



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

**“Cuantificación de la producción de amonio y actividad específica de ureasa y arginina deiminasa por cepas bacterianas del biofilm oral supragingival y de saliva en niños de 6 años con y sin lesiones activas de caries dental”.**

**Camila Concha Celume**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**TUTORES ASOCIADOS**

**BQ. Miguel Neira Jara.**

**Prof. Dr. Gustavo Moncada Cortés.**

**Adscrito a Proyecto de Investigación en Salud Fonis SAE 13 I20 205  
Santiago - Chile  
2015**





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

**“Cuantificación de la producción de amonio y actividad específica de ureasa y arginina deiminasa por cepas bacterianas del biofilm oral supragingival y de saliva en niños de 6 años con y sin lesiones activas de caries dental”.**

**Camila Concha Celume**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**TUTORES ASOCIADOS**

**BQ. Miguel Neira Jara.**

**Prof. Dr. Gustavo Moncada Cortés**

**Adscrito a Proyecto de Investigación en Salud Fonis SAE 13 I20 205  
Santiago - Chile  
2015**

A mi familia por el apoyo incondicional.

*“Para abrir nuevos caminos, hay que inventar; experimentar; crecer, correr riesgos, romper las reglas, equivocarse... y divertirse.”*

Mary Lou Cook

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por el amor, consejos y apoyo incondicional que me han entregado durante esta etapa de mi vida. A toda mi familia por el cariño y comprensión durante momentos difíciles. A mi hermana por ayudarme a desarrollar este proyecto de tesis.

A Álvaro por acompañarme, apoyarme, motivarme a alcanzar mis metas, entregarme alegrías y estar a mi lado.

A mis amigos por las conversaciones, momentos de alegrías, risas y dispersión, palabras de aliento en momentos complicados.

A Prof. Ismael Yévenes, Miguel Neira, Lorena Duperat, Dr. Javier Martín, Dra. Simone Faleiros, Mario Díaz por su ayuda, paciencia y apoyo.

Al laboratorio de química y microbiología por permitir trabajar en sus instalaciones.

## ÍNDICE

|   |              |
|---|--------------|
| <b>RESUMEN .....</b>                    | <b>7-8</b>   |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>               | <b>9</b>     |
| <b>MARCO TEÓRICO .....</b>              | <b>10-20</b> |
| <b>HIPÓTESIS .....</b>                  | <b>21</b>    |
| <b>OBJETIVO GENERAL.....</b>            | <b>21</b>    |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>      | <b>21</b>    |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>        | <b>22-34</b> |
| <b>RESULTADOS .....</b>                 | <b>35-47</b> |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>                  | <b>48-51</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>               | <b>52</b>    |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>53-69</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                     | <b>60-80</b> |

## Resumen

### Introducción

La producción de amonio por parte de bacterias “saludables” o compatibles con salud oral de microbiota supragingival y película salival, es realizada principalmente por la acción de dos vías enzimáticas: sistema arginina deiminasa (SAD) y ureasa (U). Estas vías generan amonio mediante el metabolismo de arginina e hidrólisis de urea respectivamente, provocando aumento del pH y manteniendo así la homeostasis del ecosistema oral supragingival. Por lo tanto, las actividades enzimáticas nombradas están asociadas a menor riesgo y severidad de caries dental; tales procesos no han sido investigados en población chilena, y es lo que se pretende investigar en este trabajo, la implicancia de tales sistemas en el proceso carioso.

### Material y Método

Se recolectó muestras de saliva y biofilm oral supragingival, por un examinador calibrado en criterio ICDAS (sistema internacional para la identificación y valoración de caries dental) e índice COPD/coed (dientes cariados, perdidos y obturados), de niños de 6 años de edad con y sin lesiones cariosas, obteniendo 70 muestras (nivel de confianza), las que se mantuvieron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día del procesamiento. Se desarrolló una ficha clínica para cada niño, donde se determinó el código ICDAS e índice COPD/coed, agrupando a los niños en: bajo, moderado y alto riesgo. Se realizó curvas de calibración de amonio y de proteínas totales para medir la concentración de amonio y la actividad enzimática específica (AE) de SAD y ureasas mediante el método cuantitativo espectrofotométrico.

### Resultados

La muestra presentó una distribución no paramétrica. El test de Kruskal-Wallis muestra que no hay diferencias significativas entre la actividad de U y SAD en saliva y biofilm oral supragingival tanto en los grupos de COPD/coed como en ICDAS ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, existe tendencia de mayor actividad de U y SAD en grupos de menor riesgo de caries (bajo) en ICDAS. Por último, encontramos que hay asociación negativa significativa ( $p = 0,038$ ) entre el nivel de caries y la AE de ureasa en saliva.

## **Conclusiones**

Una mayor actividad de U y SAD en saliva y biofilm oral supragingival no se asocia con una disminución de COPD/ceod. Existe tendencia que a mayor actividad de ureasa y SAD en saliva y biofilm oral supragingival hay menor riesgo de lesiones cariosas, en los grupos libres de caries (bajo) clasificados por ICDAS.

Finalmente, existe asociación negativa significativa entre la actividad de ureasa y la severidad de caries. Por lo tanto, concluimos que, a mayor severidad y riesgo de caries menor actividad de ureasa.



## Introducción

La caries dental es la enfermedad multifactorial más difundida a nivel mundial, ya que, a pesar de existir múltiples investigaciones sobre su etiología que buscan cómo combatir su severidad, prevalencia y erradicación en la población, no son suficientes, porque sigue siendo una de las enfermedades orales que afecta en mayor envergadura la calidad de vida de los individuos. Por esta razón, ha sido un gran desafío sanitario para la sociedad científica y la OMS (Petersson G y Bratthall D. 1996, Urzua I. y cols. 2012).

En las últimas décadas se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* basados en una nueva dimensión preventiva. Como ejemplo tenemos que, la formación de amonio en nivel significativo presente en el medio ambiente oral supragingival actuaría como un importante factor endógeno inhibitorio para el desarrollo de lesiones de caries dental (Gordan V y cols. 2010).

La producción de álcali en la cavidad oral, es modulada por la acción del sistema arginina deiminasa (SAD) y la actividad enzimática de ureasas (U) de algunas bacterias del biofilm oral supragingival y biopelícula salival, generando la neutralización de ácidos y estabilidad del medio ambiente oral, es decir, un entorno favorable para la mantención de una microbiota saludable (Gordan V y cols. 2011, Nascimento M y cols. 2013).

Este nuevo avance, ha permitido realizar estudios comparativos entre pastas dentales con arginina y pastas convencionales, para poder comprobar la existencia de una mayor eficacia de este nuevo dentífrico versus el convencional en individuos con lesiones de caries activas, y a la vez entender los nuevos mecanismos involucrados en el inicio y/o desarrollo del proceso carioso (Cummins D. 2013).

En este proyecto de investigación determinamos el nivel de actividad de los sistemas arginina deiminasa y ureasa en saliva y biofilm oral supragingival en niños chilenos de colegios de la zona norte de la Región Metropolitana. La proyección de este objetivo es comprender los mecanismos implicados en la formación y desarrollo del proceso de caries dental, y así buscar nuevas estrategias para combatir la severidad y prevalencia de caries en la población chilena.

## Marco Teórico

### 1. Epidemiología de la caries dental

La caries dental corresponde a unas de las enfermedades orales, más prevalente y de mayor severidad en la población mundial (Petersson G y Bratthall D 1998 y Urzua I y cols. 2012). Afecta a más de la mitad de la población de países desarrollados y en vías de desarrollo, y tiene un efecto acumulativo en ella (Petersson G y Bratthall D 1996, Urzua I y cols. 2012). Incluso, se ha observado un aumento en la prevalencia tanto en niños como en adultos, es decir, un problema de salud pública a nivel mundial (Bagramian RA y cols. 2009). Por ejemplo, en América latina y Asia corresponde a la enfermedad oral más prevalente, siendo menos común y severa en África (Petersen P. 2003).

La OMS publicó que, a pesar de haber disminuido la prevalencia de caries en el mundo, sigue siendo un desafío su erradicación, indicando que entre el 60 y 90% de los escolares presentan caries dental. Por lo tanto, proponen investigar nuevos métodos para su prevención (Petersen P. 2003).

Según un estudio realizado por Urzúa y cols. 2012, se ha documentado que en la población chilena adulta ha disminuido la prevalencia de caries en la última década. A pesar de esto, su incidencia sigue siendo alta, sobre todo en la población de bajo y medio-bajo nivel socioeconómico (NSE), por lo que sugiere implementar nuevas políticas públicas de salud adecuadas a las características de nuestra la población.

La percepción y valoración de la calidad de vida se ve fuertemente afectada por la presencia y experiencia de lesiones de caries dental. Según la Encuesta Nacional de Calidad de Vida del 2006, un 37% de la población mayor de 15 años señala que su salud bucal afecta siempre o casi siempre en su calidad de vida.

Otros estudios demuestran que en Chile la prevalencia de caries aumenta según la edad: 17% a los 2 años, 48,02% a los 4 años, 70,36% a los 6 años, 62,5% a los 12 años, incrementando drásticamente a un 95% en la población entre 35 a 74 años (Ceballos M y cols. 2007, Soto L y cols. 2007, Badenier O y cols. 2007, Moncada G y Urzua I. 2008). Demostrando el gran problema de salud oral presente en nuestro país.

Por último es importante destacar que, la población de 6 años de edad corresponde a una etapa importante, ya que comienza el cambio de dentición temporal a mixta, o sea, la erupción de dientes permanentes, siendo necesario el especial cuidado en la prevención del desarrollo de la lesión de caries dental para el crecimiento y desarrollo de los niños. Un estudio realizado por Soto L y cols. 2007, concluyó que el promedio de dientes afectados según el índice ceod/COPD en dentición temporal fue de 3,7 y en dentición permanente de 0,16. También destacó que hay diferencias significativas en la prevalencia y severidad de lesiones de caries en niños de 6 años, según el NSE; donde el 59,7% de los niños de 6 años de NSE alto se encuentran libre de historia de caries, y sólo el 22,1% de los niños y niñas de NSE bajo se encuentran sanos. La severidad también muestra diferencias importantes, ya que el índice ceod de los niños de NSE alto es en promedio 1,36 mientras que sube a 4,42 en los niños de NSE bajo.

## **2. Caries dental**

Los microorganismos que colonizan la cavidad oral y conviven en equilibrio con las defensas del sistema inmunológico del huésped conforman el biofilm o biopelícula; si mantienen su hábitat en conjunto con la integridad de los tejidos orales, estamos en presencia de salud oral. (Aas JA y cols. 2008, Becker M y cols. 2002, Corby P y cols. 2005).

Para conservar la salud oral es necesario mantener en equilibrio todas las condiciones que la favorecen, como: las fluctuaciones de pH del medio ambiente oral, capacidad buffer de la saliva, fuente de sustancias nutritivas presente en la cavidad oral, potencial patógeno del microorganismo, etc. (Burne R. 2000). El cambio de alguno de los factores mencionados anteriormente, genera desequilibrio en la estructura de la microbiota oral supragingival favoreciendo el inicio y desarrollo de la enfermedad.

Adicionalmente, la presencia de hidratos de carbono fermentables en forma repetitiva favorece la disminución de pH promoviendo el crecimiento y desarrollo de microbiota acidógena y acidúrica, la cual se asocia con el mayor riesgo de desarrollar lesiones de caries dental (Pieralisi F y cols. 2010, Maeda T y cols. 2010, Cummins D. 2013, Maureira J. 2013, Gordan V y cols. 2010).

La acidificación del pH del ecosistema oral, genera cambios que permiten el desarrollo de factores nocivos para la mantención de la homeostasis del medio ambiente oral. Facilita la transformación de una microbiota saludable a una patogénica, y acelera la pérdida neta de minerales desde el tejido dentario al medio que lo rodea, lo que llamamos desmineralización; causando finalmente la lesión de caries dental (Moncada G y Urzua I. 2008, Kidd E. y Fejerskov O. 2004).

Según Manji y cols. 1991, el biofilm oral se encuentra en forma natural en las superficies de la cavidad oral y constantemente está provocando fluctuaciones en el pH, lo que genera un ciclo de remineralización y desmineralización constante en el medio oral. Cuando el proceso de desmineralización predomina por sobre el de remineralización se desarrolla la lesión de caries (Kidd E y Fejerskov O. 2004, Moncada G y Urzua I. 2008). Por lo tanto, la caries dental es un proceso dinámico y reversible, en que hay un balance entre los factores patológicos y protectores, cuando los factores patológicos sobrepasan los factores protectores, lleva a la desmineralización neta y a la formación o progresión de la lesión de caries (Cummins D. 2013).

La enfermedad caries dental es multifactorial; factores nutricionales, sociales, educacionales, genéticos, acceso a salud, microbiológicos, entre otros, están involucrados en su desarrollo (Kidd E y Fejerskov O. 2004). La microbiota oral azúcar-dependiente, se considera como su causante principal, donde especies bacterianas acidúricas y acidógenas, como *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), especie de *Lactobacillus* (*Lactobacillus* ssp), *Lactobacillus fermentum* (*L. fermentum*), fermentan hidratos de carbono presentes en el medio oral formando ácido láctico, el cual disminuye el pH a pH menor a 5,5, para así favorecer su crecimiento y desarrollo, a expensas de la desmineralización del tejido dentario iniciando el desarrollo de la lesión de caries (Pieralisi F y cols. 2010, Maeda T y cols. 2010, Gordan V y cols. 2011, Cummins D. 2013).

Aquellos individuos que presentan lesiones de caries activas, tienen niveles significativamente mayores de microorganismos azúcar-dependiente en comparación con aquellos libre de caries (Gordan V y cols. 2010). Se ha observado una correlación entre sujetos que no presentan caries y una proporción importante de microorganismos compatibles con salud oral, las que son capaces de mantener la homeostasis del pH salival. Dentro de las bacterias relacionadas con salud encontramos: *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*), *Streptococcus*

*parasanguinis* (*S. parasanguinis*), *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) y *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*) (Gordan V y cols. 2010, Liu Y y cols. 2012).

### **3. Urealisis y Arginolisis**

En literatura de los años 60, la línea de pensamiento consistía en que la acidificación del medio oral era el causante principal y exclusivo para el inicio y progresión de la lesión de caries. Sin embargo, a principio de los años 80, surgió una nueva línea de investigación, donde Kleinberg, definió que la generación de álcali de productos salivales de la cavidad oral, principalmente de arginina y urea, jugarían un papel importante en el pH, homeostasis del medio oral y en la inhibición de caries dental. Concluyó que una deficiencia en formación de sustancias de carácter básico puede ser tan importante para el desarrollo de la caries como un exceso en la formación de ácidos a partir de carbohidratos fermentables (Cummins D. 2013).

Por otra parte, es necesario señalar que la saliva actúa como un buffer, jugando un papel importante para la mantención de la homeostasis del medio, facilitando el aclaramiento de carbohidratos fermentables y ácidos (Dawes C. 1988), aportando bicarbonato para el tamponamiento de ácidos, y sustancias nitrogenadas para la formación de base. Además, proporciona una fuente constante de calcio y fosfato que ayuda a mantener la sobresaturación del mineral del tejido dental (Cummins D. 2013).

En recientes investigaciones *in vitro* en animales, así como en observaciones clínicas indirectas, se ha llegado a la conclusión que, el déficit de formación de álcali por la placa del biofilm oral supragingival, es igualmente importante que la producción de ácido por ciertos microorganismos orales para el desarrollo de la lesión cariosa (Gordan V y cols. 2010, Morou-Bermudez E y cols. 2011, Cummins D. 2013). Se ha demostrado que los individuos que presentan una biopelícula más alcalina manifiestan menos lesiones de caries, es decir, son caries resistentes.

En la microbiota oral saludable, encontramos mayor proporción de organismos arginolíticos y urolíticos. Estos microorganismos podrían contribuir con la formación de una biopelícula más alcalina, influyendo de manera positiva en la mantención de la homeostasis del

medio y previniendo la generación de una microbiota cariogénica, ya que, se encargan de la obtención de amonio a partir de sustratos presentes en el medio oral. Para la formación de amonio se han identificado dos rutas, estas son: hidrólisis de urea por enzimas ureasas y metabolismo de arginina vía Sistema Arginina Deiminasa (SAD) (Liu Y. y cols. 2012, Cummins y cols. 2013).

### **3.1 Urea**

Urea o carbamida, es un compuesto químico a base de carbamatos, obtenido del metabolismo de las proteínas en algunos organismos. En el ser humano la urea se encuentra normalmente en las secreciones corporales en un rango de 3 a 10 mM (Morou-Bermudez E y cols. 2011, Appelgren L y cols. 2011, Liu Y y cols. 2012). En la cavidad oral la encontramos en saliva y fluidos gingivales en pequeñas concentraciones, ya que es rápidamente hidrolizada por la placa bacteriana supragingival (Gordan V y cols. 2010, Liu Y y cols. 2012).

En el biofilm oral supragingival se encuentran los subgrupos de especies, *S. Salivarius* y *A. naeslundii* (Toro E y cols. 2010, Gordan V y cols. 2011, Liu Y y cols. 2012), que utilizan sustratos nitrogenados, como urea, por medio de vía enzimática ureasa para su crecimiento y desarrollo, transformándolo en amonio y dióxido de carbono, para mantener la homeostasis del pH, biopelícula oral y microbiota oral supragingival. Por lo tanto, se considera como una fuente importante de amonio y es por eso que esta vía es una de las rutas más estudiadas en la producción de álcali en el medio oral (Gordan V y cols. 2010, Liu Y y cols. 2012).

Se ha observado, una asociación positiva entre altos niveles de ureasa y de *S. salivarius*, por lo que es considerado como un organismo ureolítico, es decir, utiliza enzimas ureasas (vía ureasa-dependiente) para metabolizar urea y sustratos nitrogenados, y así favorecer su crecimiento y desarrollo en el ecosistema oral, siendo responsable de la homeostasis del medio oral, alcalinidad del pH, y de la ecología microbiana (Shu M y cols. 2007, Nascimento M y cols. 2009, Gordan V y cols. 2010, Liu Y y cols. 2012). Lo que podría significar que, aquellos sujetos que presentan bajos índices de enzimas ureasas tienen menor proporción de estos microorganismos urolíticos en el medio oral.

Un factor importante de destacar es el entorno donde se desarrollan los microorganismos urolíticos. Se ha observado que *S. salivarius* es incapaz de crecer a un pH

menor a 4, debido a que sus enzimas urolíticas se encuentran inactivas y no pueden actuar sobre sustratos nitrogenados (Gordan V y cols. 2010).

En el ecosistema oral podemos encontrar distintas concentraciones de ureasa a nivel de la placa bacteriana y de la saliva. Se ha propuesto, que un mayor nivel de ureasa en la saliva no es un factor protector, sino más bien, un promovedor del desarrollo de la lesión cariosa, incluso niveles altos en la saliva aumentan hasta cuatro veces la incidencia de iniciar o progresar una lesión de caries. A diferencia que, mientras más concentración de ureasa es encontrada en la microbiota oral supragingival, mayor será su efecto protector contra el desarrollo o progresión de lesiones cariosas (Morou-Bermudez E y cols. 2011).

En individuos sin lesiones cariosas activas se encontró altas concentraciones de amonio en la biopelícula oral supragingival, es decir, neutralización del pH y mantención de la homeostasis del medio oral. Se ha visto, que a pesar de la ingesta de carbohidratos fermentables, el pH se mantiene en los niveles propicios, gracias a la mayor cantidad de bacterias urolíticas; en cambio, la menor presencia de organismos productores de ureasa, se relaciona con menor capacidad para compensar la acidificación glicolítica, a pesar de proporcionar en forma externa una gran cantidad de urea (Gordan V y cols. 2010).

### **3.2 Arginina**

La arginina, aminoácido que se encuentra formando parte de polipéptidos y proteínas de la saliva, en una concentración de 50 mM en forma libre (Liu Y y cols. 2012) es metabolizado por enzimas y proteasas presentes en la saliva y biofilm del medio ambiente oral; la principal vía investigada es el sistema arginina deminiasa (SAD). El SAD se encarga de metabolizar la arginina para así obtener: ornitina, amonio, dióxido de carbono y ATP (Gordan V y cols. 2010, Liu Y y cols. 2012, Cummins D. 2013).

Las bacterias arginolíticas son aquellas que presentan enzimas proteolíticas que por medio de la vía SAD obtienen amonio y ATP para su crecimiento y desarrollo en la microbiota oral. Una de las más investigadas es *S. sanguis* (Nascimento M y cols. 2009, Huang X y cols. 2012, Reyes E y cols. 2012), este microorganismo tiene relación positiva con altos niveles de arginina y SAD en saliva y en biopelícula oral (Nascimento M y cols. 2009, Huang X y cols. 2012). Además esta ruta, se ha asociado a otros microorganismos, como: *S. gordonii*, menos

acidúrico que *S. mutans*, *S. parasanguinis*, *S. rattus* y algunas bacterias del grupo *Lactobacilli* formadores de amonio al metabolizar la arginina mediante la vía SAD (Nascimento M y cols. 2009, Liu Y. y cols. 2012, Reyes E y cols. 2012).

Nascimento M y cols. 2009, demostró que existía diferencias significativas entre los niveles de actividad arginolítica de la vía SAD de individuos con diferentes estados de caries, y también, la presencia de una relación positiva significativa entre el número de *S. sanguinis* y los niveles de actividad de esta vía enzimática.

El SAD es considerado una de las vías más importantes para la mantención de la homeostasis y alcalinidad del pH en el medio oral, ya que como se mencionó anteriormente, es capaz de obtener amonio a partir del metabolismo de la arginina, siendo el amonio, el componente principal para la estabilidad del pH y el desarrollo de los microorganismos compatibles con salud (Gordan V y cols. 2010, Morou-Bermudez E y cols. 2011, Liu Y y cols. 2012, Cummins D. 2013, Nascimento M y cols 2014).

En el primer estudio arginolítico-sitio específico en placa supragingival se descubrió que la capacidad de metabolizar la arginina por las bacterias varía según el sitio, el huésped y el avance de la lesión de cariosa. También concluyó que la placa bacteriana de la superficie libre de caries, mostraba amplia gama de actividad del SAD a diferencia de la superficie con lesión cariosa en un mismo diente (Nascimento M y cols. 2013).

Al igual que la urea, se ha observado que la actividad de SAD en la saliva es menor que en la placa bacteriana supragingival (Gordan V y cols. 2010, Nascimento M y cols. 2013, Nascimento M y cols. 2014). Nascimento M y cols. 2013, encontraron que la microbiota salival es distinta a la microbiota de la placa bacteriana supragingival, independiente si presenta o no lesión de caries. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de SAD entre niños libre de caries y niños en actividad de caries en saliva, a diferencia que en placa oral supragingival; lo que no quiere decir, que sea un predictor de riesgo de lesión de caries en niños.

Un estudio realizado por Huang y cols. 2012, reveló que los genes que codifican proteínas regulatorias del sistema arginina deiminasa, se encontraban inhibidos a pH inferior a 4,5, en consecuencia, la vía SAD está inactiva, provocando la disminución del nivel de amonio en el medio. Además, demostró, que posterior a la ingesta de sucralosa, el encargado de la normalización del pH del medio es la capacidad buffer de la saliva, la cual está fuertemente



afectada al predominar la formación de ácidos en el medio oral.

En resumen, en la cavidad bucal existen múltiples sistemas para la generación de álcali, considerando la existencia de una gran diversidad de sustancias nutritivas y de bacterias presentes en el medio oral, incluyendo aquellos mecanismos y microorganismos que aún no han sido identificados. A pesar de ello, la producción de amonio de estos sistemas es relativamente menor comparado con la urealisis y arginolisis (Burne R. 2000). Por lo tanto, estas dos rutas serían importantes para la mantención y el equilibrio del ecosistema oral.

### **3.3 Investigaciones en urealisis y arginolisis**

En varias investigaciones se ha llegado a la conclusión, que la fuente de urea y arginina sería el mayor protector endógeno inhibitorio para el desarrollo de la lesión cariosa, ya que al producir un aumento en los niveles de amonio en el medio oral, favorecería la mantención de los factores saludables implicados en el proceso de remineralización dental (Gordan V y cols. 2011, Nascimento M y cols. 2013, Nascimento M y cols. 2014).

En un estudio *in vitro* realizado en ratas libres de patógenos específicos, se introdujo *S. mutans* genéticamente modificadas, *S. mutans* recombinantes, capaces de expresar ureasas. El grupo experimental fue alimentado con una dieta rica en carbohidratos fermentables a la que se incorporó urea, y se observó que *S. mutans* recombinante tenía significativa menor incidencia y severidad en el desarrollo y progreso de lesión de caries en comparación con el grupo control (Clancy KA 2000), mostrando menor acidificación del medio oral y fuerte inhibición en el desarrollo de lesiones cariosas (Shu M y cols. 2007, Liu Y y cols. 2012).

Otros estudios han confirmado que aquellas personas que presentan enfermedades renales como insuficiencia renal crónica, tienen mayor nivel de urea en sus fluidos corporales, incluyendo la saliva. Se ha visto, inclusive, que podría llegar a tener 10 a 50 veces más concentración de urea en saliva en relación a una persona sana. Por lo tanto, se ha determinado que presentan menor prevalencia de lesiones cariosas, a pesar de consumir una dieta rica en carbohidratos fermentables (Shannon y cols. 1977, Epstein y cols. 1980, Ertugrul F y cols. 2003, Arora R y Sarvaiya B 2010).

Últimamente, se han desarrollado pastas dentales con 1,5% de arginina. Estos estudios

han revelado aumento de la producción de amonio vía SAD en placa oral supragingival, no así en saliva. Además, se observó que aquellos sujetos con caries activas que presentaban menor actividad de SAD en comparación con aquellos individuos libres de caries, al utilizar la pasta dental aumentó su nivel de SAD igualando a los individuos libres de caries (Cummins D. 2013, Nascimento M y cols. 2014). Esta nueva línea de investigación podría significar un avance en relación a la prevención y desarrollo de la caries dental.

Un alto nivel de actividad de SAD y de ureasas en placa bacteriana supragingival y saliva, genera un impacto biológico en el medio oral, influyendo directamente en el balance ácido/base, favoreciendo el desarrollo y crecimiento de especies arginolíticas y urolíticas versus acidúricas y acidógenas (Nascimento M y cols. 2014). La dieta, el pH, la capacidad buffer y los microorganismos, son factores fundamentales para la presencia de una microbiota “saludable” o “patógena” y la mantención constante de pH neutro en el medio oral.

En un estudio realizado por Morou-Bermudez y cols. 2011, se midió la actividad de ureasa en saliva y placa bacteriana supragingival en niños durante 3 años y los factores de riesgo asociados a ella. Se observó que aquellos que presentaban altas concentraciones de ureasa en la placa bacteriana supragingival estaba negativamente asociado a altos niveles de azúcar; en consecuencia, el aumento de actividad de ureasa en placa bacteriana supragingival podría estar asociado con menor riesgo de caries en niños.

#### **4. Índices para evaluar severidad de lesión de caries**

Un indicador es un instrumento para medir una variable. Representan medidas/resumen que capturan información relevante sobre distintos atributos y dimensiones del estado de salud y del desempeño del sistema de salud, reflejo de la situación sanitaria e instrumento para su control (OMS, 1981).

##### **4.1 COPD**

Los índices que miden la historia pasada de caries son (Piavono S 2010):

- COPD: dientes permanentes cariados, extraídos y obturados.
- ceod: dientes primarios cariados, con indicación de extracción y obturados.

- CPOS: superficie dentarias permanentes cariadas, extraídas y obturadas.
- ceos: superficies dentarias primarias cariadas, con indicación de extracción y obturadas.

El índice COPD fue formulado por Klein, Palmer y Knutson (1938) durante un estudio sobre el estado y la necesidad tratamiento dental en niños pertenecientes a escuelas primarias en Hagerstown. Registra la experiencia de caries presente y pasada de 28 dientes (se excluye los 3° molares), considerando los dientes con lesiones cariosas cavitadas y los tratamientos realizados. Se realiza la sumatoria de los dientes permanentes cariados, perdidos y obturados obteniendo el COPD final. El Índice *ceod*, adaptado por Gruebbel (1944) para la dentición primaria es similar al COPD, pero considera sólo los dientes temporales cariados, con indicación de extracción y obturados (20 dientes) (Piavono S. 2010).

#### **4.2 ICDAS**

Pitts y Stamm (2004), presentaron un sistema de identificación o detección y valoración de caries denominado Sistema Internacional para la Identificación y Valoración de Caries Dental (ICDAS) (Piavono S. 2010).

El ICDAS puede servir como base y punto de referencia para la investigación clínica y epidemiológica en Cariología (Shivakumar K y cols. 2009). Se encarga de medir los cambios en la superficie y el potencial de profundidad histológica de las lesiones cariosas, es decir, permite diferenciar la progresión de la lesión cariosa desde su comienzo en esmalte hasta su avance en dentina, evaluando secuencialmente las manifestaciones del proceso de caries a través del tiempo (Piavono S. 2010). El requisito principal para la aplicación del sistema ICDAS es realizar el examen con dientes limpios y secos (Shivakumar K y cols. 2009).

Hasta la fecha el ICDAS no ha sido utilizado para comparar grupos de distinta severidad y experiencia de caries según el nivel de formación de amonio en saliva y biofilm supragingival, que es lo que se pretende realizar en el presente trabajo de investigación.

Se han propuesto 7 categorías (Pitts N y cols. 2005):

- 0 = Sano
- 1 = Primer cambio visual de opacidad en esmalte (mediante secado prolongado de la superficie por mínimo 5 segundos)
- 2 = Cambio visual de opacidad en esmalte (en humedad)
- 3 = Micro cavitación en esmalte
- 4 = Presencia de sombra u oscurecimiento bajo el esmalte
- 5 = Cavity limitada con dentina expuesta (50% o menos de la superficie)
- 6 = Cavity extensa con dentina expuesta (más de 50% de la superficie)

En resumen a los antecedentes mencionados anteriormente indican que, es importante esclarecer si la presencia de amonio en la cavidad oral puede determinar el nivel de riesgo de caries dental, lo cual podría ser utilizado para combatir su incidencia y severidad. Para ello, es importante considerar cuantificar la formación de amonio a partir de las vía SAD y ureasas en niños de 6 años libre de lesión de caries y con lesiones de caries activas, ya que a esta edad comienza la erupción de dientes permanentes, los que son primordiales para el desarrollo y crecimiento del individuo. Por lo tanto, con este proyecto de investigación se pretende generar un avance en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo del proceso carioso en la población infantil Chilena.

## **Hipótesis**

La disminución de la prevalencia y severidad de lesiones cariosas en niños de 6 años de edad de la Región Metropolitana de estrato socioeconómico medio y medio-bajo, se relaciona con mayor nivel de amonio en saliva y en biofilm oral supragingival generado por la actividad de Sistema Arginina Deiminasa (SAD) y ureasas (U) de la placa bacteriana.

## **Objetivo general**

Evaluar la experiencia y severidad de caries en niños de 6 años de nivel socioeconómico medio y medio-bajo y relacionarlo con los niveles de amonio y actividad específica del Sistema Arginina Deiminasa (SAD) y ureasas (U) en saliva y placa bacteriana supragingival.

## **Objetivos específicos**

1. Establecer la experiencia y severidad de caries, por medio de: el índice COPD/ceod y el código ICDAS en niños de 6 años de la zona norte de la Región Metropolitana.
2. Determinar la severidad de caries según la actividad de SAD en muestras de saliva y biofilm oral supragingival de niños de 6 años con diferente índice de caries dental de la zona norte de la Región Metropolitana.
3. Determinar la actividad de caries según la actividad de ureasa en biopelícula oral supragingival y saliva en niños de 6 años con diferente índice de caries dental de la zona norte de la Región Metropolitana.
4. Evaluar las diferencias de sensibilidad y especificidad entre el índice COPD/coed y código ICDAS en los grupos de estudio según severidad de caries.

## **Materiales y Métodos**

### **Tipo de estudio**

Este estudio fue diseñado como doble ciego, transversal, asociativo, aleatorizado y descriptivo de la actividad específica alcalina enzimática en saliva y placa oral supragingival y el Sistema internacional de detección y valoración de caries (ICDAS) en niños de 6 años que asisten a las escuelas del sector norte de la Región Metropolitana de Santiago, Chile.

### **Muestra**

**Universo de la muestra:** El tamaño de la muestra del proyecto FONIS SAE13I 20205, aprobado por el Comité de Ética en Investigación Humana de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, bajo protocolo ACTA W: 2012/13, fue de 70 alumnos de 6 años de edad de Huechuraba, Recoleta e Independencia, de escuelas públicas primarias. La selección de estos individuos se realizó de la siguiente manera:

De las comunas del sector norte de la Región Metropolitana, 5 fueron identificadas de nivel socio-económico bajo y medio-bajo, de las cuales 3 fueron seleccionados por simple azar (función aleatoria, Microsoft Excel 2007): Huechuraba, Recoleta e Independencia. El número de niños de 6 años (proyección de la población) se determinó a partir de la base de datos del Instituto Nacional de Estadísticas (INE). A continuación, junto con los Departamentos de Educación de las tres comunas, se identificaron las escuelas públicas primarias, mediante un simple sorteo. El tamaño de la muestra se calculó suponiendo  $\alpha = 0,05$  (bilateral) de potencia = 0,08 y  $p = 0,75$ , con el programa informático Stata v11 (Prueba de  $H_0: p = 0,5$ , donde  $p$  es proporcional a la población). La población estimada fue de 58, asumiendo las dificultades de la selección y por la aplicación de los criterios de exclusión el número muestral, se incrementó a 70 alumnos.

## **Materiales**

- Kit de examen bucal.
- Tubos falcon 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 (Mademsa®).
- Refrigerador de bajas temperaturas (-80°C) (Sanyo Electric Co. Ltda).
- Sonificador (Transsonic 460/H. Elma ®).
- Centrífuga Refrigerada del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
- Estufa (Labtech. Co. Ltd®).
- Espectrofotómetro (UNICAM UV/Vis Spectrometer)<sup>1</sup>.
- Cubetas desechables de 1 ml para espectrofotómetro
- Reactivos<sup>2</sup>.
- Softwares: Stata v11, SPSS para Windows, versión 18.0.

## **Procedimientos clínicos**

Se realizó la metodología estandarizada en el trabajo de investigación de Reyes E. 2012, se siguió el protocolo en forma rigurosa.

---

<sup>1</sup> Ver anexo: Espectrofotometría

<sup>2</sup>Ver anexo N° 1: Reactivos.

<sup>3</sup>Ver anexo N° 2: Consentimiento informado.

## 1. Evaluación clínica:

Se realizó examen intraoral en cada niño de 6 años de edad, por un investigador calibrado en sistema ICDAS (índice de Kappa= 0,77) y en índice COPD/ceod de acuerdo a las normas emitidas por la OMS (Holmgren CJ y cols.1997).

## 2. Examen clínico:

Un operador realizó el examen oral a 70 niños de 6 años de edad con diferente historia de caries de dos colegios de la zona Norte de la Región Metropolitana: Liceo Miguel Rafael Prado y Escuela República del Paraguay.

Todos los niños debieron cumplir los criterios de inclusión y exclusión, previa lectura y firma del consentimiento informado para los apoderados<sup>3</sup>, que fue visado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología<sup>4</sup> de la Universidad de Chile.

El examen clínico se registró en una ficha clínica<sup>5</sup>, que corresponde a una modificación de la ficha de examen oral de la OMS.

Criterios de inclusión: niños sanos sistémicamente de 6 años y 0 días - 6 años y 364 días de edad, de ambos sexos, con y sin lesiones de caries dental que cumplieron con 12 horas de ayuno al momento del examen.

Criterios de exclusión: niños con disminución del flujo salival (menos de 0,5 ml/min en mujeres y 0,7 ml/min para los hombres), ingesta de antibióticos o clorhexidina durante los últimos 3 meses, sufrir de enfermedades sistémicas como diabetes, hipertensión, enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencia y el uso de pasta de dientes que contienen arginina. Niños con enfermedad periodontal no se incluyeron, ya que la biopelícula involucrada en la patogénesis de la enfermedad periodontal se caracteriza por menor proporción de

---

<sup>3</sup>Ver anexo N° 2: Consentimiento informado.

<sup>4</sup>Ver anexo N° 3: Certificado Comité de Bioseguridad.

<sup>5</sup>Ver anexo N°4: Ficha clínica.



bacterias acidogénicas; sin embargo, abundan en ella bacterias ureolíticas productoras de ureasa y SAD que metabolizan sustratos nitrogenados de la saliva (urea, ácido úrico, creatinina y aminoácidos), la liberación de amonio que reacciona con dióxido de carbono formando carbonato de amonio que aumenta el pH del biofilm oral supragingival (Dumitrescu A. 2010).

### **3. Obtención de las muestras:**

Los niños examinados debían realizar ayuno y no cumplir con ningún procedimiento de higiene por 12 horas, según el protocolo utilizado por Gordan V y cols. 2010.

### **4. Muestras de saliva:**

Se realizó la recolección de muestras salivales, donde los niños tuvieron que escupir dentro de un tubo plástico estéril (Falcon) por 5 min. entre las 8 y 11 am, para obtener un total de 3 ml de saliva no estimulada. Se mantuvo a temperatura de 4°C durante la toma de las muestras. El niño debió mantener la posición de cochero, la cual se describe como en una posición relajada en que el individuo se encuentra sentado con ojos abiertos y con la cabeza inclinada levemente hacia delante, de acuerdo al protocolo descrito por Navazesh M. 1993.

### **5. Muestras de microbiota supragingival:**

Se recopiló muestras de placa bacteriana supragingival mediante el raspado supragingival de todas las superficies lisas dentales, con curetas periodontales estériles. Luego se almacenaron en tubos Eppendorf estériles que tenían 500 µl de solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (pH 7), a temperatura de 4°C durante la toma de las muestras.

## **6. Determinación de severidad y experiencia de caries:**

Se utilizó dos índices para determinar la severidad y experiencia de lesión de caries en niños de 6 años de edad, índice COPD/coed y código ICDAS.

### **6.1 Determinación de código ICDAS:**

Durante el examen clínico, se examinó cada cara de los dientes, dando el mayor valor del código ICDAS según la cara dentaria mayormente afectada por el proceso carioso. Se clasificó en 4 grupos, donde se determinó:

Bajo: grupo libre de lesión de caries y de historia pasada de ella, código ICDAS 0.

Moderado: grupo de mediana severidad de caries, presentó al menos un código ICDAS 5 y 6, cuando el coed es inferior al promedio señalado por el MINSAL (3,7). Fue dividido en 2 grupos:

Moderado alto: presentan al menos un código ICDAS 4-6.

Moderado bajo: presentan al menos un código ICDAS 2 y 3.

Alto: grupo de mayor severidad, presentó al menos un código ICDAS 5 y 6 cuando el coed fue mayor al promedio señalado por el MINSAL en niños de 6 años y aquel que presentó COPD 1.

### **6.2 Determinación de COPD y coed:**

Para determinar el COPD/coed se estableció el total de dientes con lesiones de caries dentinarias, obturaciones e indicación de extracción por lesiones cariosas en dentición temporal (índice coed) y en dentición permanente (índice COPD). Luego se sumaron ambos índices para cada niño, COPD/coed, y se clasificaron según los siguientes grupos:

Bajo: la suma de ambos índices es igual a cero (sin presencia de lesiones de caries dentinarias, sin presencia de obturaciones y pérdida de dientes o indicación de extracción por lesiones de caries).

Moderado: la presencia 1-3 lesiones de caries dentinarias en boca.

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

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

Se realizó un informe de salud oral de los niños, entregados a los apoderados, donde se detallan las necesidades de tratamiento que requieran sus pupilos, especificando la presencia o ausencia de lesiones de caries y su cantidad, las posibilidades de tratamiento y la necesidad de sellantes según los criterios de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Luego se les indicó asistir a los establecimientos respectivos (CESFAM).

## **Procedimientos de Laboratorio**

### **1. Conservación de muestras hasta análisis enzimático**

Las muestras de saliva y biofilm dental supragingival obtenidas, fueron refrigeradas a baja temperatura (-80°C) hasta el día del análisis, donde fueron trasladadas a una temperatura de 4°C.

### **2. Preparación de las muestras:**

2.1) Se descongeló de -80°C a 4°C las muestras de saliva y placa bacteriana.

#### 2.2) Preparación de las muestras de saliva:

- Se utilizó 2 tubos Eppendorf con 750 µl de saliva por cada muestra de saliva.
- Se dispersó la saliva a través de sonificación 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, guardando el sobrenadante, para futuras investigaciones de pH.
- Se lavó una vez con 10 mM de solución 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).

---

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

### 2.3) Preparación de las muestras de biopelícula dental supragingival:

- 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 segundos, 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 fue utilizado eliminando el sobrenadante.
- Se resuspendió en 500 µl de 10 mM Tris-Maleato (pH 6).

## **3. Determinación de la actividad de SAD y ureasa en muestras de saliva y placa bacteriana supragingival**

### 3.1) Cuantificación de la concentración de proteínas totales en saliva y biopelícula dental supragingival:

Se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford (Fujimoto E y cols. 1985), para expresar la actividad de SAD y ureasa normalizado por la cantidad de proteínas totales de la muestra (actividad específica). Para ello, en primer lugar se realizó una curva de calibración utilizando la proteína albúmina de suero de bovino (BSA, Sigma-Aldrich), en que diversas concentraciones conocidas fueron mezcladas con el reactivo de Bradford, generando una coloración azul, la cual varía según la concentración de proteínas: mientras mayor concentración de proteína más coloración azul se genera. La absorbancia fue leída en el espectrofotómetro (595 nm), con la que se construyó una curva de concentración de proteína versus absorbancia. En la tabla N° 1 se indican 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<br>0,2 mg/ml | St 2<br>0,8 mg/ml | St 3<br>1,4 mg/ml | St 4<br>2,0 mg/ml |
| <b>BSA</b>                  | ---          | 10                | 10                | 10                | 10                |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>       | 800          | 790               | 790               | 790               | 790               |
| <b>Reactivo de Bradford</b> | 200          | 200               | 200               | 200               | 200               |
| <b>Volumen total</b>        | 1000         | 1000              | 1000              | 1000              | 1000              |

(BSA= albúmina de suero 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 lineal y se obtuvo la ecuación de la recta de calibración de proteínas totales versus absorbancia.

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

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

| Reactivo                    | Volumen (µl) |        |             |
|-----------------------------|--------------|--------|-------------|
|                             | Blanco       | Saliva | Biopelícula |
| <b>Muestra</b>              | ---          | 10     | 10          |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>       | 800          | 790    | 790         |
| <b>Reactivo de Bradford</b> | 200          | 200    | 200         |
| <b>Volumen total</b>        | 1000         | 1000   | 1000        |

Posterior a la preparación de las muestras de la tabla N° 2, 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

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).

### 3.2) Cuantificación de la concentración de amonio en saliva y biopelícula oral supragingival:

Se determinó la concentración de amonio producido enzimáticamente por SAD y ureasa en las muestras de biopelícula supragingival y saliva, mediante el método de Nessler (Lloret S y cols. 2005). Para ello, primero se creó una curva de calibración de amonio, donde concentraciones conocidas de sulfato de amonio se mezclaron con el reactivo de Nessler (KI 5% p/v, HgCl<sub>2</sub> 2,5% p/v, KOH 16% p/v) generando una coloración amarilla que varía según la concentración de amonio, mientras mayor concentración de amonio mayor actividad de SAD y ureasas. La absorbancia de estos estándares fue leída en el espectrofotómetro (395 nm) con la que se construyó una curva de concentración de amonio versus absorbancia. En la tabla N° 3 se indican las cantidades de los distintos reactivos para confeccionar la curva de calibración.

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

| Reactivos   | Volumen (µl) |       |       |       |       |
|---|--------------|-------|-------|-------|-------|
|   | Blanco       | St1   | St2   | St3   | St4   |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                                   | 900,0        | 897,5 | 892,5 | 885,0 | 880,0 |
| <b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM</b> | ---          | 2,5   | 7,5   | 15,0  | 20,0  |
| <b>Reactivo Nessler</b>                                 | 100          | 100   | 100   | 100   | 100   |
| <b>Volumen total</b>                                    | 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 polinomial y se obtuvo la ecuación de la curva de calibración de la concentración de amonio versus la absorbancia obtenida (Maureira J. 2013).

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

Luego se determinó la actividad enzimática de ureasa y ADS en las muestras.

### 3.3) Medición de la actividad de ureasa:

Se midió la actividad de ureasa en las muestras de saliva y biopelícula oral supragingival, al añadir una cantidad fija de urea (sustrato utilizado por la enzima para la producción de amonio). Luego se midió su actividad, por medio del amonio generado, normalizado por contenido de proteínas (actividad específica).

Los reactivos utilizados para generar la reacción enzimática de ureasa 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 |
| <b>Muestra</b>            | 20           | 25          | 0      |
| <b>Tris Maleato 0,5 M</b> | 20           | 20          | 20     |
| <b>Urea 1M</b>            | 25           | 25          | 0      |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>     | 435          | 430         | 480    |
| <b>Total volumen (µl)</b> | 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 centrifugó 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 de la muestras.

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

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

- Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 395 nm.

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

### **3.4) Medición de la actividad de SAD:**

Se midió la actividad de SAD en las muestras de saliva y biopelícula oral supragingival, al añadir una cantidad fija de Arginina-HCl (sustrato utilizado por la enzima para la producción de amonio). Luego se midió su actividad, por medio del amonio generado, normalizado por contenido de proteínas (actividad específica).

Los reactivos utilizados para generar la reacción enzimática de ADS en saliva y biopelícula se muestran en la Tabla N° 6.



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

| Reactivos                 | Volumen (µl) |             |        |
|---------------------------|--------------|-------------|--------|
|                           | Saliva       | Biopelícula | Blanco |
| <b>Muestra</b>            | 20           | 25          | 0      |
| <b>Tris Maleato 0,5 M</b> | 20           | 20          | 20     |
| <b>Arginina-HCl 1M</b>    | 25           | 25          | 0      |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>     | 435          | 430         | 480    |
| <b>Total volumen (µl)</b> | 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 centrifugó 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 de la ADS, se siguió el mismo protocolo utilizado para Ureasa.

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

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

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

- Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 395 nm.
- Para obtener la concentración de amonio (mM) producido, 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:**

Los datos fueron analizados mediante el programa de análisis estadístico SPSS (Paquete estadístico para las ciencias sociales) para Macintosh, versión 18.0. Se realizó análisis descriptivo de las variables para caracterizar la muestra. Se comparó resultados de pacientes con diferentes COPD e ICDAS. Se utilizó Test de ShapiroWilk y Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos y homogeneidad de la varianza. Test Mann Whitney y Kruskal-Wallis, prueba no paramétrica, fue utilizado para comparar los diferentes grupos en estudio. Para todas las variables se adoptó un nivel de significancia de 0,05. Se realizó diferentes combinaciones entre actividad enzimática y niveles de severidad de caries (ceod/COPD e ICDAS) buscando correlaciones, las que fueron analizadas por medio del Test de correlación de Spearman.

## Resultados

Durante la obtención, conservación y procesamiento de las muestras (n=70), se siguió en forma rigurosa el protocolo establecido (Reyes E. 2012), por lo que no hubo pérdida de saliva y biofilm oral supragingival.

### 1. Descripción general de la muestra

Se dividió el universo según la severidad y experiencia de caries utilizando el índice COPD y el código ICDAS. Se excluyó los datos que se encontraban libre de lesiones de caries activas pero con experiencia de lesión cariosa, es decir, presencia de obturaciones y/o exodoncias realizadas en el pasado.

Para coed/COPD se obtuvo un n = 60. Cada grupo fue de:

- Bajo: n= 17
- Moderado: n= 26
- Alto: n= 17

Para ICDAS se obtuvo un n = 68, y cada grupo fue de:

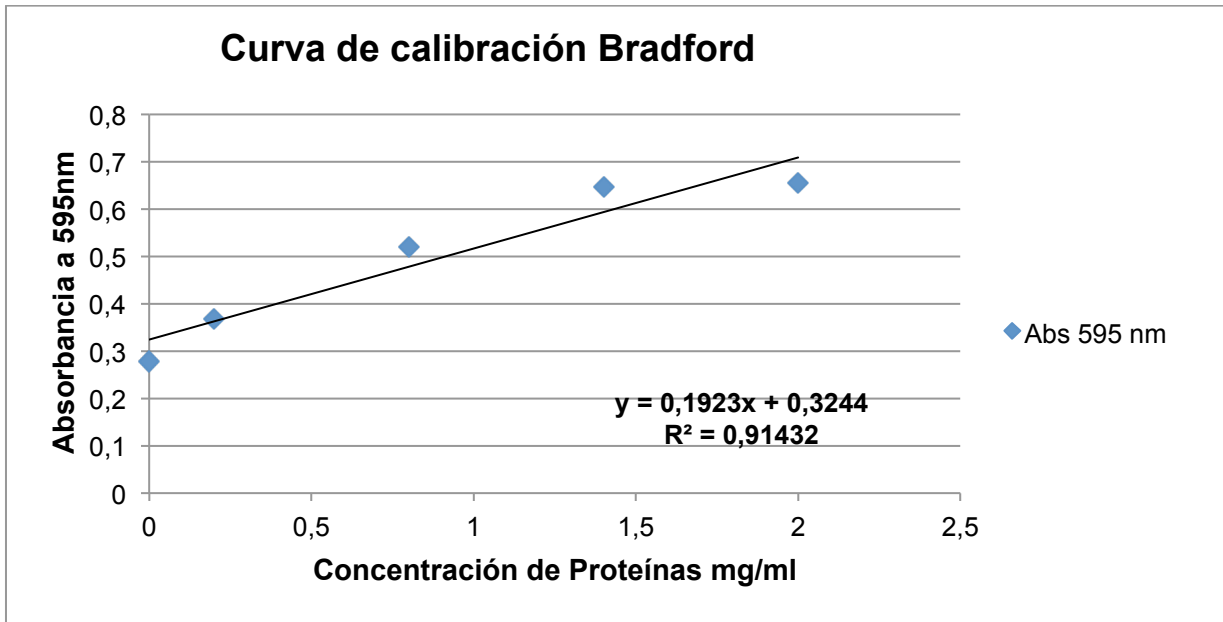
- Bajo: n= 6
- Moderado: - Moderado bajo: 24; - Moderado alto: 21
- Alto: n= 17

### 2. Curva calibración de concentración de proteínas totales<sup>7</sup>

La curva de calibración de concentración de proteínas versus absorbancia, se realizó por el método de Bradford, utilizando como proteína estándar albúmina de suero de bovino. Se observa una relación directa y lineal entre la concentración de proteínas y la absorbancia medida a 595 nm, entre 0 y 2 mg/ml de proteína (Figura 1).

---

<sup>7</sup> Anexo 6: valores de curva de calibración proteínas totales

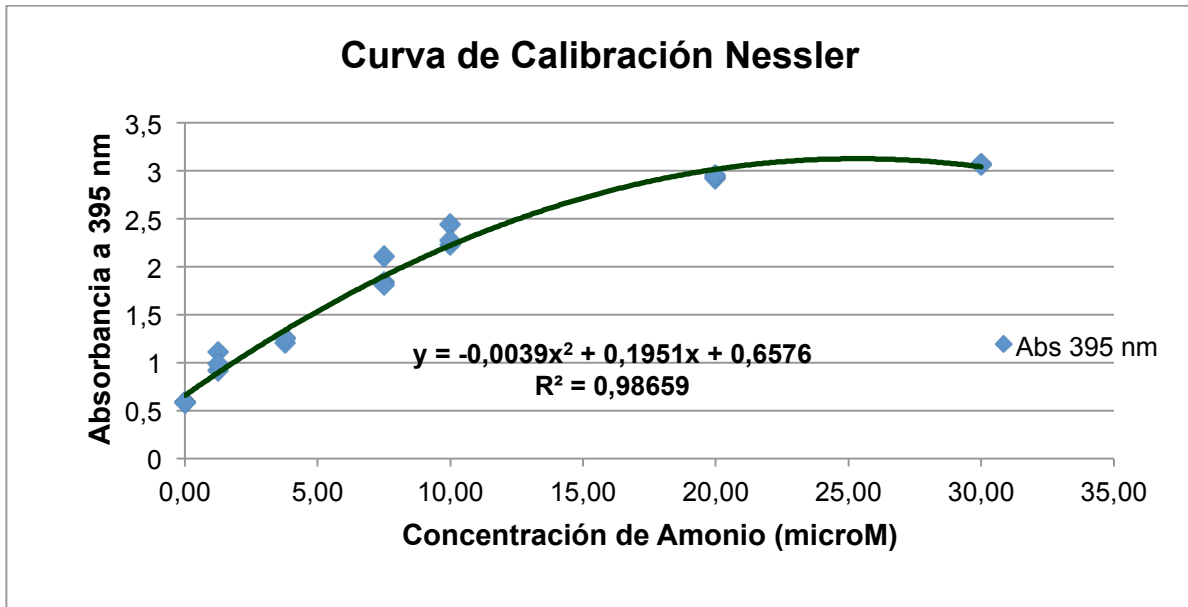


**Fig. 1 Curva de calibración de concentración de proteínas versus absorbancia, determinada por el método de Bradford.**

### 3. Curva calibración de concentración de amonio<sup>8</sup>

La curva de calibración de concentración de amonio versus absorbancia, se realizó por el método de Nessler utilizando sulfato de amonio. Se observa una relación polinomial entre la concentración de amonio y la absorbancia medida a 395 nm, entre 0 y 30 microM de amonio (Figura 2) (Maureira J. 2013).

<sup>8</sup> Anexo 6: valores curva de calibración amonio



**Fig. 2 Curva calibración de amonio versus absorbancia, determinada por el método de Nessler.**

#### **4. Estadística clínica**

Las pruebas estadísticas de normalidad (test de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov) determinaron que los grupos de diferente severidad de caries, tanto de coed/COPD como de ICDAS, no se distribuyen normalmente obteniendo que los datos son no paramétricos, por lo que utilizamos el test de Kruskal-Wallis.

#### **5. Análisis descriptivo de los resultados**

Los valores de amonio liberado (microM) desde ureasa y SAD en saliva y biopelícula, son divididos por la concentración de proteínas totales presentes (mg/ml) en cada una de las muestras. Esto permite obtener la actividad enzimática específica de ureasa y SAD, las que se expresan como:  $\text{mmol min}^{-1}\text{mgprot.}^{-1}$

## **6. Actividad específica (AE) para ureasa (U) y arginina deminasa (SAD) en saliva y biofilm supragingival en pacientes de bajo, moderado, alto COPD/ceod<sup>9</sup>**

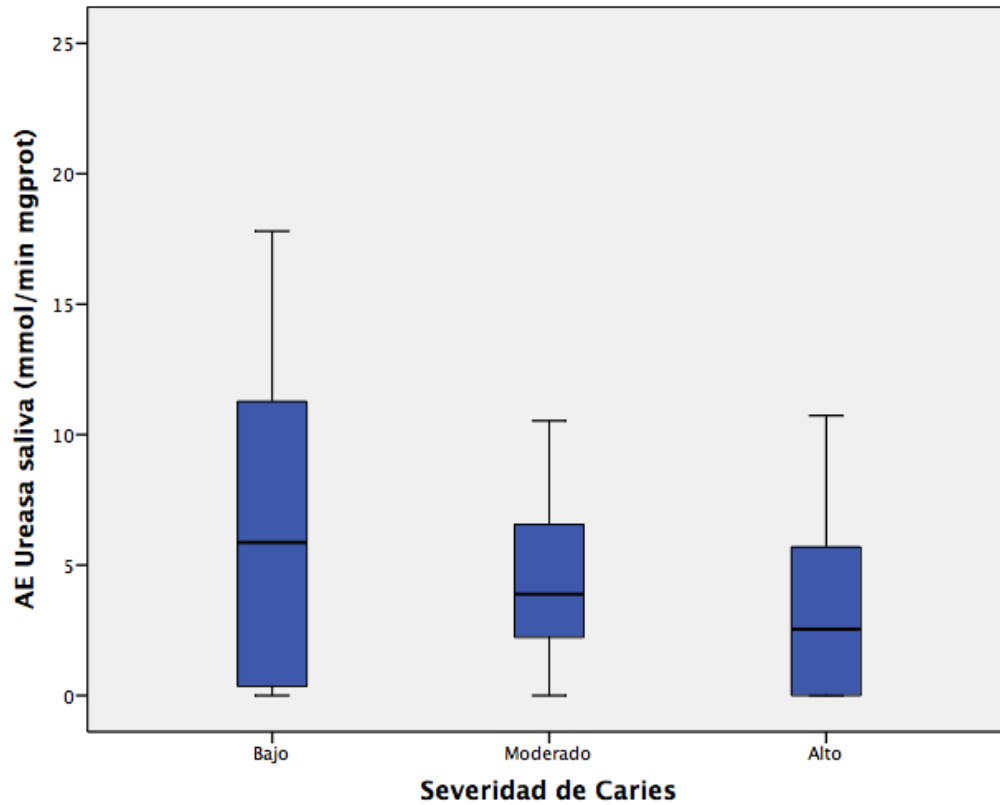
En las figuras 3, 4, 5 y 6 se observa la clasificación de los datos según la severidad de caries en tres grupos: bajo, moderado y alto, que son comparados según el nivel de actividad específica de ureasa y SAD obtenido por cada grupo estudiado.

### **6.1 Actividad específica (AE) para ureasa (U) en saliva y biofilm supragingival en pacientes de bajo, moderado, alto COPD/ceod**

La figura 3 es un diagrama de cajas y bigotes que muestra los resultados obtenidos al analizar la AE de ureasa en saliva en los grupos divididos por severidad de caries. Al comparar la urealisis en saliva en el grupo bajo, moderado y alto, se observa una mayor actividad en el grupo bajo (mediana 5,86) respecto al grupo moderado (mediana 3,89) y alto (mediana 2,54) pero no hay diferencias estadísticas significativas ( $p = 0,41$ ). Se advierte una leve diferencia entre el grupo bajo y alto, no así entre el bajo y moderado.

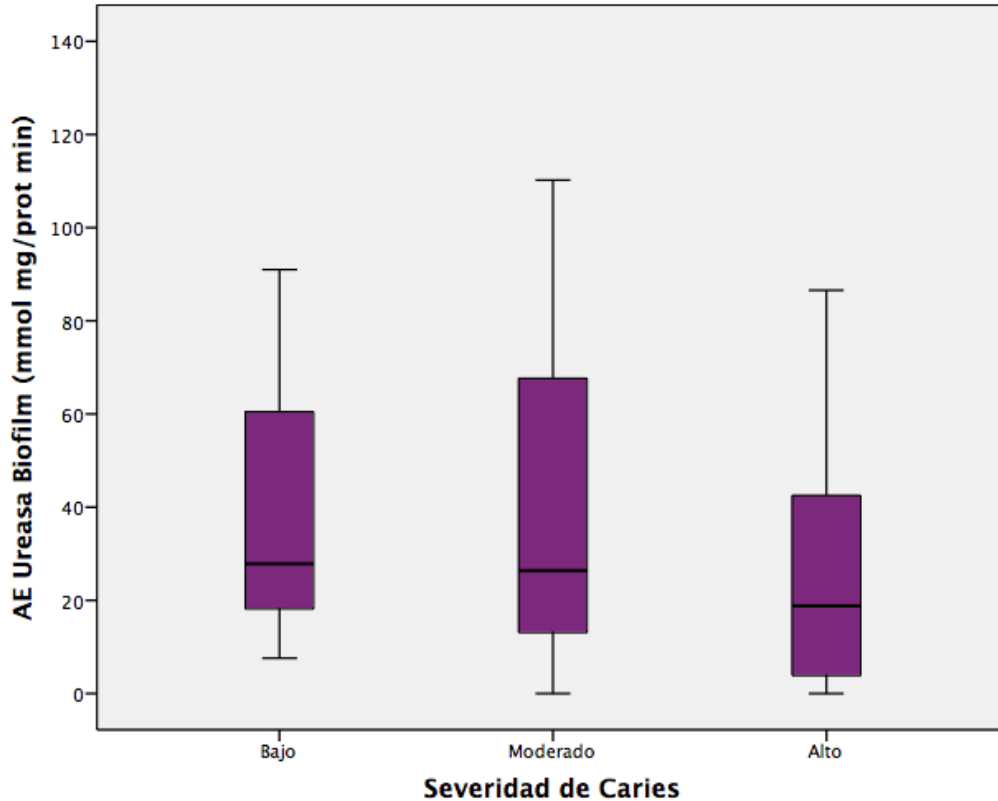
---

<sup>9</sup> Anexo 8: tabla resumen de datos según severidad de caries.



**Fig. 3 Actividad enzimática de ureasa (U) en saliva, en grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries.**

La figura 4 es un diagrama de cajas y bigotes que muestra los resultados obtenidos al analizar la AE de ureasa en biofilm oral supragingival en los grupos divididos por severidad de caries (bajo, moderado y alto). La AE de ureasa en biofilm oral supragingival en el grupo bajo (mediana 32,84) fue mayor respecto al grupo moderado (mediana 26,39) y alto (mediana 15, 83), a pesar de esto no hubo diferencias significativas entre ellos ( $p = 0,25$ ).

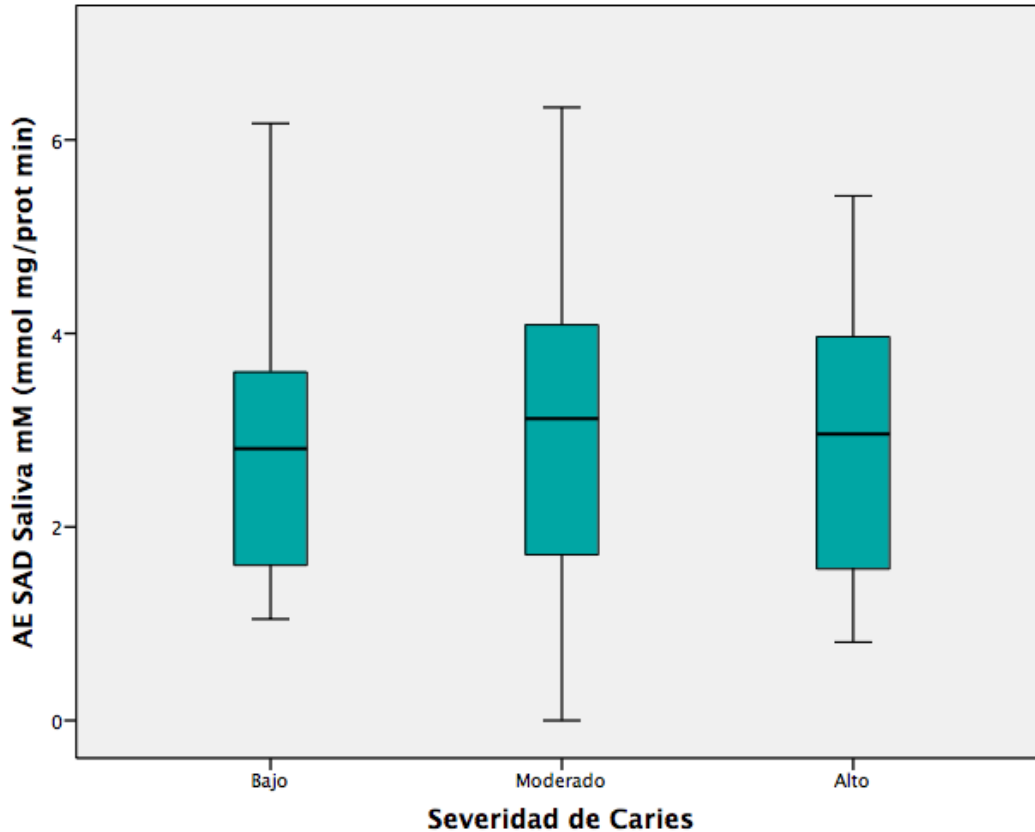


**Fig. 4 Actividad enzimática de ureasa (U) en biopelícula oral supragingival, en grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries.**

### **6.2 Actividad específica (AE) para arginina deiminasa (SAD) en saliva y biofilm supragingival en pacientes de bajo, moderado, alto COPD/ceod**

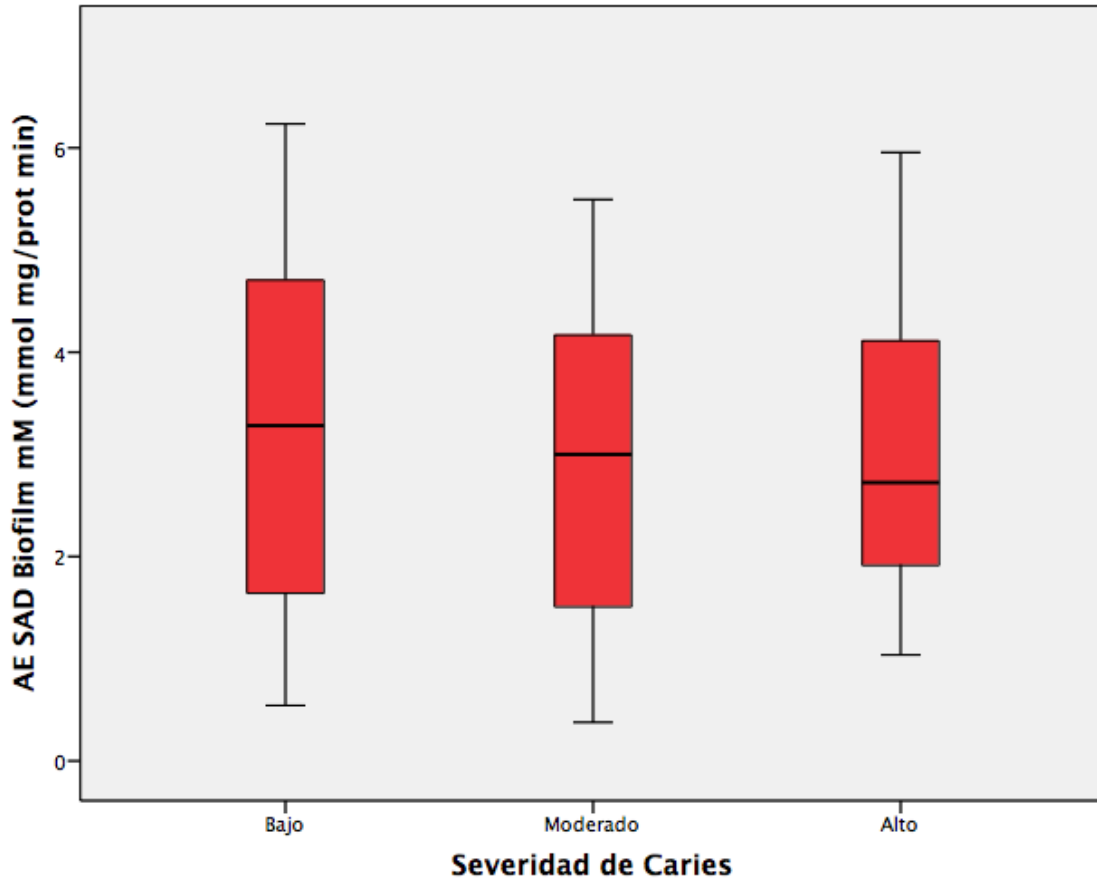
La figura 5 es un diagrama de cajas y bigotes que muestra los resultados obtenidos al analizar la AE de SAD en saliva en los grupos clasificados por severidad de caries (bajo, moderado y alto). Al comparar los grupos, se observa una mayor actividad en el grupo bajo (mediana 31,54), respecto al moderado y alto, no así el moderado (mediana 22,64) respecto al grupo alto (mediana 27,42), a pesar de esto, no hubo diferencias significativas entre estos resultados ( $p = 0,20$ ).





**Fig. 5 Actividad enzimática de Arginina deiminasa (SAD) en saliva, en grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries.**

La figura 6 es un diagrama de cajas y bigotes que muestra los resultados obtenidos al analizar la AE de SAD en biofilm oral supragingival en los grupos clasificados por severidad de caries (bajo, moderado y alto) COPD/ceod. La AE de SAD en biofilm oral supragingival fue mayor en el grupo bajo (32,46) respecto al grupo moderado (23,46) y alto (22,76). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio ( $p = 0,46$ ).



**Fig. 6 Actividad enzimática de arginina deiminasa (SAD) en biopelícula oral supragingival, en grupos de Bajo, Moderado, Alto índice de caries.**

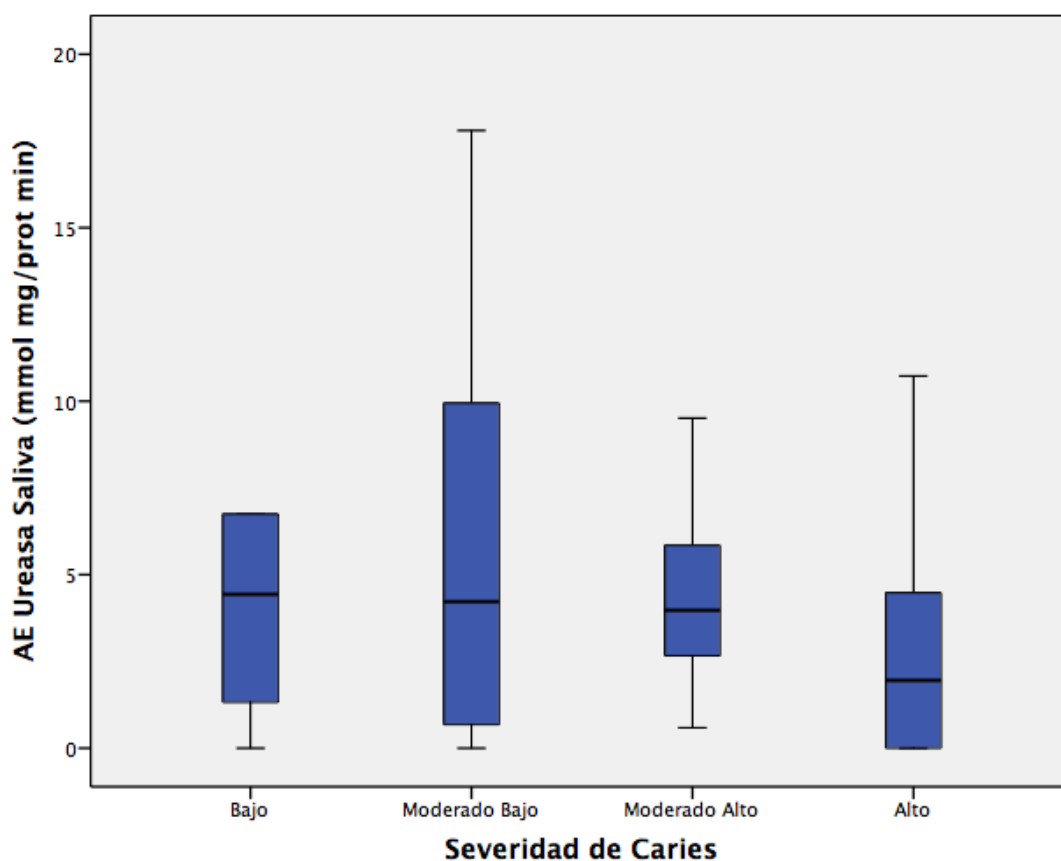
**7. Actividad específica (AE) para ureasa (U) y arginina deiminasa (SAD) en saliva y biofilm supragingival en pacientes de bajo, moderado bajo, moderado alto y severo ICDAS<sup>10</sup>**

Las figuras 7, 8, 9 y 10 se observa la clasificación de los datos según la severidad de caries en cuatro grupos: bajo, moderado bajo, moderado alto y alto, los que son comparados según el nivel de actividad específica de ureasa y SAD obtenido en cada uno de ellos.

<sup>10</sup> Anexo 9: Tabla resumen de datos según severidad de caries.

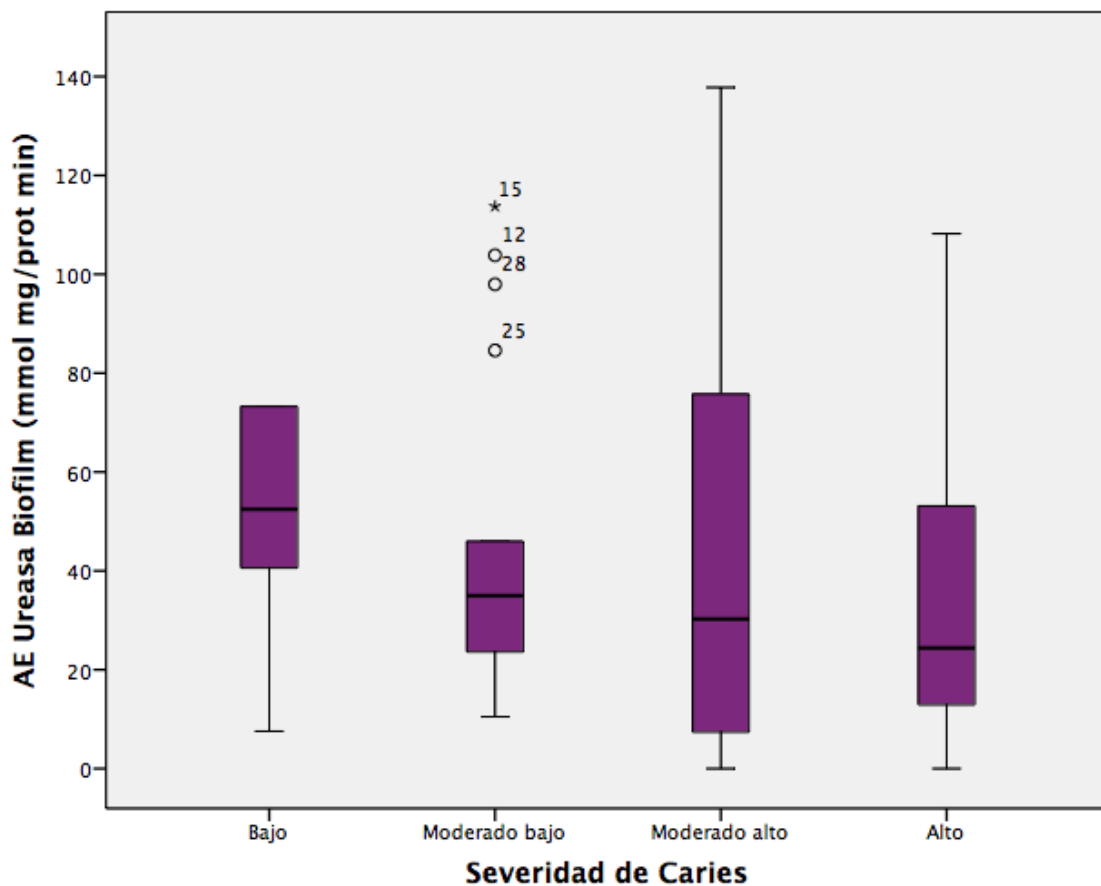
### 7.1 Actividad específica (AE) para ureasa (U) en saliva y biofilm supragingival en pacientes de bajo, moderado bajo, moderado alto y severo ICDAS

La figura 7 es un gráfico de cajas y bigotes que muestra los resultados obtenidos al analizar la AE de ureasa en saliva en los grupos divididos por severidad de caries según ICDAS. Al comparar la urealisis en saliva en el grupo bajo, moderado bajo, moderado alto y alto, se observa una mayor actividad en el grupo bajo (mediana 4,44) respecto al grupo moderado bajo (mediana 4,22), moderado alto (mediana 4,43) y alto (mediana 2,00), a pesar de ello, no existe diferencias estadísticas significativas entre ellos ( $p = 0,28$ ). Sin embargo, entre los grupos bajo y alto se observa una tendencia de mayor AE de ureasa en saliva en el grupo de baja severidad (bajo).



**Fig. 7 Actividad enzimática de ureasa (U) en saliva, en grupos de Bajo, Moderado bajo, Moderado alto y Alto, según código ICDAS.**

La figura 8 es un gráfico de cajas que muestra los resultados obtenidos al analizar la AE de ureasa en biofilm oral supragingival en los grupos divididos por severidad de caries según ICDAS. La AE de ureasa en biofilm oral supragingival en el grupo bajo (mediana 52,46) fue mayor respecto al grupo moderado bajo (mediana 34,99), moderado alto (mediana 31,49) y alto (mediana 24,40). A pesar de esto, no hubo diferencias significativas entre ellos ( $p = 0,20$ ), pero si existe una tendencia de mayor AE de ureasa en biofilm oral supragingival en el grupo libre de caries (bajo).



**Fig. 8 Actividad enzimática de ureasa (U) en biopelícula oral supragingival, en grupos de Bajo, Moderado bajo, Moderado alto y Alto, según código ICDAS**

## 7.2 Actividad específica (AE) para arginina deiminasa (SAD) en saliva y biofilm supragingival en pacientes de bajo, moderado bajo, moderado alto y severo ICDAS

La figura 9 muestra un gráfico de cajas y bigotes con los resultados obtenidos al analizar la AE de SAD en saliva con los grupos divididos por severidad de caries según ICDAS. Al comparar la arginólisis en saliva en el grupo bajo, moderado bajo, moderado alto y alto, se observa una mayor actividad en el grupo bajo (mediana 42,90) respecto al grupo moderado bajo (mediana 26,02), moderado alto (mediana 23,73) y alto (mediana 25,51). A pesar de ello, no existe diferencias estadísticas significativas entre ellos ( $p = 0,21$ ).

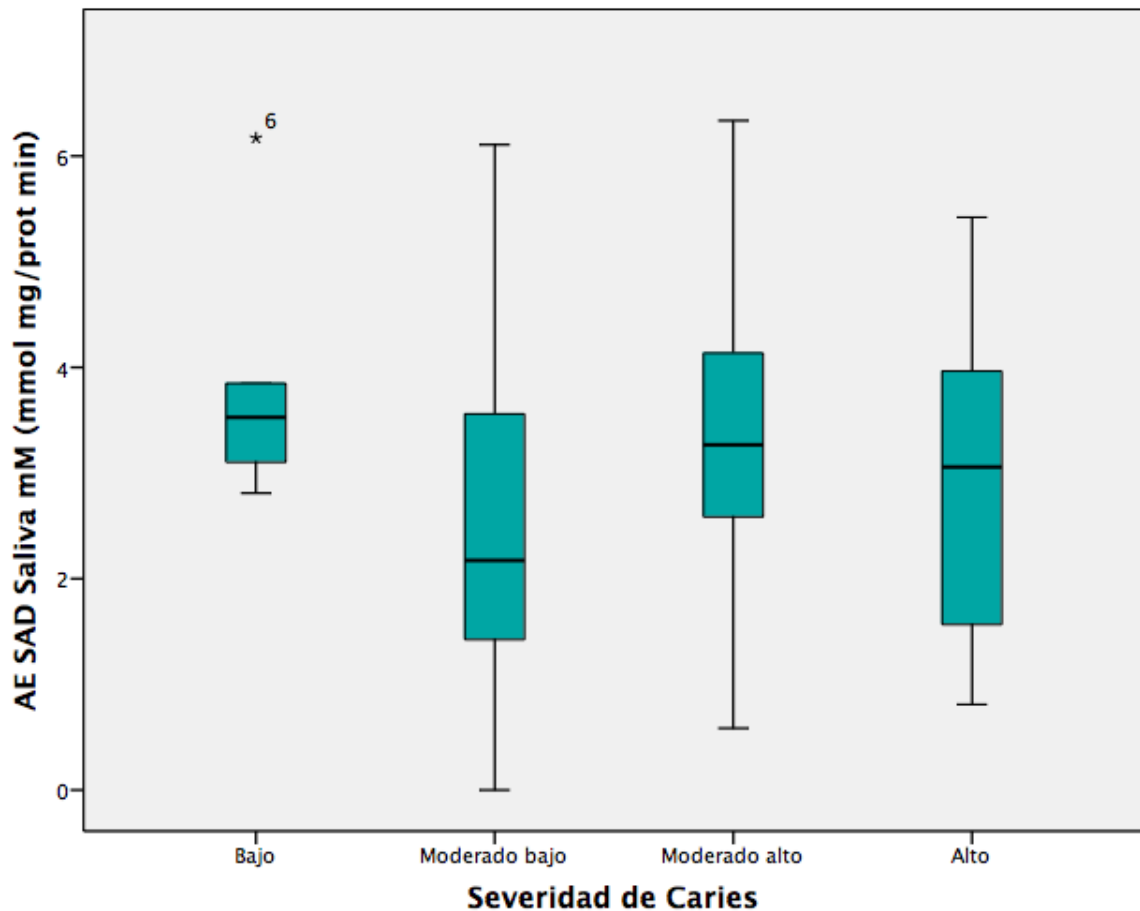
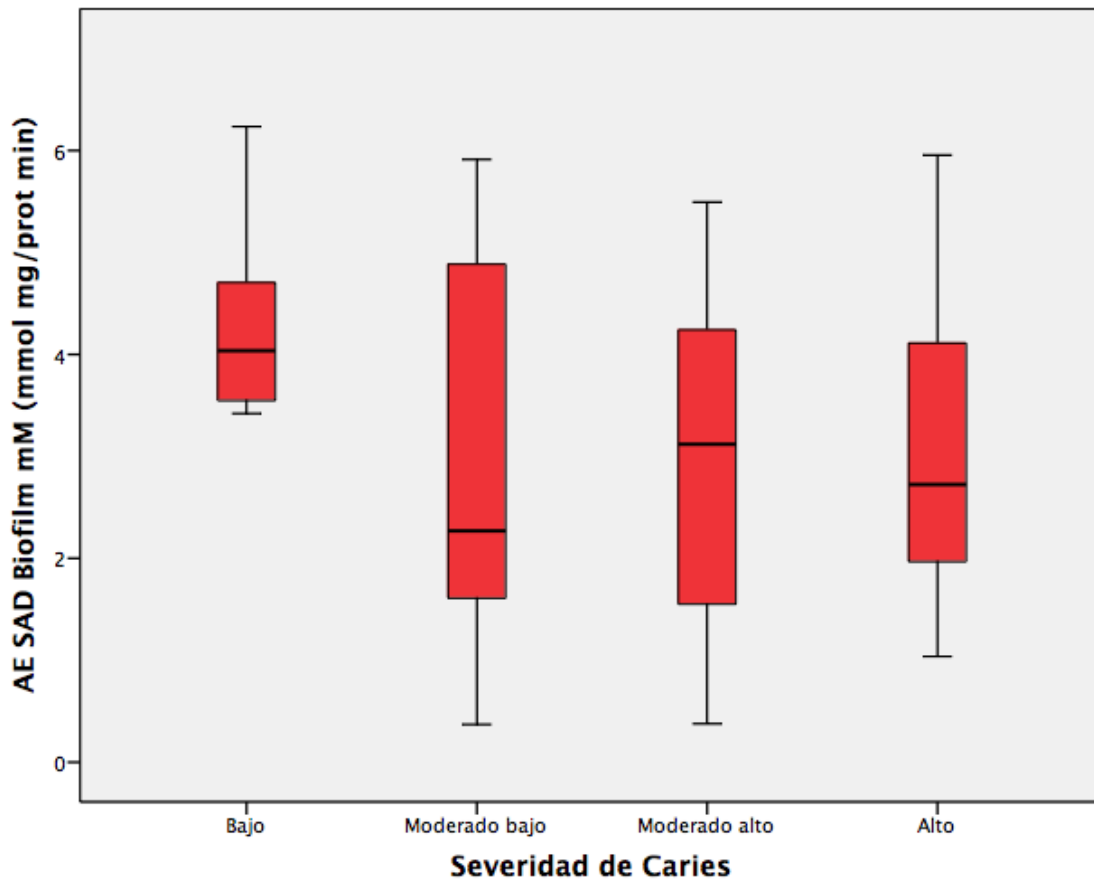


Fig. 9 Actividad enzimática de arginina deiminasa (SAD) en saliva, en grupos de Bajo, Moderado bajo, Moderado alto y Alto, según código ICDAS.

La figura 10 muestra un gráfico de cajas con los resultados obtenidos al comparar la AE de SAD en biofilm oral supragingival con los grupos divididos por severidad de caries según ICDAS. La AE de ureasa en biofilm oral supragingival en el grupo bajo (mediana 59,33) fue mayor respecto al grupo moderado bajo (mediana 28,13), moderado alto (mediana 29,32) y alto (mediana 29,37), a pesar de no existir diferencias significativas entre ellos ( $p = 0,14$ ). Sin embargo, si hay una tendencia a demostrar una mayor AE de SAD del biofilm oral supragingival en el grupo libre de caries (bajo) respecto a los otros grupos.



**Fig. 10 Actividad enzimática de arginina deiminasa (SAD) en biopelícula oral supragingival, en grupos de Bajo, Moderado bajo, Moderado alto y Alto, según código ICDAS.**



## Discusión

La caries dental ha sido un problema de salud pública por décadas, que ha generado un gran campo de investigación para buscar métodos que disminuyan su prevalencia y severidad en la población. Por esto, el estudio del nivel de amonio en el biofilm oral supragingival y saliva ha significado un gran avance para descubrir la patogénesis de la caries dental.

Margolis H y cols. en 1988, demostró la existencia de una placa bacteriana alcalina en sujetos resistentes a caries comparado con individuos susceptibles a caries. Chen y cols. 2000, llegó a la conclusión de que pequeñas diferencias en la concentración de urea y en la cantidad de ureasas puede afectar significativamente en la iniciación y/o progresión de la lesión de caries dental. En el presente estudio, se buscó medir el nivel de amonio entre distintos grupos de severidad y experiencia de caries; para esto, se utilizó el índice COPD/ceod y el código ICDAS.

Al comparar la actividad enzimática (AE) de ureasas en saliva y biofilm oral supragingival, en **pacientes de bajo, moderado y alto COPD/ceod** se observa que **no hay diferencias significativas** (Figura 3 y 4), a pesar que los estadísticos descriptivos como la mediana, indican la existencias de pequeñas diferencias a favor del grupo de baja severidad. Esto también se observa en otros estudios clínicos de actividad de ureasa en saliva, en que no se encontró diferencias significativas, pero si hay tendencia de mayor producción de amonio en grupo libre de caries (Gordan V y cols. 2010, Nascimento M y cols. 2009).

Al analizar la actividad enzimática de SAD en saliva y biofilm oral supragingival, respecto a la severidad y experiencia de caries según COPD/ceod, no encontramos diferencias significativas (Figura 5 y 6). También se observa, una mayor AE de ureasa y de SAD del biofilm oral supragingival comparada con la AE en saliva. Además, en el grupo clasificado como severo (**alto COPD/ceod**) de SAD en saliva hay mayor actividad que en el grupo de baja severidad. Esto podría ser explicado debido a que, la microbiota salival es distinta a la microbiota de placa bacteriana supragingival, independiente si presenta o no lesión de caries (Nascimento M y cols. 2013). Al igual que en el estudio de Nascimento y cols. 2013, no se encontró diferencias significativas en AE de SAD en saliva en niños libre de caries y en niños con actividad de caries.



Según el **código ICDAS**, se comparó los distintos grupos por medio de la AE de ureasa en saliva y biofilm oral supragingival y se encontró que **no hubo diferencias significativas entre ellos** (Figura 7 y 8), lo mismo se advirtió en la AE de SAD en saliva y biofilm oral supragingival (Figura 9 y 10). A pesar de esto, se observó que **en los grupos de menor severidad de caries (bajo y medio bajo) hay tendencia de una mayor producción de amonio**. Y al igual que los grupos divididos por COPD, hay una mayor AE de ureasa y de SAD del biofilm oral supragingival comparada con la AE en saliva. Entonces, estas diferencias no encontradas entre los grupos podría ser por el tamaño de la muestra, lo que implicaría aumentar la cantidad de casos para obtener resultados estadísticos significativos.

Es necesario hacer **la distinción entre el índice COPD/coed y el ICDAS**. El primero muestra la historia pasada de caries y no la severidad actual de la enfermedad, en cambio el ICDAS es un criterio más sensible y específico en el diagnóstico de lesiones de caries, ya que detecta la caries desde el inicio de su formación en esmalte, a diferencia del COPD/coed que solo incluye caries ya cavitadas en dentina (Pitts N y cols. 2005). Este hecho podría generar la diferencia, al existir una tendencia de mayor formación de amonio en sujetos de menor riesgo de caries (grupo bajo) en los grupos clasificados por ICDAS, no observándose en los grupos divididos por COPD/coed.

Otras variables que pueden haber influido en los resultados son **las condiciones en que se tomaron las muestras**. No existían todos los implementos necesarios para hacer un diagnóstico certero de severidad y riesgo de caries. Como ejemplo, no existía la luz apropiada para la inspección clínica de cada niño y tampoco la presencia de aire comprimido para realizar el examen clínico, por lo que, no se pudo evaluar el código 1 del criterio ICDAS, ya que implica secar la pieza dentaria a evaluar por 5 segundos con aire comprimido, para ver si por refracción se observa alguna mancha en el diente que no es observable al estar en humedad en la cavidad oral.

Otro factor que puede influir es que, **no hay certeza que los niños cumplieron con el ayuno de 12 horas** que se notificó en el consentimiento informado, a pesar de tener en cuenta que la mayoría de los niños evaluados reciben desayuno al llegar al colegio. Se ha visto que el azúcar fermentable influye en la actividad de ureasa y SAD, su presencia en el medio oral genera la disminución del pH basal y acidificación del medio oral. Además, se ha propuesto que a pH inferiores a 4 la actividad de estas vías enzimáticas se ven afectadas

inhibiendo su acción (Gordan V y cols. 2011, Huang X y cols. 2012). Por lo tanto, a pesar que en las muestras de saliva y biofilm oral supragingival estuvieran presentes bacterias arginólíticas y urolíticas, estas se encontrarían inactivas, provocando un descenso momentáneo del nivel de amonio en el medio oral y afectando posteriormente en los resultados obtenidos.

Los resultados del estudio realizado por Morou-Bermudez E y cols. 2011, apoyan el efecto protector de la ureasa de biofilm oral supragingival en el desarrollo de caries, evidenciado la disminución progresiva de la incidencia de lesiones de caries al aumentar los niveles de actividad. Sin embargo, la asociación de la actividad de la ureasa de placa bacteriana supragingival con el desarrollo de lesiones cariosas no era significativo como se ha visto en otros estudios. Esto puede ser porque un factor de variabilidad sería la **existencia de ayuno previo a la toma de muestras**, lo cual es difícil de controlar debido a la corta edad de los niños. En consecuencia, como lo demuestra la evidencia, este factor tiene un **fuerte impacto en la actividad de la ureasa de la microbiota supragingival en el laboratorio**, en comparación con la ureasa en la saliva, lo que podría haber afectado en la obtención de los resultados del presente estudio.

Reyes E y cols. 2014, realizaron un estudio para medir el nivel de amonio producido por ureasa y SAD en saliva y placa bacteriana supragingival en individuos chilenos mayores a 18 años, libre de caries y con actividad de caries. Se obtuvo que la actividad de ureasa y SAD en saliva fue 6,9 y 4,5 veces mayor en sujetos libre de caries respectivamente. En placa supragingival, los resultados de actividad de ureasa y SAD fueron 48 y 7 veces mayor en individuos libres de caries, respectivamente, concordando con los resultados obtenidos por Gordan V y cols. 2010. Se puede analizar, que este estudio chileno tuvo resultados estadísticos significativos, debido a que el grupo experimental corresponde a sujetos mayores de edad, a los cuales se puede controlar la existencia de ayuno y la abstención del cepillado dental en forma eficaz, no así en niños de tan corta edad.

Otra variable que puede influir en la obtención de resultados estadísticos no significativos, es que **las muestras de placa bacteriana consistía en la recolección total del raspado supragingival de todas las superficies lisas dentales del niño**. En un estudio realizado por Nascimiento y cols. 2013, **estudio arginólítico-sitio específico** en placa supragingival, muestra que **la capacidad para metabolizar arginina por las bacterias varía según el**

**sitio, el huésped y el avance de la lesión de cariosa**, concluyendo que la placa bacteriana de la superficie libre de caries mostraba una amplia gama de actividad del SAD a diferencia de la superficie con lesión de caries. Esta es una posible razón de reproductibilidad inferior de SAD en placa bacteriana supragingival, porque en la toma de muestras se combinaron distintas superficies dentales, sugiriendo que la composición de las muestras podría haber variado por la microbiota obtenida de distintos sitios, ocultando el nivel real de AE de ureasa y arginina deiminasa de los distintos microambientes. Se sugiere estandarizar el protocolo de recolección de placa bacteriana para futuras investigaciones, utilizando el método sitio-específico de biofilm supragingival como protocolo (Morou-Bermudez E y cols. 2011).

En el análisis de resultados, se observa una asociación negativa significativa ( $p = 0,038$ ) entre el nivel de caries y la AE de ureasa en saliva (figura 11), es decir, que mientras mayor nivel de lesiones cariosas hay menor actividad de ureasa existe, por ende, menor cantidad de amonio en la saliva y viceversa. Este resultado demuestra que en los mecanismos implicados en el inicio y desarrollo de lesión cariosa formarían parte las vías de generación de amonio, porque como se dijo anteriormente la disminución de su actividad se relaciona con menor nivel de amonio en el medio oral y por tanto, una menor capacidad para compensar la formación ácida generada por la glicólisis bacteriana de los alimentos fermentables.

Finalmente, a pesar de que los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos, existe tendencia de mayor actividad de ureasa y SAD en grupos de menor riesgo de caries en el criterio ICDAS, no así en el índice COPD, lo que demostraría que el criterio ICDAS es un índice más específico y sensible para ser utilizado en futuras investigaciones científicas, y permitiría corroborar el rol protector del amonio en el inicio y desarrollo de las lesiones cariosas.

Para futuras investigaciones es necesario tener presente, la sensibilidad de la técnica, ya que es imprescindible mantener el ayuno de los sujetos en estudio. Tener en cuenta que la metodología sitio-específico es más específica y sensible, ya que como fue mencionado anteriormente, el biofilm oral supragingival varía según el sitio, condiciones del huésped, desarrollo de lesión cariosa y el microambiente en que se encuentra en el medio oral. Aumentar el tamaño de la muestra para lograr tener resultados estadísticos significativos y tratar de imitar estas condiciones ideales para la toma de muestras en los colegios.

## Conclusiones

Una mayor actividad de ureasa y SAD en saliva y biofilm oral supragingival en niños de 6 años con y sin lesiones de caries, no se asocia con una disminución de COPD/ceod.

A pesar que no hay diferencias significativas, existe una tendencia de mayor actividad de ureasa y SAD en saliva y biofilm oral supragingival en niños de 6 años sin lesiones de caries o código ICDAS 0.

Hay una mayor actividad de ureasa y SAD en biofilm oral supragingival comparada con la actividad de ureasa y SAD en saliva.

Existe una asociación negativa significativa entre la actividad de caries y la actividad de ureasa en saliva, es decir, a mayor severidad y riesgo de caries menor actividad de ureasa.

El código ICDAS es más específico y sensible que el índice COPD como parámetro metodológico en el análisis estadístico de la severidad de caries dental.

Para obtener resultados con diferencias significativas entre los grupos de estudio, es necesario aumentar el tamaño de la muestra y estandarizar la técnica de recolección de placa bacteriana supragingival.

## Bibliografía

Aas J, Griffen A, Dardis S, Lee A, Olsen I, Dewhirst F y cols. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol 2008, vol. 46, pag.1407-1417, 2008.

Appelgren L, Dahlén A, Eriksson C y cols. “Dental plaque pH and ureolytic activity in children and adults of a low caries population”. Arch Oral Biol; vol. 56, pag. 1560–1568, 2011.

Moncada G, Urzua I, Libro “Cariología Clínica, Bases preventivas y restauradoras”, vol. único, pag. 51-73, 2008.

Arora R y Sarvaiya B. Estimation of Salivary urea levels and its relation with dental caries in children with chronic renal failure. J Oral Health Res, vol. 1, pag. 70-75, 2010.

Badenier O, Cueto A, Moya R y col. Estudio de Prevalencia de las enfermedades bucodentales y necesidades de tratamiento en la V Región. Minsal, 2007.

Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. Am J Dent; vol. 22, pag. 3-8, 2009.

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; vol. 40, pag. 1001-1009, 2002.

Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol Lett, vol. 193, pag. 1-6, 2000.

Clancy K, Pearson S, Bowen W, Burne R. Characterization of recombinant, ureolytic *Streptococcus mutans* demonstrates an inverse relationship between dental plaque ureolytic capacity and cariogenicity. Infect Immun, vol. 68, pag. 2621-2629, 2000.

Ceballos M, Acevedo C y col. Diagnóstico en Salud Bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar en la Región Metropolitana. Minsal, 2007.

Chen Y, Weaver C, Burne R. Dual functions of *Streptococcus salivarius* urease. J Bacteriol, vol.182, pag. 4667–4669, 2000.

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, vol. 43, pag. 5753-5759, 2005.

Cummins D, “Dental Caries: A Disease Which Remains a Public Health Concern in the 21st Century The Exploration of a Breakthrough Technology for Caries Prevention”, J Clin Dent, vol. 24, pag. 1–14, 2013.

Cummins D, “The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries”, JJ Oral Dent, vol. 2164, pag. 12, 2013.

Dumitrescu A. Etiology and pathogenesis of periodontal disease Springer-Verlag Berlin, capítulo 1 y 2, vol. 2010.

Ekstrand K, Qvist V, Thylstrup A. Light microscope study of the effect of probing in occlusal surfaces. Caries Res, vol. 21, pag. 363–374, 1987.

Epstein S, Mandel I, Scoop I. Salivary composition and calculus formation in patients undergoing hemodialysis. J Periodontol, vol. 51, pag. 336–338, 1980

Ertugrul F, Elbek-Cubukcu C, Sabah E, Mir S. The oral health status of children undergoing hemodialysis treatment. Turk J Pediatr, vol. 45, pag.108-113, 2003.

Fejerskov O. “Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care”. Caries Res, vol.38, pag.182-191, 2004

Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, vol. 150, pag. 76-85, 1985.

Gordan V, Garvan C, Ottenga M, Schulte R, Harris P, McEdward D y col. "Could Alkali Production Be Considered an Approach for Caries Control?" *Caries Res*, vol.44, pag. 547-554, 2011.

Holmgren C y cols. Encuesta de salud bucodental, métodos básicos. Organización Mundial de la Salud. 4º Edición, vol. 99/11416, 1997.

Huang X., Exterkate R, y Cate J. Factors Associated with Alkali Production from Arginine in Dental Biofilms, *J Dent Res*, vol. 91, pag. 1130-1134, 2012.

Kidd E., Fejerskov O. "What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms", *J Dent Res*, vol. 83, pag. 35-38, 2004.

Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T, Mateo LR, Ellwood R, Cummins D, Vizio W, Zhang Y. Two-year caries clinical study of the efficacy of novel dentifrices containing 1.5% arginine, an insoluble calcium compound, and 1450 ppm fluoride. *Caries Res*, vol. 47, pag. 582-590.

Liu Y, Nascimento M y Burne R. "Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries", *Int J Oral Sci*, vol. 4, pag. 135-140, 2012.

Lloret S, Andrés J, Legua C, Falcó P. Determination of ammonia and primary amine compounds and Kjeldahl nitrogen in water samples with a modified Roth's fluorimetric method. *Talanta*, vol. 65, pag. 869-75, 2005.

Maeda T, Yuichi K, Hidenobu S, Burrow M, Junji T. "Role of oral streptococci in the pH-dependent carious dentin", *J Med Dent Sci* 2006, vol. 53, pag.159-166, 2010.

Margolis H, Duckworth J, Moreno E. Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res* 1988, vol. 67, pag.1468-1475, 1988.

Maureira J. 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. Trabajo de investigación requisito para optar a título de cirujano dentista. Universidad de Chile, Facultad de odontología, 64 páginas, 2013.

Morou-Bermudez E, Elias-Boneta A, Billings R, Burne R, Garcia-Rivas V, Brignoni-Nazario V y Suarez-Perez E. 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*, vol. 56, pag. 1282-1289, 2011.

Nascimento M, Gordan V, Garvan C, Browngardt C, Burne R. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol*, vol. 24, pag. 89-95, 2009.

Nascimento M, Liu Y, Kalra R, Perry S., Adewumi A., Xu X, Primosch R and Burne R, Oral Arginine Metabolism May Decrease the Risk for Dental Caries in Children, *J Dent Res*, vol. 92, pag. 604-608, 2013.

Nascimento M, Browngardt C, XiaohuiX, Klepac-Ceraj V, Paster By Burne R. The effect of arginine on oral biofilm communities, Published by John Wiley & Sons Ltd *Molecular Oral Microbiology*, vol. 29, pag. 45-54, 2014.

Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N y Acad Sci*, vol. 694, pag. 72-77, 1993.

OMS: Preparación de indicadores para vigilar los progresos realizados en el logro de la salud para todos en el año 2000, 1981.

OMS: La formación en epidemiología para el desarrollo de los servicios de salud. Publicación



Nº 88, 1988.

Petersson G y Bratthall D. "The caries decline: a review of reviews" *Euro J Oral Sci*, vol. 104, pag. 436-443, 1996.

Petersen P. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol*, vol.31, pag. 3-24, 2003.

Pieralisi F, Rodrigues M, Segura V, Maciel S, Ferreira F, Garcia J, Poli-Frederico R. "Genotypic Diversity of *Streptococcus mutans* in Caries-Free and Caries-Active Preschool Children", Hindawi Publishing Corporation, *Int J Dent*, vol. 2010, 5 páginas, 2010.

Piovanos S, Squassi A, Bordoni N. Estado del arte de indicadores para la medición de caries dental. *Rev Odon UBA*, vol. 25, pag. 29-43, 2010.

Pitts NB, Stamm J. International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT) Final Consensus Statements: Agreeing Where the Evidence Leads. *J Dent Res*, vol. 83, pag.125-128, 2004.

Pitts N, Ismail A, Topping G, Banting D, Eggertsson H, y cols. International Caries Detection and Assessment System Coordinating Committee, Rationale and Evidence for the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II). Workshop held in Baltimore, Maryland. 2005.

Pontarolo R, Gomara FL, Correr CJ, Sato MEO, 2004. Development and validation of a spectrophotometric method for the quantification of kojic acid. *Ars Pharm*, vol. 45, pag. 145-153.

Reyes Beltrán E, Yévenes López I. Implementación de una metodología para la medición de la actividad ureasa y arginina deiminasa en saliva y biopelícula oral humana. Trabajo de

investigación requisito para optar a título de cirujano dentista. Universidad de Chile, Facultad de Odontología, 68 páginas, 2012.

Reyes É, Martín J, Yevenes I, Neira M, Palma P, Gordan V, Moncada G. Actividad y Efectos de ureasa y arginina deiminasa en saliva y biopelícula oral humana. Rev Fac Odonto I Univ Antioq, vol. 23, pag. 159-168, 2012.

Reyes E, Martin J, Moncada G, Neira M, Palma P, Gordan V, Oyarzo JF, Yévenes I. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. Journal of applied oral science, vol 22, pag 235-240, 2014.

Shannon I, Feller R, Eknoyan G, Suddick R. Human parotid saliva urea in renal failure and during dialysis. Arch Oral Biol, vol. 22, pag 83-86, 1977.

Shivakumar K, Prasad S, Chandu G. International Caries Detection and Assessment System: A new paradigm in detection of dental caries. J Conserv Dent, vol.12, pag.10-16, 2009.

Shu M, Morou-Bermudez E, Suárez-Pérez E, Rivera-Miranda C, Browngardt CM, Chen Y-YM, Magnusson I, Burne RA. The relationship between dental caries status and dental plaque urease activity. Oral Microbiol Immunol, vol. 22, pag. 61–66, 2007.

Skoog AD, Leary JL, 1994. Análisis Instrumental, cuarta edición, McGraw-Hill

Soto L, Tapia R, Jara G, Rodríguez G, Urbina T, Venegas C y cols. 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, 2007.

Souza M, Cury J, Tenuta L, Zhang Y, Mateo L, Cummins D, Ellwood R. Comparing the efficacy of a dentifrice S10 J of Dent 41s s1-s11 containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing fluoride alone in the management of primary root caries. vol. 41, pag. J Dent, vol 41, 35–41, 2013.

Srisilapanan P, Korwanich N, Yin W, Cheunsuwonkul C, Mateo LR, Zhang YP, Cummins D, Ellwood R. Comparison of the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of early coronal caries as assessed using quantitative light-induced fluorescence. *J of Dent*, vol. 41, pag. 29-34, 2013.

Toro E, Nascimento M, Suarez-Perez E, Burne R, Elias-Boneta A y Morou-Bermudez E. The Effect of Sucrose on Plaque and Saliva Urease Levels in vivo. *Arch Oral Biol*, vol. 55, pag. 249-254, 2010.

Urzua I, Mendoza C, Arteaga O, Rodríguez G, Cabello R, Faleiros S, Carvajal P, Muñoz A, Espinoza I, Aranda W y Gamonal J. "Dental Caries Prevalence and Tooth Loss in Chilean Adult Population". First National Dental Examination Survey, Hindawi. *Int J Dent*, Vol. 2012, 6 páginas, 2012.

II Encuesta de calidad de vida y salud Chile, Subsecretaría de salud pública, división de planificación sanitaria, Departamento de Epidemiología, Unidad de Estudios y Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles. Ministerio de Salud, 2006.

## Anexo N° 1. Espectrofotometría

La espectrofotometría es uno de los métodos cuantitativos más usados, y consiste en la relación que hay entre la absorción de la luz por parte de una sustancia y su concentración. Cuando se hace incidir una luz monocromática (una longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y la otra transmitida (Skoog y Leary 1994).

Cada compuesto tiene su propio espectro de absorción, el que se observa como una curva que expresa la cantidad de energía radiante absorbida por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético (Absorbancia (A)), 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 (Skoog y Leary 1994). Para hacer las determinaciones cuantitativas se prefiere utilizar, la longitud de onda correspondiente a la máxima absorbancia, ya que a esa longitud de onda el error de medición es ínfimo y la sensibilidad máxima (Pontarolo y cols. 2004).

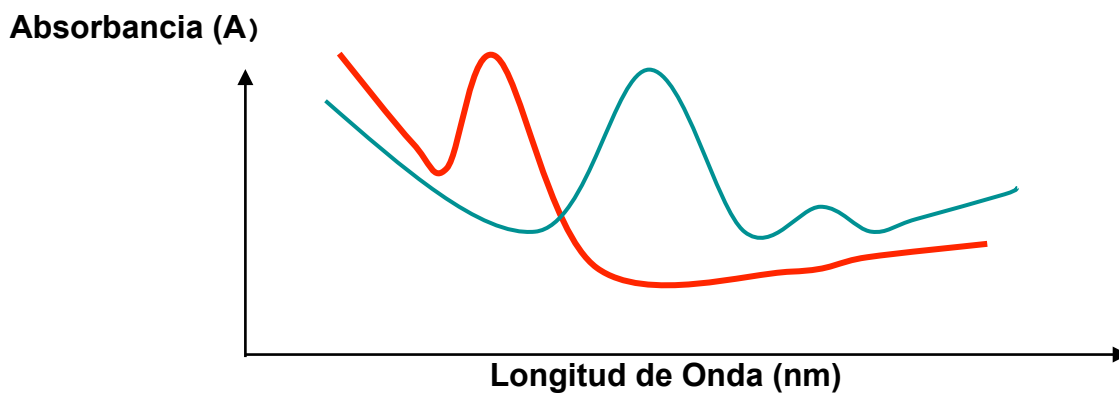


Fig.12 Espectro de absorción de dos compuestos diferentes (Skoog y Leary 1994).

Las mediciones de absorbancia o transmitancia (T), razón entre la luz monocromática transmitida por una muestra y la energía o luz incidente sobre ella, se hacen por comparación entre la muestra experimental y un estándar arbitrario o referencia. Como la referencia debe poseer un porcentaje de T de 100%, esta es llamada referencia de 100%, o una absorbancia de cero. En espectrofotometría se mide el porcentaje de T, ya que su escala de medición es lineal, mientras que la escala de medición de la absorbancia es logarítmica. La medición de A o

T se hacen por comparación entre la muestra experimental y el estándar arbitrario (o referencia) (Skoog y Leary 1994).

La longitud de onda de trabajo corresponde, generalmente, a la longitud de onda en la cual la absorbancia del analito (sustancia a analizar) es máxima, y recibe la denominación de Lambda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ). Para seleccionar el  $\lambda_{\text{máx}}$ , se hace un espectro de absorción o curva espectral, que consiste en una gráfica que indica la A de una solución la que es medida a distintas longitudes de onda y en la longitud de onda de mayor absorbancia se determina el  $\lambda_{\text{máx}}$  (Skoog y Leary 1994). Fig. 2

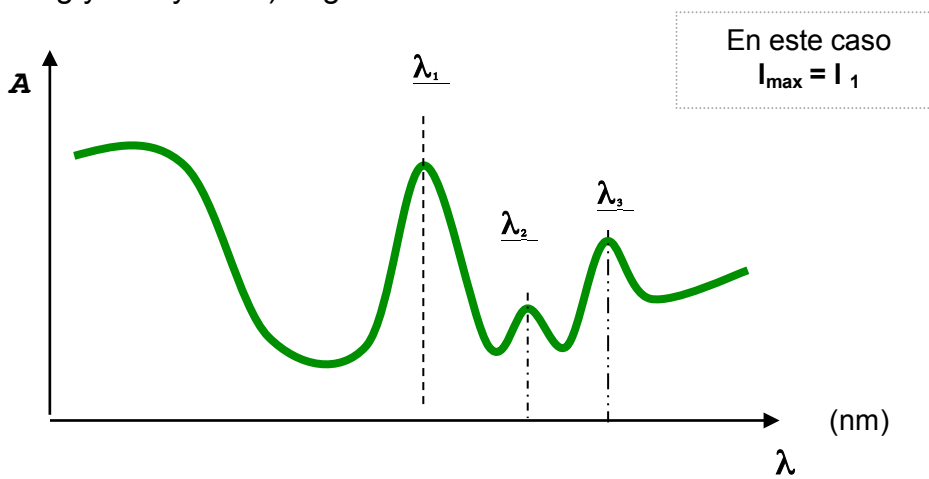


Fig. 13 Curva espectral

Las mediciones de absorbancia se hacen en la zona de longitudes de onda donde se espera que absorba la sustancia experimental. Si se trata de sustancias coloreadas, las mediciones se realizan en la zona visible del espectro electromagnético (380 a 800nm) (Skoog y Leary 1994).

La Curva de Calibración es uno de los métodos más utilizados para determinar la concentración de una muestra experimental. La cual es una gráfica que relaciona la concentración de al menos cinco soluciones estándar de concentraciones conocidas, con la A de cada uno de ellos a la  $\lambda_{\text{máx}}$ . (Skoog y Leary 1994).

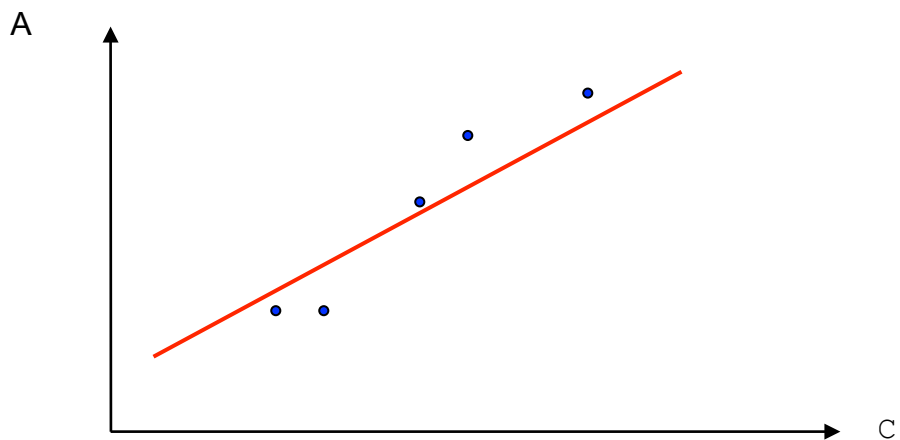


Fig. 14 Curva de Calibración (Skoog y Leary 1994).

Al hacer la curva de calibración, se debe emplear la longitud de onda de máxima absorbancia ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ), para obtener una recta con la máxima pendiente y así tener mayor sensibilidad y precisión al hacer las mediciones (Skoog y Leary 1994).

## Anexo N° 2. Reactivos

### 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.

$C_4H_{11}NO_3 \cdot C_4H_4O_4NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot C_4H_4O_4$

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.

$C_4H_{11}NO_3 \cdot C_4H_4O_4NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot C_4H_4O_4$

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

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.

$CO(NH_2)_2$

PM  $CO(NH_2)_2$  = 60,06 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.

$(NH_4)_2SO_4$

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):  $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$

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° 3. Consentimiento informado

---



MAT.: Recepción trabajo de Investigación  
para evaluación del Comité de  
Ética.

SANTIAGO, 09 de septiembre de 2013

Prof. Dr.  
Gustavo Moncada Cortés  
Investigador Responsable  
Presente

De mi consideración:

Informo a usted que se ha recepcionado Proyecto “Cuantificación y caracterización de la producción de álcali por cepas bacterianas del biofilm dentario y saliva en pacientes con y sin lesiones activas de caries dental” enviado por usted, el que será analizado por el Comité de Ética de nuestra Facultad.

Sin otro particular, le saluda atentamente,

**DRA. MARÍA ANGÉLICA TORRES V**  
**PRESIDENTE COMITÉ DE ÉTICA**



C.c.: Archivo  
MATV/vrd.

**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 – Olivos 943 – 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.



### **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 anexa 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 la realizará a mi hijo(a) o pupilo(a).
3. Tengo conocimiento del procedimiento que se la 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 el 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) o 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. Certificado Comité de Bioseguridad



Comité Institucional de Bioseguridad

Administración Conjunta Campus Norte

FDO N°9

Santiago, 13 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 del Dr. 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: 29781748, Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>

## Anexo N° 5. Ficha Clínica

Ficha clínica proyecto FONIS SA 13I20205  
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)

### INFORMACIÓN GENERAL:

NOMBRE(9) .....

EDAD EN AÑOS (10)

GÉNERO (11)

F= 0 M= 1

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

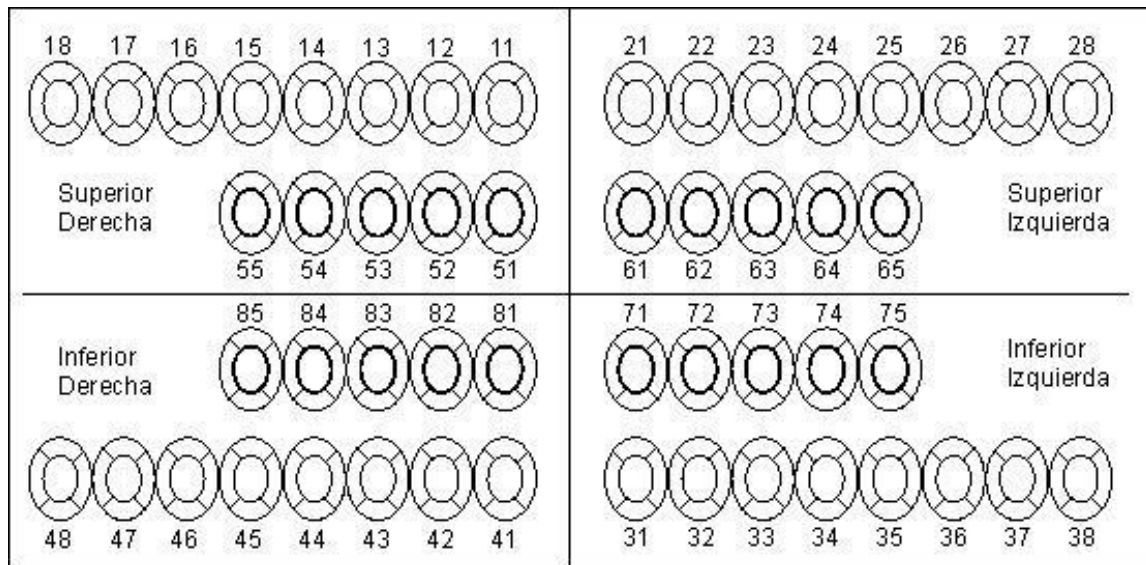
1 = TEMPORAL

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

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

### ODONTOGRAMA - ICDAS

(vestibular)



**(vestibular)**

CRITERIOS ICDAS: registrar el número correspondiente en cada superficie observada

0 – Sano

1 - Primer cambio visual de opacidad en esmalte (mediante secado prolongado de la superficie – mínimo 5 segundos)

2- Cambio visual de opacidad en esmalte :  $\left\{ \begin{array}{l} 2.A : \text{activa} \\ 2.B \text{ inactiva} \end{array} \right.$

3- Micro cavitación en esmalte

4- Presencia de sombra u oscurecimiento bajo el esmalte

5- Cavidad limitada con dentina expuesta (50% o menos de la superficie)

6- Cavidad extensa con dentina expuesta (más de 50% de la superficie)

**REGISTRO DE EXPERIENCIA DE CARIES - OMS (considerar caries como lesión cavitada con dentina expuesta)**

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

|          |          |          |
|----------|----------|----------|
| <b>C</b> | <b>O</b> | <b>P</b> |
|          |          |          |

|          |          |          |
|----------|----------|----------|
| <b>c</b> | <b>e</b> | <b>o</b> |
|          |          |          |

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

## Anexo N° 6. Informe de Caries dental

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“INFORME DE DIAGNÓSTICO Y NECESIDAD DE TRATAMIENTO DE LOS ALUMNOS DEL 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:.....

.....

.....

Gracias por su tiempo y colaboración en este estudio. Se despiden atentamente



## Anexo N° 7. Valores de curvas de calibración

### Valores de curva de calibración de proteínas totales

| Estándar | Conc.(mg/ml) | Abs 595 nm |
|----------|--------------|------------|
| St. 01   | 0            | 0.278      |
| St. 02   | 0.2          | 0.369      |
| St. 03   | 0.8          | 0.52       |
| St. 04   | 1.4          | 0.646      |
| St. 05   | 2            | 0.655      |

### Valores de curva de calibración de amonio

| Estándar | Conc.(mM) | Abs 395 nm |
|----------|-----------|------------|
| St. 01   | 0.00      | 0.583      |
| St. 02   | 1.25      | 0.917      |
| St. 03   | 3.75      | 1.255      |
| St. 04   | 7.50      | 1.84       |
| St. 05   | 10.00     | 2.442      |
| St. 06   | 20.00     | 2.925      |
| St. 07   | 30.00     | 3.067      |

**Anexo N° 8. Tabla resumen de datos por grupo de severidad de caries**

**Tabla N°8. Actividad específica (AE) para ureasa (U) y arginina deiminasa (SAD) en saliva y biofilm supragingival en pacientes de bajo, moderado y alto COPD/ceod.**

|   |         |         | Bajo   | Moderado | Alto  | p    |
|---|---------|---------|--------|----------|-------|------|
| <b>Ureálisis</b>                                  |         |         |        |          |       |      |
| mmol min <sup>-1</sup><br>1mg prot. <sup>-1</sup> | Saliva  | Media   | 8,77   | 6,33     | 6,30  |      |
|   |         | DE      | 13,38  | 11,29    | 13,83 | 0,41 |
|   |         | Mediana | 5,86   | 3,89     | 2,54  |      |
| Biofim  | Media   | 127,95  | 89,62  | 27,58    |       |      |
|   | DE      | 346,92  | 204,80 | 28,48    | 0,25  |      |
|   | Mediana | 32,84   | 26,39  | 15,83    |       |      |
| <b>SAD</b>  |         |         |        |          |       |      |
| mmol min <sup>-1</sup><br>1mg prot. <sup>-1</sup> | Saliva  | Media   | 34,46  | 23,56    | 31,82 |      |
|   |         | DE      | 19,16  | 15,66    | 29,99 | 0,20 |
|   |         | Mediana | 31,54  | 22,64    | 27,42 |      |
| Biofilm   | Media   | 119,58  | 34,94  | 24,36    |       |      |
|   | DE      | 348,64  | 39,36  | 20,16    | 0,46  |      |
|   | Mediana | 32,46   | 23,46  | 22,76    |       |      |

DE= Desviación estándar

p<0,05

## Tabulación de datos por grupo de severidad de caries

### Datos tabulados según COPD/ceod

| Severidad Caries | Muestras | Proteínas Saliva mg/ml | Proteínas Biofilm mg/ml | Ureasa Saliva mM | Ureasa Biofilm mM | SAD Saliva mM | SAD Biofilm mM | AE U Saliva mmol min <sup>-1</sup> mg prot <sup>-1</sup> | AE U Biofilm mmol min <sup>-1</sup> mg prot <sup>-1</sup> | AE SAD Saliva mmol min <sup>-1</sup> mg prot <sup>-1</sup> | AE SAD Biofilm mmol min <sup>-1</sup> mg prot <sup>-1</sup> |
|------------------|----------|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|---------------|----------------|--|---|--|---|
| Bajo             | 27       | 0,65                   | 1,25                    | 0,66             | 4,70              | 1,60          | 0,98           | 11,27  | 33,34   | 27,46  | 6,98  |
| Bajo             | 41       | 1,13                   | 1,89                    | 1,82             | 2,02              | 2,03          | 1,64           | 17,80  | 9,49  | 19,88  | 7,73  |
| Bajo             | 42       | 1,44                   | 0,60                    | 2,02             | 1,88              | 1,58          | 1,71           | 15,66  | 27,99   | 12,21  | 25,49   |
| Bajo             | 43       | 0,89                   | 0,73                    | 1,23             | 7,50              | 1,39          | 2,15           | 15,35  | 90,97   | 17,36  | 26,11   |
| Bajo             | 44       | 1,05                   | 0,86                    | 0,82             | 1,75              | 2,43          | 1,61           | 8,62   | 18,15   | 25,70  | 16,69   |
| Bajo             | 47       | 0,68                   | 0,86                    | 0,00             | 2,41              | 2,09          | 2,00           | 0,00   | 25,03   | 34,37  | 20,74   |
| Bajo             | 49       | 0,36                   | 1,13                    | 0,00             | 2,35              | 1,06          | 1,43           | 0,00   | 18,45   | 33,02  | 11,19   |
| Bajo             | 50       | 1,11                   | 1,03                    | 0,00             | 1,78              | 1,05          | 0,54           | 0,00   | 15,39   | 10,47  | 4,69  |
| Bajo             | 54       | 0,46                   | 1,17                    | 2,29             | 5,85              | 3,46          | 4,51           | 55,07  | 44,44   | 83,09  | 34,24   |
| Bajo             | 55       | 1,11                   | 0,03                    | 0,10             | 5,05              | 6,11          | 5,09           | 1,00   | 1496,0  | 61,02  | 1506,67   |
| Bajo             | 56       | 1,44                   | 0,22                    | 0,76             | 6,95              | 2,81          | 4,71           | 5,86   | 276,95  | 21,67  | 187,54  |
| Bajo             | 58       | 0,68                   | 1,08                    | 0,41             | 0,92              | 3,60          | 3,55           | 6,75   | 7,57  | 59,24  | 29,17   |
| Bajo             | 60       | 1,00                   | 0,58                    | 0,27             | 3,96              | 3,85          | 3,57           | 3,01   | 60,48   | 42,84  | 54,45   |
| Bajo             | 61       | 1,51                   | 0,47                    | 0,18             | 3,89              | 3,10          | 3,42           | 1,32   | 73,26   | 22,78  | 64,43   |
| Bajo             | 62       | 1,24                   | 1,93                    | 0,78             | 6,03              | 4,50          | 4,90           | 7,01   | 27,71   | 40,43  | 22,51   |
| Bajo             | 75       | 1,60                   | 0,86                    | 0,00             | 3,94              | 6,17          | 6,23           | 0,00   | 40,58   | 42,95  | 64,21   |
| Bajo             | 85       | 1,25                   | 1,28                    | 0,04             | 2,36              | 3,52          | 5,91           | 0,36   | 16,34   | 31,37  | 40,93   |
| Bajo             | 89       |                        | 0,97                    |                  | 2,29              |               | 3,14           |  | 20,94   |  | 28,73   |
| Moderado         | 20       | 0,00                   | 0,85                    | 0,60             | 2,53              | 3,83          | 2,25           | 0,00   | 26,38   | 0,00   | 23,50   |
| Moderado         | 21       | 0,73                   | 0,00                    | 0,32             | 2,88              | 0,59          | 1,02           | 4,89   | 0,00  | 8,94   | 0,00  |
| Moderado         | 25       | 0,44                   | 0,00                    | 0,23             | 1,71              | 0,89          | 1,55           | 5,85   | 0,00  | 22,40  | 0,00  |
| Moderado         | 26       | 0,00                   | 0,18                    | 0,13             | 8,94              | 2,26          | 0,96           | 0,00   | 439,19  | 0,00   | 47,29   |
| Moderado         | 30       | 0,69                   | 0,60                    | 0,52             | 2,49              | 2,45          | 1,39           | 8,37   | 36,77   | 39,70  | 20,58   |
| Moderado         | 31       | 1,44                   | 0,90                    | 0,29             | 0,49              | 1,12          | 1,16           | 2,23   | 4,85  | 8,65   | 11,46   |
| Moderado         | 33       | 0,84                   | 1,41                    | 0,72             | 2,40              | 1,71          | 1,46           | 9,51   | 15,10   | 22,59  | 9,20  |
| Moderado         | 34       | 0,94                   | 1,23                    | 0,22             | 1,59              | 2,69          | 3,25           | 2,63   | 11,54   | 31,98  | 23,54   |
| Moderado         | 35       | 2,00                   | 1,95                    | 0,62             | 3,20              | 3,30          | 2,11           | 3,45   | 14,61   | 18,32  | 9,61  |
| Moderado         | 39       | 1,58                   | 1,28                    | 0,23             | 2,73              | 1,46          | 2,27           | 1,64   | 18,90   | 10,29  | 15,71   |
| Moderado         | 45       | 1,47                   | 1,46                    | 0,87             | 0,97              | 2,59          | 1,11           | 6,56   | 5,91  | 19,53  | 6,78  |
| Moderado         | 52       | 1,30                   | 0,43                    | 0,78             | 0,52              | 6,34          | 5,48           | 6,67   | 10,66   | 54,15  | 113,08  |
| Moderado         | 57       | 1,08                   | 0,00                    | 0,68             | 22,44             | 5,12          | 5,50           | 7,02   | 0,00  | 52,82  | 0,00  |
| Moderado         | 59       | 1,51                   | 0,35                    | 0,08             | 4,20              | 3,27          | 3,24           | 0,59   | 105,76  | 24,07  | 81,54   |
| Moderado         | 64       | 2,21                   | 1,48                    | 0,13             | 14,17             | 4,65          | 5,23           | 0,65   | 84,99   | 23,38  | 31,38   |
| Moderado         | 66       | 1,87                   | 0,80                    | 0,94             | 14,20             | 4,99          | 4,46           | 5,58   | 157,78  | 29,64  | 49,56   |
| Moderado         | 68       | 1,41                   | 0,18                    | 1,34             | 20,18             | 1,16          | 3,55           | 10,53  | 1019,1  | 9,11   | 179,44  |

|          |    |      |      |      |      |      |      |       |        |        |       |
|----------|----|------|------|------|------|------|------|-------|--------|--------|-------|
| Moderado | 70 | 0,73 | 0,38 | 0,36 | 4,70 | 3,26 | 3,00 | 5,46  | 110,23 | 49,34  | 70,36 |
| Moderado | 71 | 1,99 | 0,77 | 0,13 | 4,79 | 1,86 | 3,30 | 0,73  | 55,01  | 10,36  | 37,84 |
| Moderado | 72 | 0,00 | 1,87 |      | 4,89 |      | 0,38 |       | 23,22  |        | 1,79  |
| Moderado | 77 | 1,62 | 0,45 | 0,80 | 1,41 | 4,14 | 1,83 | 5,50  | 28,10  | 28,41  | 36,49 |
| Moderado | 82 | 1,12 | 1,20 | 0,40 | 3,39 | 4,38 | 2,36 | 3,98  | 25,20  | 43,50  | 17,54 |
| Moderado | 83 | 1,24 | 1,03 | 0,40 | 7,05 | 4,09 | 5,31 | 3,58  | 60,61  | 36,57  | 45,60 |
| Moderado | 84 | 0,88 | 1,96 | 4,73 | 5,22 | 0,00 | 3,86 | 59,86 | 23,67  | 0,00   | 17,51 |
| Moderado | 87 | 1,92 | 0,77 | 0,51 | 6,46 | 3,70 | 4,22 | 2,95  | 74,67  | 21,36  | 48,81 |
| Moderado | 91 | 1,78 | 1,72 | 0,61 | 7,33 | 3,99 | 4,11 | 3,80  | 37,97  | 24,84  | 21,30 |
| Moderado | 92 | 1,46 | 1,61 | 0,35 | 5,30 | 2,98 | 4,24 | 2,66  | 29,32  | 22,69  | 23,46 |
| Alto     | 19 | 0,00 | 0,00 | 0,28 | 1,32 | 1,57 | 2,72 | 0,00  | 0,00   | 0,00   | 0,00  |
| Alto     | 22 | 0,15 | 0,00 | 0,79 | 3,16 | 1,24 | 1,97 | 58,44 | 0,00   | 91,78  | 0,00  |
| Alto     | 23 | 0,00 | 1,66 | 0,31 | 0,72 | 1,04 | 1,29 | 0,00  | 3,84   | 0,00   | 6,92  |
| Alto     | 24 | 0,00 | 0,33 | 0,74 | 3,23 | 1,74 | 2,26 | 0,00  | 86,56  | 0,00   | 60,59 |
| Alto     | 28 | 0,60 | 0,00 | 0,43 | 0,50 | 2,96 | 1,90 | 8,08  | 0,00   | 55,09  | 0,00  |
| Alto     | 32 | 1,13 | 0,41 | 0,58 | 0,47 | 1,42 | 1,04 | 5,69  | 10,32  | 13,88  | 22,76 |
| Alto     | 36 | 1,49 | 1,80 | 0,02 | 2,44 | 0,81 | 1,91 | 0,11  | 12,06  | 6,05   | 9,45  |
| Alto     | 46 | 1,21 | 1,13 | 0,49 | 2,08 | 2,77 | 2,37 | 4,48  | 16,33  | 25,51  | 18,58 |
| Alto     | 67 | 1,85 | 0,69 | 1,08 | 3,28 | 4,56 | 4,11 | 6,50  | 42,50  | 27,42  | 53,27 |
| Alto     | 69 | 0,96 | 0,00 | 0,00 | 1,46 | 3,32 | 2,87 | 0,00  | 0,00   | 38,63  | 0,00  |
| Alto     | 73 | 1,18 | 1,89 | 0,00 | 4,93 | 3,20 | 5,96 | 0,00  | 23,21  | 30,30  | 28,04 |
| Alto     | 74 | 2,42 | 1,49 | 0,04 | 3,16 | 3,97 | 4,25 | 0,18  | 18,83  | 18,17  | 25,30 |
| Alto     | 78 | 0,29 | 0,35 | 0,28 | 2,51 | 2,75 | 1,75 | 10,73 | 63,20  | 105,25 | 44,07 |
| Alto     | 80 | 1,77 | 0,96 | 0,64 | 7,31 | 3,06 | 4,42 | 4,01  | 67,97  | 19,16  | 41,13 |
| Alto     | 86 | 1,18 | 0,84 | 0,27 | 6,75 | 5,42 | 4,73 | 2,54  | 71,26  | 51,05  | 49,92 |
| Alto     | 88 | 1,47 | 1,58 | 0,57 | 5,91 | 4,00 | 3,78 | 4,32  | 33,23  | 30,32  | 21,25 |
| Alto     | 90 | 1,59 | 1,10 | 0,28 | 2,42 | 4,06 | 4,06 | 1,96  | 19,52  | 28,38  | 32,78 |

## Anexo N° 9. Tabla resumen de datos por grupo de severidad de caries

**Tabla N°9. Actividad específica (AE) para ureasa (U) y arginina deiminasa (SAD) en saliva y biofilm supragingival en pacientes de bajo, moderado bajo, moderado alto y severo ICDAS.**

|   |         |         | Bajo  | Moderad<br>o Bajo | Moderad<br>o Alto | Alto  | p    |
|---|---------|---------|-------|-------------------|-------------------|-------|------|
| <b>Ureálisis</b>                                  |         |         |       |                   |                   |       |      |
| mmol min <sup>-1</sup><br>1mg prot. <sup>-1</sup> | Saliva  | Media   | 12,00 | 7,86              | 4,40              | 5,82  | 0,28 |
|   |         | DE      | 21,26 | 12,46             | 2,44              | 13,91 |      |
|   |         | Mediana | 4,44  | 4,22              | 4,43              | 2,00  |      |
|   | Biofilm | Media   | 83,88 | 135,38            | 48,61             | 36,41 | 0,20 |
|   |         | DE      | 97,15 | 376,35            | 54,19             | 34,48 |      |
|   |         | Mediana | 52,46 | 34,99             | 31,49             | 24,40 |      |
| <b>SAD</b>  |         |         |       |                   |                   |       |      |
| mmol min <sup>-1</sup><br>1mg prot. <sup>-1</sup> | Saliva  | Media   | 45,43 | 25,08             | 28,98             | 28,58 | 0,21 |
|   |         | DE      | 23,24 | 15,63             | 14,48             | 30,29 |      |
|   |         | Mediana | 42,90 | 26,02             | 23,73             | 25,51 |      |
|   | Biofilm | Media   | 72,34 | 102,89            | 36,33             | 32,17 | 0,14 |
|   |         | DE      | 58,37 | 371,20            | 37,30             | 23,96 |      |
|   |         | Mediana | 59,33 | 28,13             | 29,32             | 29,37 |      |
| DE= Desviación estándar                           |         |         |       | p<0,05            |                   |       |      |

## Tabulación de datos por grupo de severidad de caries

### Datos tabulados según ICDAS

| Severidad Caries | Muestras | Proteínas Saliva mg/ml | Proteínas Biofilm mg/ml | Ureasa Saliva mM | Ureasa Biofilm mM | SAD Saliva mM | SAD Biofilm mM | AE USaliva mmolmi n <sup>-1</sup> mgprot <sup>-1</sup> | AE U Biofilm mmolmi n <sup>-1</sup> mgprot <sup>-1</sup> | SAD Saliva mmolmi n <sup>-1</sup> mgprot <sup>-1</sup> | SAD Biofilm mmolmi n <sup>-1</sup> mgprot <sup>-1</sup> |
|------------------|----------|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|---------------|----------------|--|--|--|---|
| Bajo             | 54       | 0,462                  | 1,17                    | 2,29             | 5,849             | 3,455         | 4,507          | 55,075   | 44,437   | 83,093   | 34,241  |
| Bajo             | 56       | 1,44                   | 0,223                   | 0,76             | 6,948             | 2,809         | 4,705          | 5,864  | 276,951  | 21,674   | 187,544   |
| Bajo             | 58       | 0,675                  | 1,081                   | 0,41             | 0,92              | 3,599         | 3,547          | 6,749  | 7,565  | 59,243   | 29,166  |
| Bajo             | 60       | 0,998                  | 0,582                   | 0,27             | 3,96              | 3,848         | 3,565          | 3,006  | 60,481   | 42,841   | 54,448  |
| Bajo             | 61       | 1,513                  | 0,472                   | 0,18             | 3,89              | 3,102         | 3,421          | 1,322  | 73,258   | 22,780   | 64,426  |
| Bajo             | 75       | 1,596                  | 0,863                   | 0                | 3,94              | 6,17          | 6,234          | 0,000  | 40,582   | 42,955   | 64,210  |
| Moderado bajo    | 26       | 0                      | 0,181                   | 0,13             | 8,943             | 2,258         | 0,963          | 0,000  | 548,987  | 0,000  | 59,116  |
| Moderado bajo    | 27       | 0,649                  | 1,253                   | 0,66             | 4,699             | 1,604         | 0,984          | 11,265   | 41,669   | 27,461   | 8,726   |
| Moderado bajo    | 29       | 0,436                  | 1,066                   | 0,55             | 3,21              | 0,658         | 2,219          | 13,965   | 33,458   | 16,769   | 23,129  |
| Moderado bajo    | 30       | 0,686                  | 0,602                   | 0,52             | 2,49              | 2,451         | 1,394          | 8,374  | 45,958   | 39,699   | 25,729  |
| Moderado bajo    | 39       | 1,575                  | 1,284                   | 0,23             | 2,73              | 1,458         | 2,269          | 1,637  | 23,624   | 10,286   | 19,635  |
| Moderado bajo    | 40       | 2,075                  | 1,149                   | 0,98             | 10,738            | 1,517         | 3,215          | 5,242  | 103,839  | 8,123  | 31,090  |
| Moderado bajo    | 41       | 1,133                  | 1,888                   | 1,82             | 2,016             | 2,027         | 1,641          | 17,799   | 11,864   | 19,878   | 9,657   |
| Moderado bajo    | 42       | 1,435                  | 0,597                   | 2,02             | 1,88              | 1,577         | 1,712          | 15,656   | 34,990   | 12,211   | 31,863  |
| Moderado bajo    | 43       | 0,889                  | 0,733                   | 1,23             | 7,502             | 1,389         | 2,153          | 15,348   | 113,718  | 17,360   | 32,636  |
| Moderado bajo    | 44       | 1,05                   | 0,857                   | 0,82             | 1,75              | 2,429         | 1,609          | 8,624  | 22,689   | 25,704   | 20,861  |
| Moderado bajo    | 47       | 0,675                  | 0,857                   | 0,00             | 2,413             | 2,088         | 2              | 0,000  | 31,285   | 34,370   | 25,930  |
| Moderado bajo    | 48       | 0,925                  | 0,748                   | 0,08             | 2,921             | 1,34          | 0,371          | 0,961  | 43,390   | 16,096   | 5,511   |
| Moderado bajo    | 49       | 0,358                  | 1,133                   | 0,00             | 2,352             | 1,064         | 1,426          | 0,000  | 23,066   | 33,023   | 13,985  |
| Moderado bajo    | 50       | 1,112                  | 1,029                   | 0,00             | 1,782             | 1,048         | 0,543          | 0,000  | 19,242   | 10,472   | 5,863   |
| Moderado         | 51       | 1,144                  | 2,012                   | 0,86             | 6,508             | 5,875         | 4,885          | 8,353  | 35,940   | 57,061   | 26,977  |

|               |    |       |       |      |       |       |       |        |         |        |          |
|---------------|----|-------|-------|------|-------|-------|-------|--------|---------|--------|----------|
| bajo          |    |       |       |      |       |       |       |        |         |        |          |
| Moderado bajo | 55 | 1,112 | 0,03  | 0,10 | 5,049 | 6,107 | 5,085 | 0,999  | 1870,00 | 61,021 | 1883,333 |
| Moderado bajo | 62 | 1,237 | 1,934 | 0,78 | 6,03  | 4,501 | 4,897 | 7,006  | 34,643  | 40,429 | 28,134   |
| Moderado bajo | 63 | 1,82  | 1,294 | 0,99 | 4,54  | 3,017 | 5,079 | 6,044  | 38,983  | 18,419 | 43,612   |
| Moderado bajo | 65 | 1,206 | 1,425 | 0,17 | 10,85 | 4,312 | 4,059 | 1,566  | 84,600  | 39,727 | 31,649   |
| Moderado bajo | 76 | 1,633 | 1,378 | 0,28 | 1,3   | 3,912 | 5,244 | 1,905  | 10,482  | 26,618 | 42,284   |
| Moderado bajo | 79 | 1,393 | 1,227 | 0,05 | 4,18  | 3,301 | 5,706 | 0,399  | 37,852  | 26,330 | 51,671   |
| Moderado bajo | 81 | 1,352 | 0,634 | 0,39 | 5,59  | 3,594 | 2,385 | 3,205  | 97,967  | 29,536 | 41,798   |
| Moderado bajo | 84 | 0,878 | 1,96  | 4,73 | 5,22  | 0     | 3,86  | 59,858 | 29,592  | 0,000  | 21,882   |
| Moderado bajo | 85 | 1,248 | 1,284 | 0,04 | 2,36  | 3,524 | 5,912 | 0,356  | 20,422  | 31,375 | 51,160   |
| Moderado bajo | 89 |       | 0,972 |      | 2,29  |       | 3,142 |        | 26,177  |        | 35,917   |
| Moderado alto | 21 | 0,727 | 0     | 0,32 | 2,882 | 0,585 | 1,016 | 4,891  | 0,000   | 8,941  | 0,000    |
| Moderado alto | 25 | 0,441 | 0     | 0,23 | 1,712 | 0,889 | 1,55  | 5,845  | 0,000   | 22,399 | 0,000    |
| Moderado alto | 28 | 0,597 | 0     | 0,43 | 0,496 | 2,96  | 1,902 | 8,077  | 0,000   | 55,090 | 0,000    |
| Moderado alto | 31 | 1,435 | 0,899 | 0,29 | 0,491 | 1,117 | 1,159 | 2,230  | 6,068   | 8,649  | 14,325   |
| Moderado alto | 33 | 0,842 | 1,414 | 0,72 | 2,402 | 1,712 | 1,464 | 9,514  | 18,875  | 22,592 | 11,504   |
| Moderado alto | 34 | 0,935 | 1,227 | 0,22 | 1,593 | 2,691 | 3,25  | 2,626  | 14,425  | 31,979 | 29,430   |
| Moderado alto | 35 | 2,002 | 1,95  | 0,62 | 3,204 | 3,301 | 2,109 | 3,447  | 18,256  | 18,321 | 12,017   |
| Moderado alto | 45 | 1,471 | 1,456 | 0,87 | 0,968 | 2,585 | 1,111 | 6,556  | 7,387   | 19,526 | 8,478    |
| Moderado alto | 52 | 1,3   | 0,431 | 0,78 | 0,517 | 6,335 | 5,483 | 6,667  | 13,328  | 54,145 | 141,351  |
| Moderado alto | 57 | 1,076 | 0     | 0,68 | 22,44 | 5,115 | 5,495 | 7,022  | 0,000   | 52,819 | 0,000    |
| Moderado alto | 59 | 1,508 | 0,353 | 0,08 | 4,2   | 3,267 | 3,238 | 0,589  | 132,200 | 24,072 | 101,920  |
| Moderado alto | 64 | 2,21  | 1,482 | 0,13 | 14,17 | 4,651 | 5,231 | 0,654  | 106,238 | 23,384 | 39,219   |
| Moderado alto | 66 | 1,872 | 0,8   | 0,94 | 14,2  | 4,994 | 4,46  | 5,579  | 197,222 | 29,642 | 61,944   |

|               |    |       |       |       |       |       |       |        |          |         |         |
|---------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|---------|---------|
| Moderado alto | 68 | 1,414 | 0,176 | 1,34  | 20,18 | 1,159 | 3,553 | 10,530 | 1019,192 | 9,107   | 179,444 |
| Moderado alto | 70 | 0,733 | 0,379 | 0,36  | 4,7   | 3,255 | 3     | 5,457  | 137,790  | 49,341  | 87,951  |
| Moderado alto | 71 | 1,992 | 0,774 | 0,13  | 4,79  | 1,858 | 3,295 | 0,725  | 68,763   | 10,364  | 47,301  |
| Moderado alto | 72 | 0     | 1,872 |       | 4,89  |       | 0,377 |        | 29,024   |         | 2,238   |
| Moderado alto | 77 | 1,617 | 0,446 | 0,80  | 1,41  | 4,135 | 1,831 | 5,497  | 35,127   | 28,413  | 45,615  |
| Moderado alto | 82 | 1,118 | 1,196 | 0,40  | 3,39  | 4,377 | 2,36  | 3,975  | 31,494   | 43,500  | 21,925  |
| Moderado alto | 83 | 1,242 | 1,034 | 0,40  | 7,05  | 4,088 | 5,305 | 3,578  | 75,758   | 36,572  | 57,006  |
| Moderado alto | 87 | 1,924 | 0,769 | 0,51  | 6,46  | 3,698 | 4,223 | 2,945  | 93,339   | 21,356  | 61,017  |
| Moderado alto | 91 | 1,784 | 1,716 | 0,61  | 7,33  | 3,988 | 4,111 | 3,799  | 47,462   | 24,838  | 26,619  |
| Moderado alto | 92 | 1,461 | 1,607 | 0,35  | 5,3   | 2,983 | 4,241 | 2,662  | 36,645   | 22,686  | 29,323  |
| Alto          | 19 | 0     | 0     | 0,278 | 1,319 | 1,566 | 2,724 | 0,000  | 0,000    | 0,000   | 0,000   |
| Alto          | 20 | 0     | 0,852 | 0,595 | 2,529 | 3,831 | 2,252 | 0,000  | 32,981   | 0,000   | 29,369  |
| Alto          | 22 | 0,15  | 0     | 0,789 | 3,164 | 1,239 | 1,967 | 58,444 | 0,000    | 91,778  | 0,000   |
| Alto          | 23 | 0     | 1,659 | 0,314 | 0,716 | 1,042 | 1,292 | 0,000  | 4,795    | 0,000   | 8,653   |
| Alto          | 24 | 0     | 0,332 | 0,742 | 3,233 | 1,744 | 2,263 | 0,000  | 108,199  | 0,000   | 75,736  |
| Alto          | 32 | 1,133 | 0,405 | 0,58  | 0,47  | 1,415 | 1,037 | 5,688  | 12,894   | 13,877  | 28,450  |
| Alto          | 36 | 1,487 | 1,799 | 0,015 | 2,44  | 0,81  | 1,913 | 0,112  | 15,070   | 6,052   | 11,815  |
| Alto          | 46 | 1,206 | 1,133 | 0,486 | 2,082 | 2,769 | 2,368 | 4,478  | 20,418   | 25,511  | 23,223  |
| Alto          | 67 | 1,846 | 0,686 | 1,08  | 3,28  | 4,555 | 4,111 | 6,501  | 53,126   | 27,417  | 66,586  |
| Alto          | 69 | 0,956 | 0     | 0     | 1,46  | 3,324 | 2,865 | 0,000  | 0,000    | 38,633  | 0,000   |
| Alto          | 73 | 1,175 | 1,888 | 0     | 4,93  | 3,204 | 5,956 | 0,000  | 29,014   | 30,298  | 35,052  |
| Alto          | 74 | 2,424 | 1,492 | 0,04  | 3,16  | 3,965 | 4,247 | 0,183  | 23,533   | 18,175  | 31,628  |
| Alto          | 78 | 0,29  | 0,353 | 0,28  | 2,51  | 2,747 | 1,75  | 10,728 | 79,005   | 105,249 | 55,083  |
| Alto          | 80 | 1,773 | 0,956 | 0,64  | 7,31  | 3,057 | 4,424 | 4,011  | 84,960   | 19,158  | 51,418  |
| Alto          | 86 | 1,18  | 0,842 | 0,27  | 6,75  | 5,421 | 4,729 | 2,542  | 89,074   | 51,045  | 62,404  |
| Alto          | 88 | 1,466 | 1,581 | 0,57  | 5,91  | 4     | 3,779 | 4,320  | 41,535   | 30,317  | 26,558  |
| Alto          | 90 | 1,591 | 1,102 | 0,28  | 2,42  | 4,064 | 4,064 | 1,955  | 24,400   | 28,382  | 40,976  |