas bacterianas de placa microbiana y saliva en pacientes con distinta historia de caries dental.

**Investigador Principal:** Dr. Gustavo Moncada

**Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile–Olivos943–Santiago.

**Nombre del Paciente (niño):**.....

Mi nombre es Gustavo Adolfo Moncada Cortes, académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación que busca detectar una nueva forma de mantener a la población libre de lesiones de caries en sus dientes, al conocer la actividad de ciertos compuestos químicos y su producción en la saliva y placa bacteriana, considerando sus efectos sobre los dientes.

Le proporcionaré información e invitaré a su hijo(a) o pupilo(a) a ser parte de este estudio. No tiene que decidir hoy si lo harán o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si usted desea que su hijo(a) o pupilo(a) participe, se le solicitará que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo de la Investigación, Tipo de Intervención y procedimiento, Beneficios y Riesgos Asociados a la Investigación, criterios de inclusión-exclusión y Aclaraciones.

Informo a Ud. Que su hijo(a) o pupilo(a) será reforzada las técnicas de higiene oral y se aclaran dudas en caso de presentar consultas. Además se le proporcionará un cepillo dental y un tubo de pasta de dientes.





### **Justificación de la Investigación**

La caries dental es la enfermedad buco-dental más prevalente en Latinoamérica, siendo la enfermedad crónica más frecuente en la población, afectando a más del 96% de los adultos.

En Chile la realidad no es distinta, la caries dental aumenta sostenidamente con la edad, según la edad del grupo estudiado, 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.

Su origen es infeccioso y se asocia con la presencia de altas poblaciones de bacterias adheridas sobre los dientes. Las lesiones de caries se establecen tanto en dientes sanos como en dientes que han sido restaurados (tapadura),

El análisis de la actual investigación, nos permite estudiar una nueva forma preventiva en el conocimiento de la enfermedad caries dental, donde algunos compuestos propios de la boca, actuarían como un importante factor que reducen el apareamiento de lesiones de caries dental. Estos compuestos de amonio podrían inhibir potencialmente el desarrollo de la caries dental porque neutralizaría los ácidos que deterioran los dientes y modificaría la proporción de los gérmenes que producen las caries, 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 la comprensión de la caries dental, particularmente en niños, con la finalidad futura de buscar nuevas formas para prevenir la caries dental. Su fecha de inicio es Marzo de 2013.

### **Objetivo de la Investigación**

El presente estudio tiene por objeto recolectar muestras de saliva y placa bacteriana ubicada sobre los dientes de su hijo(a) o pupilo(a) para medir la cantidad de ciertos compuestos que podrían entenderse como protectores de la generación de caries que tienen la boca de hijo(a) o pupilo(a).

### **Beneficio de participar en esta Investigación.**

Usted aportará información no disponible sobre las ventajas y desventajas de conocer la presencia y cantidad de compuestos propios de la boca que funcionarían como protectores contra las caries.

Adicionalmente se reforzará la técnica de higiene oral de su hijo(a) o pupilo(a) y se le entregará un informe escrito con el actual estado de su salud oral.

### **Tipo de Intervención y Procedimiento.**

Si usted decide que su hijo(a) o pupilo(a) participe se le realizará un examen bucal con evaluación de la saliva y placa bacteriana y se le instruirá sobre la mejor técnica de higiene oral.

Se coleccionará 5ml de saliva completa que se depositará en un tubo estéril que se mantendrá a baja temperatura (4°C). El fluido de placa será recogido de las superficies dentales con material apropiado estéril y colectado en tubos rotulados en una solución de acidez controlada, que se mantendrá a baja temperatura (4°C). El almacenamiento y procesamiento se hará en las dependencias de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.



### **Riesgo de participar en la Investigación.**

Su hijo(a) o pupilo(a) no correrá ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que en esta oportunidad no será sometido(a) a ningún procedimiento, solo se efectuará la toma de muestra no invasiva y se evaluará la condición de los dientes. En caso que alguno de ellos presente problema, será informado por escrito para que sea atendido en la clínica correspondiente para su tratamiento en las condiciones que los protocolos recomienden.

### **Criterios de Inclusión y Exclusión**

Inclusión: niños 6-7 años, de ambos sexos con y sin lesiones de caries dentarias.

Exclusión: enfermedades que afecten la tasa de secreción salival, ingesta antibióticos, uso de enjuagatorios bucales, si su hijo(a) o pupilo(a) presenta alguna o varias condiciones mencionadas, queda impedido de participar en el estudio.

### **Aclaraciones**

- La participación es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención
- Si usted decide, puede retirarse del estudio cuando lo desee.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Una vez concluido el presente estudio, los voluntarios participantes recibirán un informe escrito en sobre cerrado entregado en el colegio respectivo.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable o solicitar la exposición a la comunidad educativa los resultados.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será codificada para garantizar la confidencialidad de los datos por parte de los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar el Formulario de Consentimiento Informado anexo al documento.
- En caso de cualquier duda Ud. Puede acudir a Av. La Paz 571, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Área de Operatoria Dental los días Lunes de 8 a 13 horas o Miércoles de 14 a 19 horas o comunicarse con Gustavo Moncada o Javier Martin al número 02-978-1742.
- El presente Consentimiento ha sido visado por la Comisión de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Preside el comité, Prof. Dr. Juan Cortés Araya, Cirujano dentista, Profesor Titular, Vicedecano de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, e-mail: [vicedeca@odontologia.uchile.cl](mailto:vicedeca@odontologia.uchile.cl).



### **Formulario de Consentimiento Informado**

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado(a) y comprendo la necesidad y fines del estudio que se le realizará a mi hijo(a) o pupilo(a).

- 3. Tengo conocimiento del procedimiento que se le realizará a mi hijo(a) o pupilo(a).
- 4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
- 5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para la salud de mi hijo(a) o pupilo(a).
- 6. Además de esta información que he recibido, seré informado/a en cada momento y al requerimiento de la evolución del proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
- 7. Autorizo a usar el caso de mi hijo(a) o pupilo(a) para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad

Yo , rut\_, Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, para realizar e procedimiento diagnóstico pertinente a mi hijo(a) o pupilo(a).....nacido el .....(día/mes/año) y autorizo la utilización de las muestras de saliva y Biopelícula oral de mi hijo(a) o pupilo(a), donadas voluntariamente, para ser estudiadas y analizadas en el marco de este proyecto de investigación para la medición de la actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva y placa dental realizada por el Odontólogo Dr. Gustavo Moncada Cortes. Además fui informada(o) que para este estudio sólo se utilizarán de mis datos aportados: la cantidad de dientes cariados, sanos, obturados (tapados) y perdidos de mi hijo(a) pupilo(a), el resto de los datos personales serán absolutamente resguardados. Acepto PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS Y EL DE MI HIJO(A) O PUPILO.

---

Nombre del Padre-Madre, Tutor o Representante Legal:

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha de Toma del CI: \_\_\_\_\_

---

Nombre del Investigador que toma el CI:

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha de Toma del CI: \_\_\_\_\_

---

Nombre del Investigador Principal

Firma: \_                      Fecha:



**Anexo N° 4: Ficha clínica**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**FICHA DE SALUD ORAL**

**NOMBRE DE COLEGIO:**.....

**COMUNA:**.....**REGIÓN:**.....

AÑO (4)	MES (5)	DIA (6)	Nº FICHA (7)	Nº EXAMINADOR (8)
<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>	<input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>

**INFORMACIÓN GENERAL:**

**NOMBRE (9)** .....

Cumple con ayuno y abstenerse de higiene oral durante últimas 10 horas:.....

**EDAD EN AÑOS (10)**

--	--

**GÉNERO (11)**                      M= 1    F= 2

--

**LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA (12)**

URBANA=1    RURAL=2

--

**ESTADO SOCIOECONÓMICO (13)**

**1= ALTO                      2=MEDIO                      3= BAJO**

--

**TIPO DE DENTICIÓN Y NECESIDADES DE TRATAMIENTO (14)**



**1 = TEMPORAL**

**2 = MIXTA PRIMERA FASE. (INCIS., 1° M. PERMAN.)**

**3 = MIXTA SEGUNDA FASE. (PREMOLARES) 4 = PERMANENTE (COMPLETA PERMANENTE)**

**MAXILAR SUPERIOR**

		<b>55</b>	<b>54</b>	<b>53</b>	<b>52</b>	<b>51</b>		<b>61</b>	<b>62</b>	<b>63</b>	<b>64</b>	<b>65</b>				
<b>D</b>	(15)													(24)		
<b>T</b>	(25)													(34)		
		<b>17</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>11</b>		<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>
	(35)															(48)
	(49)															(62)

**MAXILAR INFERIOR**

		<b>47</b>	<b>46</b>	<b>45</b>	<b>44</b>	<b>43</b>	<b>42</b>	<b>41</b>		<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>
	(63)															(76)
	(77)															(90)
		<b>85</b>	<b>84</b>	<b>83</b>	<b>82</b>	<b>81</b>				<b>71</b>	<b>72</b>	<b>73</b>	<b>74</b>	<b>75</b>		
<b>D</b>	(91)															(100)
<b>T</b>	(101)															(110)

DIENTE TEMPORAL (T) PERMANENTE (P)

Diagnóstico

Tratamiento

**T P**

A	0	=	SANO	0	=	NO NECESITA
B	1	=	CARIADO	1	=	SELLANTE O DETENCIÓN DE CARIES
C	2	=	OBTURADO Y CARIADO	2	=	OBTURAR UNA SUPERFICIE
D	3	=	OBTURADO	3	=	OBTURAR DOS O MÁS SUPERFICIES
E	4	=	PERDIDO POR CARIES	4	=	CORONA O PILAR DE PUENTE
F	5	=	INDICACIÓN EXTRACCIÓN POR CARIES	5	=	INTERMEDIARIO
G	6	=	PERDIDO POR OTRA RAZÓN	6	=	TRATAMIENTO PULPAR
H	7	=	CORONA O PILAR DE PUENTE	7	=	EXTRACCIÓN
I	8	=	NO ERUPCIONADO	8	=	OTRAS NECESIDADES
J	9	=	EXCLUIDO	9	=	ESPECIFICAR.....

**COPD : \_\_\_\_\_ ceod: \_\_\_\_\_**

<i>C</i>	<i>O</i>	<i>P</i>

<i>c</i>	<i>e</i>	<i>o</i>

Índice de Green y Vermellón: \_\_\_\_\_

## **INSTRUCTIVO DE FICHA DE SALUD BUCAL**

**Colegio:** Coloque el nombre del establecimiento

**Comuna:** Indique la comuna a que pertenece

**Fecha:** El año, mes y día registrarlos sólo el día del examen.

**Número de Ficha:** Cada niño debe tener su número de identificación y es necesario que cada número de ficha se use una sola vez.

**Examinador:** Cada examinador tiene asignado un número y un volumen de fichas en forma correlativa.

<b>NOMBRE EXAMINADOR</b>	<b>NÚMERO ASIGNADO</b>	<b>No de FICHA</b>
Lorena Duperat	1	
Jéssica Maureira	2	

**Nombre del alumno:** El nombre del alumno debe registrarse con letra imprenta empezando por el apellido.

**Edad:** Colocar la edad en años cumplidos.

**Localización geográfica:** Especificar si es urbana o rural

### **REGISTRO DE ÍNDICES: COP-D y ceo-d**

**Registro de los dientes presentes:** Encerrar en un círculo la nomenclatura correspondiente.

Ej. Encerrar (55) o (15).

**Diagnóstico y Tratamiento:** Anotación en los recuadros.

**ESTADO:** En los recuadros, 15-24; 35-48; 63-76 y 85-75, anotar el diagnóstico de acuerdo a los códigos de la columna izquierda.

**TRATAMIENTO:** En los recuadros 25-34; 49-62; 77- 90 y 101-110, anotar el tratamiento indicado de acuerdo a los códigos de la columna derecha

**ÍNDICE DE GREEN Y VERMELLON:** colocar en la casilla, el número correspondiente al índice de green y vermellón. Piezas superiores es medido por la cara vestibular y piezas inferiores por la cara lingual.

**Anexo N°5: informe de caries**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**“INFORME DE DIAGNÓSTICO Y NECESIDAD DE TRATAMIENTO DE LOSALUMDEL COLEGIO....., PARTICIPANTES DEL ESTUDIO MEDICIÓN DE ALCALI MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE UREASA Y ARGININA DEIMINIASA EN SALIVA Y PLACA DENTAL EN NIÑOS DE 8 AÑOS, CON DISTINTA HISTORIA DE CARIES DENTAL”**

**Nombre del alumno:.....**

**Diagnóstico**

Gingivitis (inflamación de la encía):	Sí	No	
Caries:	Sí	No	Nº:
.....			

**Tratamiento**

Profilaxis (limpieza):	Sí	No	
Exodoncias (Extracciones):	Sí	No	Nº:
.....			
Obturaciones (tapaduras):	Sí	No	Nº:
.....			
Sellantes:	Sí	No	Nº:
.....			

**Observaciones:.....**  
 .....  
 .....  
 .....