



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PRODUCCIÓN DE AMONIACO POR ACTIVIDAD DE UREASA Y ARGININA
DEIMINASA EN BIOFILM DENTAL ASOCIADO AL RIESGO DE CARIES EN
NIÑOS.**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO
MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN PEDIATRÍA**

PRESENTA

L.E. Stephanie Díaz Contreras

Matricula: 216450019

DIRECTOR DISCIPLINARIO

Dra. G. Nataly Rubin de Celis Quintana

ID. 100226199

DIRECTOR METODOLÓGICO 1

Dr. Cristian Dionisio Román Mendez

ID. 100392244

DIRECTOR METODOLÓGICO 2

Nila Claudia Gil Orduña

ID. 100202788

Heroica Puebla de Zaragoza, Junio 2018



BUAP

L.E. STEPHANIE DIAZ CONTRERAS, MAT. 216450019
ALUMNA DE LA MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA
CON OPCIÓN TERMINAL EN PEDIATRÍA
DE LA FE-B.U.A.P.
PRESENTE.

El que suscribe, M.C. Gabriel Muñoz Quintana, Secretario de Investigación y Estudios Posgrado de la F.E.B.U.A.P., por este medio me permito informar que esta Secretaría aprueba la impresión de la Tesis titulada **"PRODUCCIÓN DE AMONIACO POR ACTIVIDAD DE UREASA Y ARGININA DEIMINASA EN BIOFILM DENTAL ASOCIADO AL RIESGO DE CARIES EN NIÑOS"** misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener de grado de Maestra en Estomatología con Opción Terminal en Pediatría.

Sin más por el momento, deseándole lo mejor, le reitero mi distinguida consideración.

ATENTAMENTE.
"PENSAR BIEN PARA VIVIR MEJOR"
H. PUEBLA DE Z., A 30 DE MAYO DE 2018.

M.C. GABRIEL MUÑOZ QUINTANA
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO



Nota: Este documento tiene validez de 90 días posteriores a la fecha 7 8

C.c.p. Minutario
MC*GMQ*rqa



BUAP

Oficio FESIEP No.359/2018

MTRA. MARÍA ELENA RUIZ VELASCO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA B.U.A.P.
PRESENTE

AT'N. ARQ. MARÍA DEL ROCIO FRAGA RAMÍREZ
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

Por medio del presente reciban un cordial saludo, al mismo tiempo les comunico que la L.E. **STEPHANIE DIAZ CONTRERAS, MAT. 216450019**, ha sido autorizada para presentar el **Examen Profesional** y obtener el grado de Maestra en Estomatología con opción terminal en Pediatría con la tesis titulada: **"PRODUCCION DE AMONIACO POR ACTIVIDAD DE UREASA Y ARGININA DEIMINASA EN BIOFILM DENTAL ASOCIADO AL RIESGO DE CARIES EN NIÑOS"** el día 20 de junio del presente año a las 10:00 hrs. en el Auditorio de Posgrado de esta Unidad Académica, contando con el siguiente jurado:

PRESIDENTE:	MEP. ALEJANDRA PERAL GARCIA	ID 100043911
SECRETARIO:	MSP. ROSENDO CARRASCO GUTIÉRREZ	ID 100008655
VOCAL:	EP. MÓNICA SÁNCHEZ ORTIZ	ID 100526002
VOCAL:	MO. ESTER LUMINOSA SOBERANES DE LA FUENTE	ID 100071055

Sin otro particular, le reitero la seguridad de mi atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 30 de mayo del 2018.

M. en C. Gabriel Muñoz Quintana
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado



c.c.p. minutarío
*MCGMQ/rqa



BUAP

OFICIO NÚM.FE/CIFE/089/2017

**ASUNTO: Constancia de Registro
A QUIEN CORRESPONDA.
P R E S E N T E**

La Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado con base a lo estipulado por el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por este medio hace **CONSTAR** que:

El Proyecto de Investigación (colectivo) presentado por la Alumna de la Maestría en Estomatología con opción terminal en Pediatría **Stephanie Díaz Contreras con número de matrícula 216450019** titulado **"Producción de amoniaco por actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva, en niños de acuerdo al riesgo de caries"** siendo Responsable del Proyecto la **M.E.P. Gisela Nataly Rubín de Celis Quintana con ID. 100226199**, ha sido aceptado y queda registrado en esta secretaría en el libro de registros 02 en la hoja 04 con No. de registro **2017045** de fecha 13-10-2017 mismo en el cual participan como: Director Metodológico D.C. Cristian Dionisio Román Méndez ID 100392244 y Directora Disciplinaria: M.E.P. Nila Claudia Gil Orduña ID 100202788

Se extiende la presente constancia, en la Heroica Puebla de Zaragoza a los trece días del mes de octubre del año dos mil diecisiete.

**ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"**

M.C. ALEJANDRO DIB KANAN
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado



c.c.p. archivo
c.c.p. minutarario

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN: PEDIATRÍA
Registro 2017045 Fecha: 13-OCTUBRE-2017

Título de la Tesis (anexarlo impreso y CD) PRODUCCIÓN DE AMONIACO POR ACTIVIDAD DE UREASA Y ARGININA DEIMINASA EN BIOFILM DENTAL ASOCIADA AL RIESGO DE CARIES EN NIÑOS

Nombre del alumno: STEPHANIE DÍAZ CONTRERAS Matrícula 216450019

Domicilio: PRIVADA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN 1438 COLONIA UNIVERSIDADES

Tel: 22-27-34-90-12

Fecha de ingreso a la Facultad: Enero 2016

Firma:



Director disciplinario: Mtra. Gisela Nataly Rubín de Celis Quintana

Grado académico: Maestría Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100226199

Tel: 2222388423

Firma:



Director Metodológico: Dr. Cristian Dionisio Román Méndez

Grado académico: Doctorado Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100392244

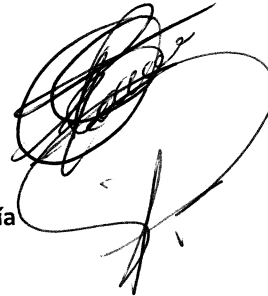
Tel: 2221838336

Director Metodológico2: Nila Claudia Gil Orduña

Grado académico: Especialidad Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100202788

Tel: 2222126711



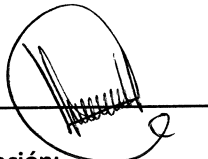
Lector: Esther Luminosa Soberanes de la Fuente

Grado académico: Maestría en Odontología Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100071055

Tel: 2222177314

Firma:



Fecha de Aceptación:

Firma:

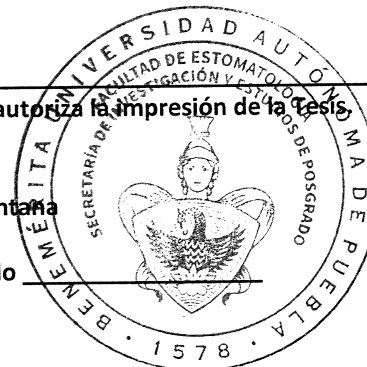
Nombre y firma de aprobación del presidente de la academia/Coordinador de la Maestría en Estomatología Opción:

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado, autoriza la impresión de la Tesis.

M. en C. Gabriel Muñoz Quintana

Fecha: 30 Mayo 2018

Sello



AGRADECIMIENTOS

La culminación de un proyecto como éste nunca es sencillo viene acompañado de compromiso, dedicación, empeño y paciencia, sin embargo existen personas que hacen el sendero mas ameno y siempre te ayudaran a continuar.

Primeramente debo agradecer a dios por permanecer a mi lado a cada paso y brindarme la sabiduria y la fuerza para la culminacion de este proyecto.

A mi familia por ser el pilar de lo que soy, por guiar cada uno de mis pasos, por apoyarme en cada decisión y proyecto, por su amor infinito y enseñarme que ningún sueño es inalcanzable.

A mis asesores por haber aceptado guiarme en la elaboracion de esta tesis. Gracias por su conocimiento, dedicación, paciencia y todos sus consejos. Tambien de manera especial agradezco la ayuda y confianza de aquellos que desinteresadamente tuvieron un aporte en la culminación de este proyecto.

Por ultimo pero no menos importante, Gracias a aquellas personas que comenzaron siendo desconocidos y hoy tengo el privilegio de llamar: amigos.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEORICO	
ANTECEDENTES GENERALES	
1. Caries	2
1.1 Naturaleza multifactorial de la caries	2
2. El proceso de Desmineralización-Remineralizacion	4
3. Saliva	4
4. Biopelicula dental	5
4.1 Desarrollo del biofilm: Etapas	6
4.2 Teorías del biofilm dental y su relación con el desarrollo de caries	8
5. Riesgo de caries	8
5.1 Sistema de Valoración de Riesgo: CAMBRA	9
6 Arginina	10
6.1 Arginina Sistémica	10
6.2. Arginina en cavidad bucal	11
6.3. Arginina: fuente externa en la prevención de la caries	12
7 Sistema Arginina Deiminasa (ADS)	12
8. Hidrólisis de urea por la enzima ureasa	13
ANTECEDENTES ESPECIFICOS	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
JUSTIFICACIÓN	20
HIPOTESIS	21
Hipotesis de investigación	21
Hipotesis nula	21
OBJETIVOS	22
General	22
Especificos	22
METODOLOGÍA	23
Diseño del estudio	23
Universo de estudio	23
Unidades de estudio	23
Muestra	23
Criterios de selección	23
Criterios de inclusión	23
Criterios de exclusión	24
Criterios de eliminación	24
Variables	25
Recursos	26
Bioética	27
Procedimiento	28
ANALISIS ESTADISTICO	33

RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	
Anexo 1	50
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	51

INTRODUCCION

La caries es una enfermedad que se caracteriza por cambios metabólicos y en la composición de la biopelícula, estos cambios, generan una acidificación que favorece la proliferación de una microbiota acidogénica y acidúrica, con un pH bajo, a un punto crítico, que produce la desmineralización en el órgano dentario; si este pH no regresa a un estado más alcalino.

La saliva, es uno de los mecanismos de defensa de la cavidad oral, a través de ella, se producen diversos sistemas que ayudan a mantener el pH de la biopelícula dental cuando este se ve afectado. La generación de álcali en saliva y biofilm dental, es producto de la actividad de dos vías enzimáticas productoras de amonio, mediadas por la urea y la arginina presentes en la cavidad oral.

La urea y la arginina, son compuestos químicos derivados de la descomposición de péptidos y proteínas por enzimas salivales presentes a través de la secreción salival y el líquido crevicular. Los dos principales sistemas amortiguadores productores de amonio son la hidrólisis de urea por la enzima ureasa y la hidrólisis de arginina a través de enzimas del sistema arginina deiminasa.

Evidencias de estudios realizados *in vitro*, sugieren que el amonio producido desde la urea y la arginina, por medio de ambos mecanismos enzimáticos, puede ser un importante factor en la neutralización de ácidos, la estabilización de la microbiota oral y generar un efecto directo en la disminución de la aparición de la microbiota cariogénica y así resultar beneficiosa, evitando, el desarrollo de caries dental. Por lo que el propósito de esta investigación, será cuantificar la producción de amoniaco por actividad de ureasa y arginina deiminasa en biofilm dental.

ANTECEDENTES GENERALES

1. Caries.

La caries es una enfermedad de etiología multifactorial, en la que interactúan la placa dental, los constituyentes de la dieta, el tejido del huésped, así como factores genéticos, factores de comportamiento, factores ambientales externos, estado socioeconómico, y algunos autores evidencian como factor crítico el tiempo, que puede establecer la gravedad de la enfermedad¹. Esta condición se encuentra estrechamente relacionada con la disbiosis microbiana entre patógenos acidogénicos / acidúricos y aquellas bacterias comensales generadoras de álcali que colonizan la cavidad oral³⁷. En esta los tejidos mineralizados del órgano dentario experimentan un desequilibrio ecológico en el equilibrio fisiológico, a través de un mecanismo dinámico de desmineralización y remineralización como resultado del metabolismo microbiano, generando una destrucción progresiva que constituye un factor determinante en su progresión^{2,3}.

En la patogénesis de la caries es importante destacar algunos conceptos importantes para su comprensión:

- 1) El biofilm dental, es un complejo que muestra un comportamiento único; su comportamiento tan peculiar es dado por las especies microbianas que en ella habitan.
- 2) La presencia de bacterias es fundamental para el inicio y progresión de las lesiones de caries, cada especie bacteriana puede contribuir colectivamente a la cariogenicidad de la placa dental.
- 3) Es el resultado de un cambio ecológico en el biofilm dental sano a una flora patógena.
- 4) Es un proceso, que puede detenerse o ser reversible antes de que se presente una cavitación.
- 5) Es un proceso dinámico de factores patológicos y protectivos que pueden conferirle estas dos propiedades^{1,4}.

1.1. Naturaleza multifactorial de la caries

Keyes en 1960, afirmó que la caries es inducida por la interacción entre tres factores importantes: la placa dental, la superficie de los órganos dentarios y la dieta con especial atención a los azúcares presentes⁵.

Algunos autores adicionaron el factor tiempo como un factor crítico en el progreso y avance de las lesiones cariosas.

Fejerskov en 2004, incluyó factores adicionales como la función salival, nivel de educación y nivel socioeconómico⁶.

El desarrollo de caries está fuertemente relacionado con la presencia del biofilm dental, que es una entidad bacteriana compleja y muy diversa, que se adhiere firmemente a las superficies dentarias y por su actividad bioquímica y metabólica es propuesta como uno de los agentes etiológicos principales de la caries dental⁶. Se encuentra altamente estructurada, organizada en un espacio específico y metabólicamente constituida por una comunidad de bacterias co-dependientes que interactúan y se comunican mediante transferencia de genes y por secreción de moléculas de señalización (*Quorum sensing*) que le confiere una mayor eficiencia metabólica, una mayor resistencia al estrés y una mayor virulencia en su conjunto⁹. Se calcula que puede contener hasta 1000 especies bacterianas diferentes de acuerdo al grado de madurez en el que se encuentre⁷.

La identificación de bacterias específicas asociadas con la caries es un área de investigación extensa. Se cree que un número limitado de bacterias orales productoras de ácido están altamente asociadas con el desarrollo y el progreso de la caries, en especial los *Streptococcus mutans*⁸.

La composición microbiana de esta comunidad puede permanecer relativamente estable en un tiempo determinado, sin embargo, esta estabilidad puede ser perturbada por cambios significativos en el ambiente, lo que puede conducir al crecimiento excesivo de algunas especies microbianas y provocar la transición de una placa "sana" a una placa "patógena" y predisponer el sitio al desarrollo de la enfermedad¹.

Las bacterias del biofilm dental crean su propio "pegamento" que es un exopolisacárido, compuesto en gran parte por la unión de varias moléculas de glucosa formando los glucanos, que proporciona un mecanismo de adhesión a los dientes y a otras bacterias, lo que favorece la formación de placa y enriquecimiento bacteriano de la misma¹.

Las glucosiltransferasas, son un grupo de enzimas, producidas por especies de bacterias orales y sintetizan glucanos (solubles e insolubles) a partir de los azúcares presentes en la dieta. Estas le confieren la capacidad de acumularse y formar una masa que desencadena el proceso de caries¹⁰. Las bacterias productoras de ácido metabolizan el azúcar, como resultado de este metabolismo se generan ácidos: acético, láctico, fórmico que tienen un efecto directo sobre el pH de la placa, un pH por debajo de 4.0 crea condiciones desfavorables, mientras los ácidos estén presentes en la cantidad y tiempo suficiente favorecerán la disolución de calcio y fosfato del esmalte dental, dando como resultado final la pérdida de mineral del órgano dentario^{1, 11}.

La saliva juega un papel importante en la modulación del pH de la placa dental. El flujo de saliva ayuda a dispersar y diluir los ácidos de la placa, posee una serie de sustancias (bicarbonatos y fosfatos) que le proporcionan efectos reguladores de pH que ayudan a neutralizar los ácidos de la placa^{11, 12}.

2. El proceso de Desmineralización-Remineralización

Los cristales de hidroxiapatita del esmalte se componen de iones de calcio (Ca^{+2}), iones fosfato (PO_4^{-3}) iones hidroxilo (OH^-). Estos permanecen unidos dentro del cristal por medio de enlaces iónicos, debido a sus fuertes cargas eléctricas opuestas, se equilibran entre ellos para cumplir estrictamente con la relación y reproducir un patrón de alta organización^{40,41}.

En el esmalte dental, en condiciones naturales de presencia de saliva y biopelícula, los procesos químicos de movilización de iones son permanentes. Por ejemplo, debido al intenso metabolismo de las bacterias del biofilm dental, se producen diversos ácidos orgánicos, capaces de liberar hidrogeniones (H^+) al medio, lo cual disminuye el valor de pH al aumentar la concentración de H^+ . Este exceso de H^+ se une a los iones PO_4^{-3} para formar fosfatos primarios y secundarios hasta ácido fosfórico. Por su parte, los OH^- también capturan H^+ para formar agua. En ambos casos, las concentraciones de los iones fosfato e hidroxilo libres disminuyen abruptamente y generan condiciones de subsaturación que favorecen una mayor salida de los otros iones que están aún en el complejo cristalino de la hidroxiapatita, esto produce pérdida de minerales y genera un proceso de desmineralización, que si continúa durante varios días, concluye en una lesión de caries visible. El Ca^{+2} liberado del esmalte por la pérdida de PO_4^{-3} y OH^- es capturado por proteínas de la placa y de la saliva, lo que contribuye a la disminución total de todos los iones que forman parte de la hidroxiapatita y mantiene las condiciones de subsaturación y desmineralización^{40,41}.

La saliva aporta iones de bicarbonato (HCO_3^-) y PO_4^{-3} que, al capturar el exceso de H^+ , evitan la caída en el pH en el medio bucal. La disminución de la concentración de H^+ (un aumento en el valor del pH) favorece que los iones PO_4^{-3} y OH^- , en su forma adecuada para formar cristales, estén en mayor disponibilidad para depositarse en el esmalte y generar la remineralización^{40,41}.

3. Saliva.

La saliva es un fluido complejo producido y vertido hacia la cavidad bucal por las glándulas salivales. El 99% de la composición salival es agua, el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas¹⁵. Aproximadamente entre 500-700 ml de saliva son secretados diariamente, lo que constituye una de las secreciones más abundantes del cuerpo humano¹⁶. Desempeña funciones importantes en el mantenimiento de la salud oral, entre las que destacan:

1. Lubricación de la cavidad oral.
2. Capacidad amortiguadora del pH de la cavidad bucal y la placa dental.
3. Acción antimicrobiana.

4. Protección contra la desmineralización.
5. Favorece la capacidad remineralizante del esmalte, gracias a su contenido de calcio y fosfato.
6. Funciones digestivas como la masticación, formación del bolo alimenticio, deglución, digestión¹⁶.

En la saliva, se encuentran diferentes moléculas, las de mayor importancia para el mantenimiento de la salud oral son las proteínas¹⁷. Estas proteínas están clasificadas como familias; cada una de ellas compuestas por moléculas relacionadas debido a su polimorfismo genético:

1. Proteínas ricas en prolina (PRP), estas se dividen en: ácidas, básicas y glicosiladas, que desempeñan diferentes funciones. Las PRP ácidas unen calcio e inhiben la formación de hidroxiapatita, además, se adhieren fuertemente y forman parte de la película adquirida. Una vez adsorbida, media la adherencia de microorganismos, desempeña un papel en la formación de la placa dental. Las PRP básicas y glicosiladas tienen propiedades lubricantes, adsorben algunos microorganismos y tienen una acción moduladora en la flora oral¹⁷.

2. Proteínas ricas en histidina, se adhieren fuertemente a la hidroxiapatita, además poseen actividad antibacterial y antimicótica¹⁷.

Los péptidos y proteínas salivales contienen arginina. Esta, es un componente natural de la saliva humana, se secreta en forma libre en una concentración media de 50 mM. Se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo bacteriano en el cual se produce amoníaco. Existe una gran variedad de bacterias como estreptococos orales, lactobacilos, neiserias y espiroquetas, que catabolizan amoníaco y CO₂. La producción de amoníaco de estas bacterias junto con la adición de la arginina en su metabolismo puede alcalinizar el microambiente oral y mantener el equilibrio de la ecología microbiana¹⁸.

4. Biopelícula dental.

El biofilm o biopelícula, es una formación de agregados bacterianos, existentes como comunidades asociadas, que se adhieren a superficies naturales o artificiales, en un medio acuoso que contiene una concentración suficiente de nutrientes para sostener las necesidades metabólicas de la microbiota¹⁹.

La formación de biopelícula es un proceso complejo que conlleva distintas fases. En un órgano dentario el biofilm se comienza a formar inmediatamente después de realizar la limpieza, este, entra en contacto con saliva, fluido crevicular gingival y los productos bacterianos²⁰. Estos productos se adsorben en la superficie del

diente que posee carga negativa, formando una fina capa llamada: película adquirida. Esta película es receptiva a la colonización por bacterias específicas y comienza la etapa de crecimiento bacteriano rápido, en el cual, las bacterias secretan grandes cantidades de polisacáridos extracelulares, para formar la matriz del biofilm²¹. Durante el proceso de coagregación bacteriana, estas se adhieren a los primeros pobladores específicos, aumentando la complejidad de la biopelícula, posteriormente comienza la división celular; formando un biofilm complejo que entra en un estado estacionario en el cual las bacterias ralentizan su crecimiento, dando como resultado una comunidad microbiana compleja que interactúa para mantener su coexistencia^{20, 21}.

4.1. Desarrollo del biofilm: Etapas.

En la literatura, se describe la formación de biofilms sobre superficies a través de una serie de etapas.

Etapa 1: Se crea una fina película orgánica sobre el sustrato adherido a la superficie dental, esta película puede cambiar drásticamente las características fisicoquímicas del sustrato dependiendo del tipo de moléculas adsorbidas sobre la superficie (Figura1). La materia orgánica presente se adsorbe sobre las superficies y forma lo que se conoce como “película adquirida”, cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido y tornándola más amigable para la adhesión bacteriana.

Etapa 2: La adhesión primaria (reversible) de bacterias a una superficie o a un sustrato puede darse de dos formas (Figura 1). Activa en la cual la motilidad bacteriana, otorgada por flagelos, fimbrias y pilis ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función vencer las fuerzas de repulsión. Pasiva, es dada por factores externos tales como la difusión o precipitación de partículas influenciada por la dinámica de fluidos, sin embargo, el factor externo más importante está dado por las propiedades fisicoquímicas de la superficie que pueden favorecer la adhesión de los microorganismos a cualquier superficie.

Etapa 3: La adhesión irreversible se produce por la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares (Figura 1). En esta segunda fase de adhesión, predominan las reacciones moleculares entre las estructuras superficiales bacterianas y la superficie del sustrato. Estas reacciones implican una adhesión firme entre la bacteria y la

superficie, mediada por estructuras poliméricas superficiales como fibrilas, fimbrias, pilis y EPS (exopolisacaridos).

Etapa 4: La maduración del biofilm, es resultado de una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato. La densidad global y la complejidad del biofilm aumenta a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio (Figura 1). El potencial crecimiento de cualquier biofilm está limitado por la disponibilidad de nutrientes en el ambiente, la penetración de estos nutrientes y la eliminación de residuos. Otros factores que pueden controlar la maduración del biofilm son el pH interno, la penetración de oxígeno, fuentes de carbono y la osmolaridad.

Etapa 5. En esta etapa se desarrolla un evento en el cual se lleva a cabo una liberación de células (ya sea individualmente o en grupos) de un biofilm o sustrato. Las colonias en división continua liberan residuos y nutrientes que podrán utilizarse para acondicionar las superficies desnudas y para alimentar a otras células, por lo que, el desarrollo de vida del biofilm se transforma en un ciclo completo^{38, 39}. (Figura 1).

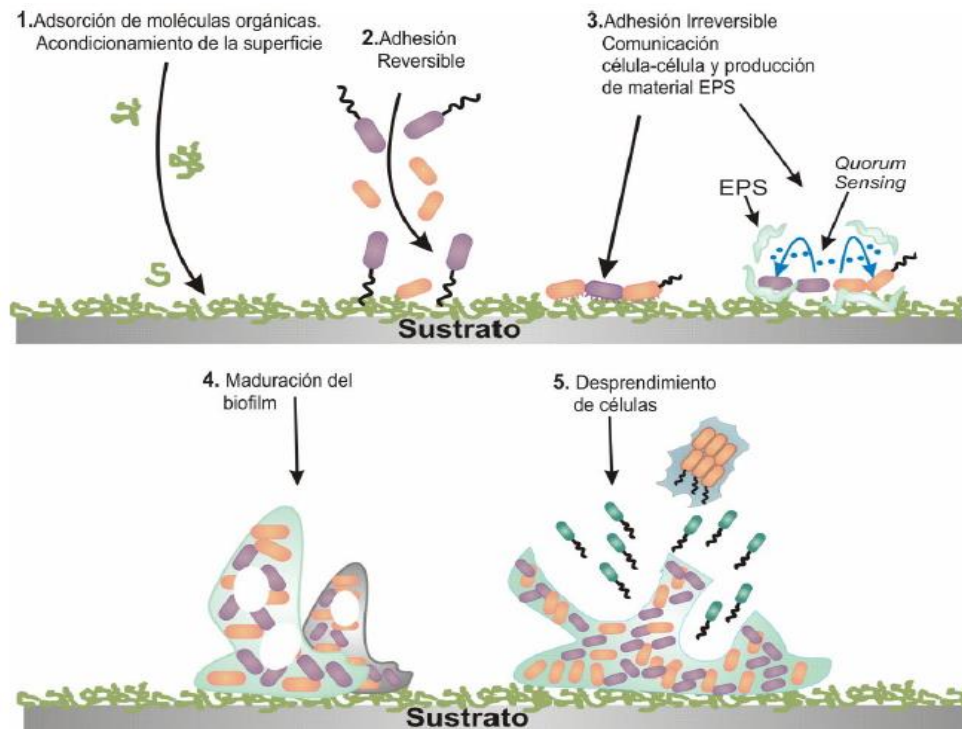


Figura 1. Etapas del desarrollo del biofilm

Tomado de: Lamont Richard. Microbiología e inmunología oral. 1ª. edición. México DF: Manual moderno; 2012.⁴⁸

4.2 Teorías del biofilm dental y su relación con el desarrollo de caries

Existen diversas teorías que podrían explicar la complejidad del desarrollo de la caries, entre ellas, se encuentran:

Teoría Acidógena

Propuesta por Willoughby Miller en 1890, afirma que la caries es el resultado de un proceso químico y microbiano que conduce a la disolución del esmalte. Es decir: los gérmenes provocan la degradación del azúcar, aumentando el ácido láctico y estos fermentos provocan la descalcificación de la hidroxiapatita del esmalte³⁷.

Teoría Proteolítica

La teoría fue propuesta por Gottlieb en 1944 propone que las enzimas proteolíticas liberadas por las bacterias de la cavidad oral podrían destruir la matriz orgánica del esmalte. Considera dos fases: en la primera hay una destrucción de la matriz orgánica por las enzimas proteolíticas bacterianas, en la segunda fase hay una disolución de los cristales de hidroxiapatita por la acción de los ácidos orgánicos procedentes de la degradación proteolítica³⁷.

Teoría de la Proteólisis – Quelación

Propuesta por Schatz y Martinen en 1955 sugiere que existe la posibilidad de que la desmineralización pueda producirse sin formación de ácidos, ya que la quelación ocurre con valores de pH neutros o alcalinos que destruyen la hidroxiapatita³⁷.

Teoría Ecológica

Propuesta por Marsh, sostiene que los microorganismos asociados con la enfermedad pueden estar presentes también en los sitios sanos, pero en niveles tan bajos, que no son clínicamente relevantes. La enfermedad vendría a ser el resultado de los cambios ocurridos en el balance de la microflora que reside en la placa, como consecuencia de la modificación de las condiciones medioambientales locales. Por ejemplo, las condiciones repetidas de un pH bajo en la placa dental^{19,37}.

5. Riesgo de caries.

El término riesgo se utiliza para indicar la probabilidad de que las personas expuestas a ciertos factores presenten, con el tiempo, una enfermedad concreta de forma más frecuente que otras con características similares que están sometidas a la exposición¹³.

Las características asociadas a un mayor riesgo de presentar la enfermedad, se denominan factores de riesgo y pueden ser: hereditarios, conductuales, ambientales e incluso sociales¹³.

La información sobre los factores de riesgo puede utilizarse de formas diferentes, con ellos es posible predecir la aparición de enfermedades; con este fin se emplean los estudios de valoración de riesgo.

Algunos factores de riesgo para el desarrollo de la caries, ya fueron identificados en diversos estudios previos, así como, el proceso de transición de un individuo libre de caries a un estado de actividad cariogénica, éste puede relacionarse con el reducido potencial de generar álcali en la placa, y así favorecer el incremento de un medio acidogénico, generando un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad¹³.

Gordan en el 2010 afirmó que los sujetos libres de caries presentan mayores niveles de actividad del sistema Arginina deiminasa, que los sujetos con caries activa, tanto en saliva como en muestras de placa. De igual forma demostró que los sujetos libres de caries tenían niveles tres veces más altos de amoníaco en la placa dental que los sujetos que presentaban actividad de caries¹⁴.

5.1 Sistema de Valoración de Riesgo: CAMBRA

Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA), es un sistema con enfoque basado en la evidencia para prevenir, revertir y tratar la caries dental, parte del entendimiento de esta condición. La caries es una enfermedad iniciada por una biopelícula compleja (en lugar de un patógeno), que cambia dinámicamente con su entorno (diente, saliva y biopelícula), así, en lugar de centrarse en la eliminación de un patógeno, CAMBRA busca determinar cuál de los muchos factores está causando la expresión de la enfermedad e indica medidas correctivas^{42,43}.

El protocolo CAMBRA, surge en febrero y marzo de 2003, donde dos números de la Revista de la Asociación Dental de California (CDA) publican una declaración consensuada de expertos en el campo de la cariología, la práctica dental y la investigación académica teniendo como resultado la producción de formularios de evaluación de riesgo para usar en la práctica. La Asociación Dental de California, a través de la Fundación CDA revisan la base científica para un enfoque más actual del manejo de caries utilizando la evaluación de protocolos de riesgo, diagnóstico, tratamiento y prevención, incluyendo medios no quirúrgicos para reparar o remineralizar la estructura del órgano dentario.

El formato CAMBRA está dividido en tres sectores:

1. Indicadores de enfermedad: toma en cuenta lesiones de caries dental detectables visual y radiográficamente, que involucran desde lesiones incipientes en esmalte (manchas blancas), lesiones en dentina y restauraciones en los últimos tres años ocasionadas por caries^{42,43}.

2. Factores de riesgo: evalúa factores biológicos predisponentes: ^{42,43}

- 1) Placa visible sobre los dientes
- 2) Frecuencia de comidas por día (> 3 veces por día)
- 3) Anatomía dental
- 4) Uso de medicamentos
- 5) Flujo salival insuficiente (por observación o medición)
- 6) Exposición radicular
- 7) Uso de aparatos de ortodoncia

3. Factores protectores: se refiere a factores biológicos o terapéuticos que incluyen: ^{42,43}

- 1) Localización de vivienda/trabajo/colegio en una zona de comunidad fluorizada
- 2) Uso de pasta dental fluorada por lo menos dos veces al día
- 3) Uso diario de enjuague bucal fluorado
- 4) Aplicación profesional de flúor tópico en los últimos seis meses
- 5) Prescripción de clorhexidina en los últimos 6 meses
- 6) Pasta de suplemento de calcio y fosfato en los últimos seis meses
- 7) Adecuado flujo salival

6 Arginina.

La arginina es un aminoácido semiesencial o condicionalmente esencial, constituyente de las proteínas del cuerpo humano, posee una carga positiva y un pH fisiológico de 6.5 - 7.5. Es posible encontrarlo de manera natural en las proteínas de alimentos como: huevo, carne, productos lácteos, verduras, legumbres, cereales y frutos secos²².

6.1 Arginina Sistémica

Este aminoácido, desempeña funciones propias de su metabolismo como: formación de péptidos y proteínas, funcionamiento del ciclo de la urea, síntesis de creatina, síntesis de prolina y la síntesis de la poliaminasa¹⁵.

Además de estas funciones, la arginina parece desempeñar funciones fisiológicas importantes, es capaz de estimular la secreción de hormonas diversas como insulina, glucagón, catecolaminas, prolactina, hormona de crecimiento y desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la respuesta inmune²²,²³.

6.2. Arginina en cavidad bucal.

La saliva es un sistema de defensa natural en la cavidad oral, además de su capacidad para aclarar y diluir los ácidos, contiene sustancias químicas y biológicas que ayudan a modular el potencial cariogénico de la placa dental. Es una fuente de metabolitos basados en nitrógeno, como arginina y urea, derivados de la descomposición de péptidos y proteínas por enzimas salivales²⁴. La arginina es un componente natural de la saliva humana y se secreta en forma libre a una concentración media de 50 nM¹⁸. Es metabolizada por bacterias arginolíticas que utilizan el sistema de arginina deiminasa (ADS) para producir energía en forma de trifosfato de adenosina, amoníaco y carbono. La importancia de este sistema es la producción de amoníaco que neutraliza los ácidos de la placa y promueve un pH más alcalino²⁴. Las bacterias arginolíticas en la cavidad oral pueden expresar ADS, como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus australis*, ciertas especies de *Lactobacillus sp* y algunas espiroquetas, pueden ayudar a estabilizar el biofilm de la placa residual en las superficies susceptibles del órgano dentario, al hacerlo la arginina puede ayudar a prevenir cambios en la flora del biofilm lo que crea un ambiente desfavorable para que bacterias como el *S. mutans* se instauren afectando su capacidad para colonizar la placa dental^{24, 25}. Sharma *et al* realizaron un estudio en el cual observaron que las biopelículas de *S. mutans* cultivadas en presencia de arginina podrían influir en la producción y/o composición de glucanos de membrana extracelular y afectar así sus propiedades de adhesión, en las biopelículas sin contenido de arginina se observó una matriz extracelular densa en comparación con las cultivadas en presencia del mismo aminoácido. Los resultados sugieren que la presencia de arginina en la cavidad oral podría influir en las propiedades de adhesión de *S. mutans* a la superficie del diente y así modificar su potencial cariogénico⁴⁵.

Huang *et al* demostraron que la Arginina podría reducir la biomasa de biofilms dentales polimicrobianos. La arginina al 0.2% tuvo poco efecto sobre el crecimiento planctónico de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis* y *S. gordonii*, sin embargo redujo significativamente la biomasa de biopelículas de *S. mutans*; también demostró que cuando se cultivan biopelículas adicionadas con arginina al 0.2% se encuentran menor número de células de *S. mutans* adheridas a las

superficies a las 2 h y 8 h del cultivo. Ellos concluyen que la arginina no mato las células en la biopelícula de *S. mutans*, sin embargo, reduce la relación EPS (exopolisacarido)/bacterias y el espesor del biofilm⁴⁶.

6.3. Arginina: fuente externa en la prevención de la caries.

Actualmente la odontología preventiva ha desarrollado e investigado potenciales medidas para reducir la placa dental y su efecto patogénico. Estas han desarrollado productos que pueden convertirse en intervenciones poco invasivas y beneficiosas para estos fines. Una de estas líneas de investigación es el efecto que tiene la arginina en la prevención de la caries, al ser adicionada en pastas dentales e incluso mentas sin azúcar¹.

Numerosos estudios demuestran que la adición de arginina en pastas dentales es un método complementario altamente eficiente en la reducción de factores patogénicos en el inicio y progreso de la caries^{25, 26}.

Koopman *et al* en el 2017 evaluaron sí el uso de pasta de dientes que contiene 8% de arginina afecta el potencial arginolítico y actividad metabólica de la sacarosa además comprobar los cambios que sufre el microbioma oral En este estudio piloto, nueve personas sanas usaron pasta de dientes con 8% de Arginina durante ocho semanas, teniendo como resultados que la Arginina al 8% usada en un dentífrico durante el período de estudio, aumenta el potencial arginolítico de la saliva, mientras que el metabolismo de la sacarosa en saliva es reprimido, además conduce a un cambio en el microbioma salival hacia una composición ecología saludable desde el punto de vista de la caries. Por lo tanto, la arginina puede considerarse como un prebiótico oral genuino⁴⁴.

7 Sistema Arginina Deiminasa (ADS)

También llamado Sistema Arginina Dihidrolasa, es un sistema a través del cual las bacterias arginolíticas por medio de su metabolismo y como parte de su respuesta al estrés ácido ayudan a la recuperación del pH dentro del biofilm²².

El sistema ADS es un conjunto de tres enzimas que, en acción secuencial, convierten la arginina en dióxido de carbono (CO₂) y amoníaco (NH₃) y genera Adenosintrifosfato (ATP) en el proceso²².

Las tres enzimas del sistema ADS están codificadas por genes, que forman parte de una secuencia²⁷. En un primer paso, la Arginina deiminasa produce citrulina y NH₃, posteriormente, la citrulina se fosforila por una ornitina-carbamiltransferasa y da lugar a ornitina y carbamil-PO₄; finalmente, la carbamil kinasa descompone carbamil-PO₄ en CO₂ y NH₃²⁷(Figura 2).

La protonación del amoníaco (NH_3) en el citoplasma de las bacterias es esencial para la neutralización de los ácidos resultantes de la fermentación de azúcares y la vuelta a un pH neutro, en un proceso global en el que también intervienen otros mecanismos²⁷.

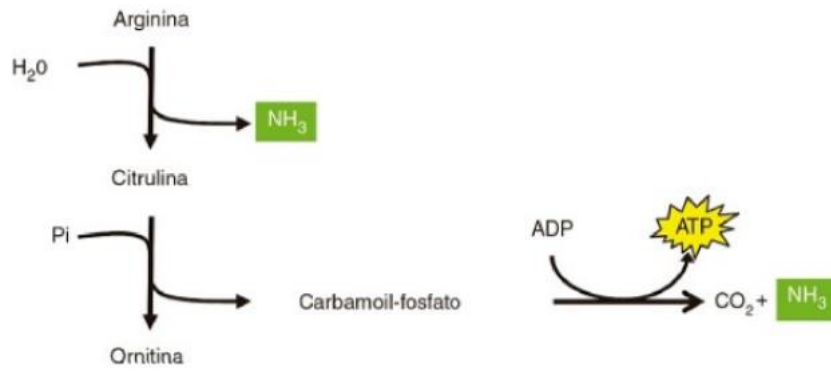


Figura 2. Sistema ADS

Tomado de: Lamont Richard. Microbiología e inmunología oral. 1ª. edición. México DF: Manual moderno; 2012.⁴⁸

Existe evidencia *in vitro* que apoya que el amonio producido a partir de la urea y la arginina es un factor endógeno importante inhibitorio de la aparición de microbiota ácidogénica en la placa dentobacteriana y por lo tanto disminuye el riesgo en el desarrollo de la caries dental, esto a través de la neutralización de ácidos y estabilización de la microbiota oral²⁸.

8. Hidrólisis de urea por la enzima ureasa.

La urea, es un compuesto químico resultado del metabolismo de las proteínas, llega a la cavidad oral a través de la secreción salival y del fluido crevicular, su concentración oscila entre 1 y 10 nM en individuos sanos^{14, 28}.

En el biofilm oral supragingival se encuentran los subgrupos de especies, *S. salivarius* y *A. naeslundii*, que utilizan sustratos nitrogenados, como la urea, para su crecimiento y desarrollo, transformándolo en amonio y dióxido de carbono, para mantener la homeostasis del pH en la biopelícula y microbiota oral supragingival²⁹. La enzima ureasa en las bacterias, se encuentra altamente regulada en respuesta a factores ambientales, tales como: disponibilidad de sustrato, carbohidratos y pH²⁹.

En la biopelícula los niveles de ureasa son altos y la urea es rápidamente hidrolizada. Se ha demostrado que individuos que producen bajos niveles de ureasa, tienen reducida capacidad para compensar la acidificación glucolítica¹⁴. La

hidrólisis, generada por la enzima bacteriana ureasa, genera amonio y CO_2 y es una de las mejores vías para la producción de álcali en la cavidad oral²⁸.

La generación de amoniaco a partir de urea, y debido a la actividad de la enzima ureasa, puede causar un aumento significativo en el pH de la biopelícula, por estos motivos, se ha planteado la hipótesis de que la actividad de ureasa en la biopelícula dental y en saliva puede prevenir el desarrollo de caries¹⁴.

ANTECEDENTES ESPECIFICOS.

Gordan *et al.*, relacionaron la actividad del sistema de arginina deiminasa (ADS) y ureasa con la caries dental. Se examinaron 93 sujetos, se clasificaron en: libres de caries ($n=31$), caries activos ($n=30$) y con experiencia de caries ($n=32$). Se tomaron muestras de saliva no estimulada y placa dental. La actividad ADS se midió por cuantificación del amoníaco generado a partir de la incubación de muestras de placa y saliva en una mezcla que contenía 50 mg de L-arginina-HCl y 50 mM de tampón Tris-maleato (pH 6,0). La actividad ADS específica se midió en nM de amoníaco generado por min/mg de proteína. La actividad de la ureasa se determinó mediante la cuantificación del amoníaco producido a partir de 50 nM de urea. Para la identificación bacteriana y la enumeración en tiempo real se utilizó qPCR. Los grupos se compararon mediante pruebas de Kruskal-Wallis. La correlación se hizo mediante prueba de Spearman para analizar la actividad metabólica de la placa y las relaciones bacterianas. Los resultados muestran una producción de amoníaco significativamente mayor ($p=0.05$) en la saliva y muestras de placa de los sujetos libres de caries en comparación con los sujetos con caries activa, de igual forma los niveles de ureasa fueron tres veces mayores en la placa de sujetos libres de caries¹⁴.

Morou-Bermudez *et al*, realizaron un estudio donde el objetivo fue evaluar la distribución y el patrón de actividad de la enzima ureasa en la placa dental y en la saliva de los niños durante un período de tres años y su relación con algunos factores de riesgo de caries importantes. Se realizó un estudio longitudinal con medidas repetidas durante un período de tres años. En el estudio fueron incluidos 80 niños, con edades comprendidas entre los 3-6 años. Se observó la dinámica del cambio en la actividad ureasa a través del tiempo transcurrido en el estudio, se describió y se asoció con factores de riesgo: clínicos, biológicos y de comportamiento para el desarrollo de caries. Resultados: la actividad de ureasa en la placa mostró una tendencia a permanecer estable durante el período de estudio y se asoció negativamente con el consumo de azúcar ($P < 0.05$). La actividad de ureasa en saliva no estimulada aumentó con la edad, y se asoció positivamente con los niveles de estreptococos mutans en la saliva y con el nivel educativo de los padres ($P < 0.05$). Conclusiones: los resultados de este estudio revelan interacciones interesantes y complejas entre la actividad de ureasa oral y algunos factores de riesgo de caries importantes²⁹.

Reyes *et al.*, investigaron la relación entre la actividad de la ureasa, la arginina deiminasa (ADS) y la caries. Se obtuvieron muestras de saliva y placa de 10 sujetos sin caries y 13 de sujetos con caries-activa. La actividad de ureasa se obtuvo a partir del amoníaco producido por incubación de muestras de placa y saliva en urea. La actividad arginina deiminasa (ADS) se obtuvo a partir del

amoníaco generado por la arginina-HCl y Tris-maleato buffer. La actividad específica se definió en nM de amoníaco por min/mg de proteína. Se utilizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk para analizar la distribución de los datos y se utilizó la prueba Mann-Whitney para comparar ambos grupos. Los resultados muestran que los sujetos libres de caries tuvieron una mayor actividad de generación de amoníaco por la ureasa y la arginina deiminasa tanto para muestras de saliva como de placa. Concluyeron que los altos niveles de producción de álcali en el ambiente oral se relacionaron con sujetos sin caries³⁰.

Nascimento *et al.*, correlacionaron la actividad del sistema ADS con el tipo de dentición y el estado de caries de 100 niños en un rango de edad de 2 a 14 años. Se clasificaron de acuerdo a su actividad de caries en: libres de caries, caries activa y experiencia de caries; se realizó recolección de placa supragingival de las superficies vestibulares de los órganos dentarios y muestras de saliva no estimulada; se midió la actividad arginólítica de la saliva y las bacterias mediante la producción de citrulina a partir de arginina (nM de citrulina)/ min/mg de proteína; se demostró que no hubo diferencia significativa en la actividad arginólítica salival en niños con diferentes estados de caries, sin embargo, el estado de caries está significativamente asociado con la actividad del ADS a pesar de la edad de los niños. En este estudio se correlaciono positivamente que la placa tomada de superficies sanas tiene niveles más altos de ADS comparada con la placa tomada de las superficies que presentaban lesiones cariosas, lo que puede afectar la susceptibilidad a caries³¹.

Gordan V. *et al.*, realizaron un estudio con el objetivo de relacionar la producción de álcali, dieta, salud e higiene oral; se tomaron muestra de placa y saliva no estimulada de 52 adultos. La ADS y la actividad de ureasa se midieron por cuantificación del amoníaco. En pruebas estadísticas se utilizó la correlación de Spearman para calcular todas las asociaciones. En los resultados obtenidos se relacionó la producción baja de álcali, con una higiene oral deficiente, poca ingesta de alimentos con contenido de arginina, alto consumo de bebidas azucaradas y el uso frecuente de tabaco³².

YL Liu *et al.*, realizaron una reseña acerca de los progresos recientes de aspectos genéticos, moleculares y fisiológicos de importantes vías generadoras de álcali en las bacterias orales; se tomaron en cuenta análisis y estudios clínicos de reciente publicación. La reseña confirma que la modificación del potencial alcalinógeno de los biofilms dentales es una estrategia para el control de caries, ya que, aumenta directamente el pH de la placa dental y adicionalmente la generación de álcali favorece la persistencia de las bacterias asociadas a la salud oral y al mismo tiempo afecta la proliferación de las bacterias cariogénicas como el *S. mutans*³³.

Nascimento *et al.*, relacionaron la producción de amoniaco a partir de arginina o urea con la experiencia de caries. Se tomaron muestras de saliva y placa dental de 45 sujetos adultos; se dividieron en 3 grupos, libres de caries, caries activa y con previa experiencia de caries. Se utilizó PCR para cuantificar la producción de ácido-álcali y medir la proporción de los organismos presentes en las muestras; como resultado obtuvieron que, la cantidad de amoniaco fue mayor en los pacientes libres de caries, los niveles de *S. mutans* fueron altos cuando existía una producción menor de ureasa; resaltando que el aumento del riesgo de caries es asociado con la reducción de la generación de álcali de las bacterias orales³⁴.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, la caries dental es un problema mundial que afecta a la población infantil. Es una enfermedad de etiología multifactorial, en la que los tejidos mineralizados del órgano dentario experimentan una destrucción; conlleva un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, como resultado del metabolismo microbiano. Existen bacterias en la cavidad oral capaces de generar amoniaco a partir de dos enzimas: la urea y la arginina, el amoniaco generado por ambas enzimas, tiene la capacidad de causar un aumento significativo en el pH de la biopelícula y neutralizar los ácidos producidos por otras bacterias, ayudando a estabilizar la microbiota oral y generar un efecto directo en la aparición del desarrollo de la caries dental. Este efecto de alcalinización del ambiente oral, puede verse directamente relacionado en la disminución del nivel de riesgo cariogénico en los niños.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe relación entre la producción de amoníaco por actividad de ureasa y arginina deiminasa en el biofilm dental con el riesgo de caries?

JUSTIFICACIÓN

El amoníaco producido a través de dos sistemas enzimáticos, ayuda a alcalinizar el ambiente oral, siendo una medida preventiva eficaz e inocua para ser utilizada en niños. Actualmente, no se han realizado estudios suficientes en pacientes pediátricos que midan la cantidad de amoníaco producido en la saliva y en la placa dental. El presente estudio, busca conocer los niveles de amoníaco que se produce a través de la actividad de la enzima ureasa y del sistema arginina deiminasa en el biofilm dental, de acuerdo al nivel de riesgo determinado en cada uno de los niños.

La cantidad de amoníaco que se produce a través de estos dos sistemas enzimáticos, dará una pauta que puede ser tomada en cuenta para la prevención del desarrollo de la caries, a través de la suplementación, para aumentar la producción natural de amoníaco, y tomarla, como una medida preventiva para la reducción de una probabilidad significativa en el desarrollo de esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación (HI):

La producción de amoniaco por actividad de ureasa y argininina deiminasa en el biofilm dental se encuentra asociado con el riesgo a caries.

Hipótesis Nula (HO):

La producción de amoniaco por actividad de ureasa y argininina deiminasa en el biofilm dental no se encuentra asociado con el riesgo a caries.

OBJETIVOS

a) General

Relacionar la producción de amoníaco por actividad de ureasa y arginina deiminasa en el biofilm dental con el riesgo de caries.

b) Objetivos Específicos.

Cuantificar la producción de amoníaco por actividad de ureasa en el biofilm dental.

Cuantificar la producción de amoníaco por actividad de arginina deiminasa en el biofilm dental.

Determinar el nivel a riesgo de acuerdo al formato CAMBRA de cada niño.

Relacionar la producción de amoníaco por actividad de ureasa y arginina deiminasa en biofilm dental, con el riesgo a caries.

METODOLOGÍA

Diseño de estudio:

Prospectivo

Analítico

Transversal

Observacional

Universo de estudio

Preescolar vespertino “Francisco José Gabilondo Soler” ubicado en una zona suburbana de la ciudad de Puebla.

Unidades de estudio

Se consideraron todos los niños que cumplían los criterios de selección y estuvieron presentes el día de la toma de muestra.

Muestra.

No probabilístico por conveniencia, de acuerdo a los criterios de inclusión.

1. CRITERIOS DE SELECCIÓN

1.1 Criterios de Inclusión

Niños cuyos padres firmaron el consentimiento informado.

Todos los niños en edad preescolar que estuvieron presentes en la institución educativa el día de la toma de muestra y diagnóstico de caries.

Niños de cualquier género.

Niños sistémicamente sanos.

Niños a los que se les realizó el formato para determinación de riesgo CAMBRA.

1.2 Criterios de Exclusión

Niños que se encontraran o tuvieran terapia antimicrobiana 15 días antes de la toma de muestra

Niños que cursaban con enfermedad viral el día de la toma de muestra.

Niños con presencia de aparatología ortodóncica.

Niños bajo tratamiento odontológico

1.3 Criterios de Eliminación

Presencia de alguna patología en el momento de la toma de muestras.

Niños que no comprendan las indicaciones al momento de la toma de muestra.

Muestras que no puedan ser procesadas por alguna pérdida al momento de su transportación.

VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala y categorías	Propuesta estadística
EDAD	Tiempo transcurrido en años que ha pasado desde el nacimiento de una persona.	Edad en años cumplidos; durante la toma de la muestra.	Años Cuantitativa Discreta	Medidas de tendencia central y dispersión
SEXO	Condición orgánica dada a un ser humano por el conjunto de características físicas propia del género.	Masculino / Femenino	Masculino / Femenino Nominal Dicotómica	Porcentajes
RIESGO A CARIES	Probabilidad de que una persona expuesta a ciertos factores presente caries de forma más frecuente que otra	Bajo riesgo Alto riesgo	Nominal Dicotómica	Estadística descriptiva
CARIES	Enfermedad infecciosa, de etiología multifactorial, en la cual los tejidos mineralizados del órgano dentario experimenta una destrucción progresiva	Con caries Sin caries	Nominal Dicotómica Con caries Sin caries	Estadística descriptiva Prevalencia
CUANTIFICACIÓN DE AMONIACO POR ADS	Cantidad de amoniaco producido por vías enzimáticas de la arginina deiminasa	Nanomoles (nM) de amoniaco por miligramo (nM/mg) de proteína	Cuantitativa Continua	Medidas de tendencia central y dispersión. R de Pearson
CUANTIFICACIÓN DE AMONIACO POR UREASA	Cantidad de amoniaco producido por vías enzimáticas de la ureasa	Nanomoles (nM) de amoniaco por miligramo (nM/mg) de proteína	Cuantitativa Continua	Medidas de tendencia central y dispersión. R Pearson

RECURSOS

Recursos humanos

Un tesista: Stephanie Díaz Contreras

Director Disciplinario: Dra. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana

Directores Metodológicos: Dr. Cristian Dionisio Román Mendez

Dra. Nila Claudia Gil Orduña

Recursos materiales

Kit de examen bucal.

- Tubos falcón
- Tubos Eppendorf
- Tubos de ensayo
- Gradillas.
- Cucharillas Hu-friedy
- Coleman - Micropipeta
- Puntas de micropipetas (azules-amarillas)
- Refrigerador
- Refrigerador de bajas temperaturas (-80°C).
- Sonificador
- Centrífuga Refrigerada
- Estufa.
- Espectrofotómetro.
- Cubetas de vidrio de 1.5 ml para espectrofotómetro.
- Reactivos.

Recursos financieros: Recursos proporcionados por la Secretaria de Investigación y Estudios de posgrado y Recursos propios.

BIOÉTICA

Con norma al tratado de Helsinki, durante la presente investigación se cumplió con proteger la dignidad, la integridad y la confidencialidad de la información personal de los individuos que participan en dicha investigación. De igual forma, la presente investigación no representa un riesgo en la salud del paciente a investigar y se encuentra apoyada en conocimiento de bibliografía científica y de estudios previos realizados en poblaciones similares.

De acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre el manejo de RPBI, el biofilm dental que se obtendrá de las personas de estudio, no es considerado un RPBI; sin embargo, al terminar de utilizar la cantidad necesaria de biofilm para realizar el estudio, estas se someterán a un proceso de esterilización y se mantendrán en congelación a -70° C; para futuras necesidades del laboratorio.

PROCEDIMIENTO

Previa estandarización intra e inter observador, en las que se capacitó para la determinación de riesgo a caries por CAMBRA, la toma de muestra de biofilm dental y para los procesos de laboratorio.

- 1.- Se solicitó al tutor el consentimiento para incorporar al niño en el estudio.
- 2.- Se realizó la Historia Clínica del paciente.
- 3.- Se informó al padre o tutor los objetivos del estudio y beneficios obtenidos al entrar al estudio.
- 4.- Se examinó la cavidad oral.
- 5.- Se llenó el formato diseñado para determinar el riesgo a caries por CAMBRA (Anexo 1).
- 6.- Se dio las indicaciones para la toma de muestras de biofilm dental.
- 7.- Se tomó muestra de placa de todas las superficies vestibulares con cucharilla de dentina estéril (autoclave de calor húmedo 121.5 °C, presión de 15 lb/in² durante 30 min).

Procedimientos de Laboratorio:

Curva de calibración de amonio.

Esta curva se obtuvo a través del método de Nessler³⁶, donde concentraciones conocidas de amonio, se mezclan con el reactivo de Nessler (KI 5%, HgCl 2,5%, KOH 16%) generando una coloración amarilla que varía según la concentración de amonio. La absorbancia de estos estándares fue leída en el espectrofotómetro. Para obtener la curva de calibración de amonio se mezclan los reactivos mostrados en la Tabla No.1

Tabla 1. Curva de calibración de amonio

	H ₂ O (μl)	Nessler (μl)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM
Blanco	900	100	0
1 mM	899	100	1
20 mM	898	100	2
40 mM	896	100	4

60 mM	894	100	6
80 mM	892	100	8
100 mM	890	100	10
200 mM	880	100	20
300 mM	870	100	30
400 mM	860	100	40
500 mM	850	100	80

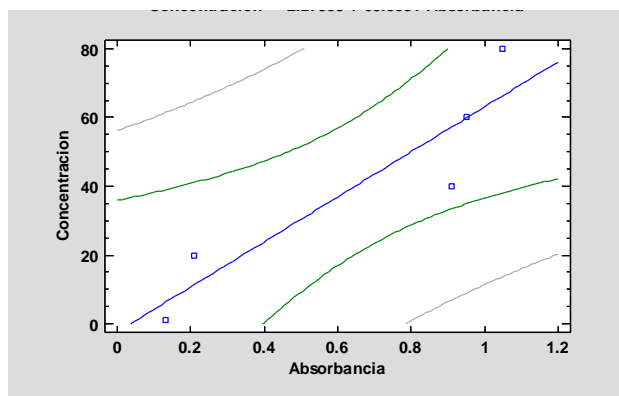
Posterior a la preparación de las soluciones de la Tabla N° 1, se continuó con el siguiente protocolo:

- Se leyó la absorbancia en el espectrofotometro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech) a una longitud de onda de 395 nm calibrada previamente con la solución blanco (libre de amoniaco).
- Con los datos obtenidos (4 pruebas independientes) se realizó una regresión lineal y se obtuvo una curva estándar de la concentración de amonio versus la absorbancia (Tabla 2). Esta curva nos sirvió para extrapolar los valores de longitud de onda del amoniaco formado por las actividades de las enzimas ADS y ureasa de las muestras de placa dentobacteriana de los sujetos de estudio.

Tabla 2. Curva estándar de concentración de amonio

Estándar	Concentración de amonio (mM)	Absorbancia
St 1	1	0.130
St 2	20	0.210
St 3	40	0.910
St 4	60	0.950
St 5	80	1.05

Curva de regresión lineal para la calibración de concentración de amonio



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

Datos de la curva:

Concentración = $2.27953 + 65.3531 \cdot \text{Absorbancia}$

Coefficiente de Correlación = 0.922723

Obtención de muestras

Los niños examinados debían cumplir con abstención de cualquier procedimiento de higiene oral por 12 horas, según protocolo usado en estudio de Gordan y cols¹⁴.

Obtención de muestra de biopelícula

A 38 niños se les recolectó biopelícula supragingival, a través del raspado completo de todas las superficies vestibulares dentales, con cucharilla para dentina estériles (Figura 3). Luego se llevó a tubos Eppendorf estériles que contenían 500 μl de solución de K_2HPO_4 10 mM (pH 7), a 4°C durante la toma de muestra (Figura 4).

La muestra se colocó en una hielera manteniéndolo a 4°C para trasladarla al laboratorio para su procesamiento.



Figura 3. Raspado de las superficies



Figura 4. Recolección de biofilm

La cantidad de biofilm dental obtenido de cada individuo es diferente, por lo que se determinó el peso de cada muestra de placa dentobacteriana, para ello se pesó, previo a la toma de muestra el tubo Eppendorf con los 500 μl de K_2HPO_4 10 mM (pH 7), después de tomar la muestra se pesó nuevamente y se determinó los μg obtenidos de biofilm por diferencia de peso.

Transportación y conservación de muestra hasta análisis.

Cada muestra fue marcada con el número asignado a cada individuo, y se conservaron y transportaron en una hielera a 4° C.

Las muestras de biofilm dental, fueron almacenadas en ultracongelador a -80°C hasta el día del análisis.

Procesamiento de las muestras de biofilm dental.



Figura 5. Precipitado de placa dentobacteriana

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y el biofilm se disgregó por medio de sonicación (Sonic, Vibracell™) a una amplitud 70 ciclos por segundo. Se realizaron dos ciclos de 30 segundos cada uno colocando la muestra sobre hielo durante este proceso, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado obtenido (Figura 5) se lavó dos veces con 10 mM de tris Maleato (pH 6). Finalmente el precipitado se resuspendió con 500 μ l de 10 mM tris Maleato (pH 6).

Producción de amonio a partir de urea (enzima ureasa) o arginina (ADS).



Figura 6. Incubación

Para determinar la actividad de Ureasa o Arginina Deiminasa de cada una de las muestras de placa dentobacteriana se colocó 25 μ l de la muestra en un microtubo con 20 μ l de regulador Tris-maleato 10 mM, se añadió 430 μ l de agua destilada estéril y 25 μ l de urea 1M o L-arginina 1M. Una vez preparada la reacción se incubó a 37°C durante 90 minutos, después de este tiempo la reacción se detuvo por incubación de la muestra sobre hielo durante 5 min. Las muestras se centrifugaron durante 1 min a 7,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se utilizó para la medición de amonio producido.

Cuantificación de amonio producido por la Ureasa y ADS.

Para cuantificar el amonio producido por la actividad enzimática de ureasa o ADS se colocó en un tubo de ensaye limpio 875 μ l de agua destilada, 25 μ l de la muestra y 100 μ l del reactivo de Nessler, se mezcló por agitación con un vortex y el color generado se leyó a 395 nm, los resultados obtenidos de 3 eventos independientes se promediaron y se extrapolaron en la curva de concentración de amonio previamente realizada. Luego de obtener los valores de amonio producido (mM), y determinada la cantidad de placa obtenida en las respectivas muestras, se expresa la actividad específica enzimática como mmol/mg de placa.

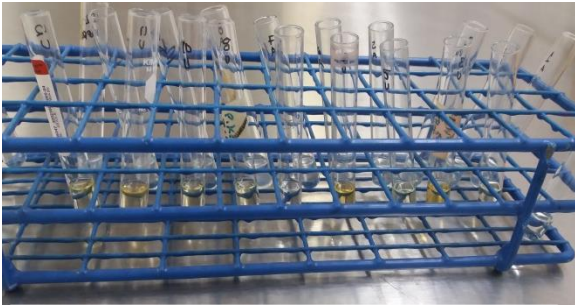


Figura 7. Muestra con adición del reactivo Nessler



Figura 8. Lectura en el espectrofotómetro

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para el análisis de los resultados se utilizó estadística descriptiva, prueba de normalidad de las muestras Kolmogorov-Smirnov y para la comparación de medias en los dos grupos t de Student, U de Mann-Whitney apoyados en el programa estadístico STATGRAPHICS versión 18 para Windows.

RESULTADOS

En el estudio participaron 38 individuos de ambos sexos, 17 pacientes pertenecieron al sexo femenino (45%) y 21 al sexo masculino (55%).

Los individuos se encuentran en edades entre los 3-6 años, con una media de 4.14 años \pm .849.

Todos los individuos fueron evaluados de acuerdo a CAMBRA y se clasificaron en Bajo riesgo y Alto riesgo (Tabla 5).

Tabla 5. Nivel de Riesgo de acuerdo al sexo

	ALTO RIESGO	BAJO RIESGO	Total
Femenino	8	9	17
Masculino	10	11	21
Total	18	20	38

La prevalencia de caries de la población estudiada, fue del 81% (Tabla 6).

Tabla 6. Prevalencia de caries

	CARIES	NO CARIES	Total
Frecuencia	31	7	38
Porcentaje	81.6	18.4	100%



Gráfico 1. Prevalencia de Caries

CAMBRA toma en cuenta 3 factores importantes para clasificar a los individuos en riesgo: indicadores de enfermedad, factores de riesgo y factores protectores, sin embargo es importante destacar que existe variación al analizar el número de órganos dentarios con lesiones cariosas en cada grupo de riesgo.

Tabla 7. Rango OD cariados de acuerdo al Riesgo a Caries

RIESGO	Valor mínimo	Valor máximo	Rango
Bajo	0	6	6
Alto	1	12	11

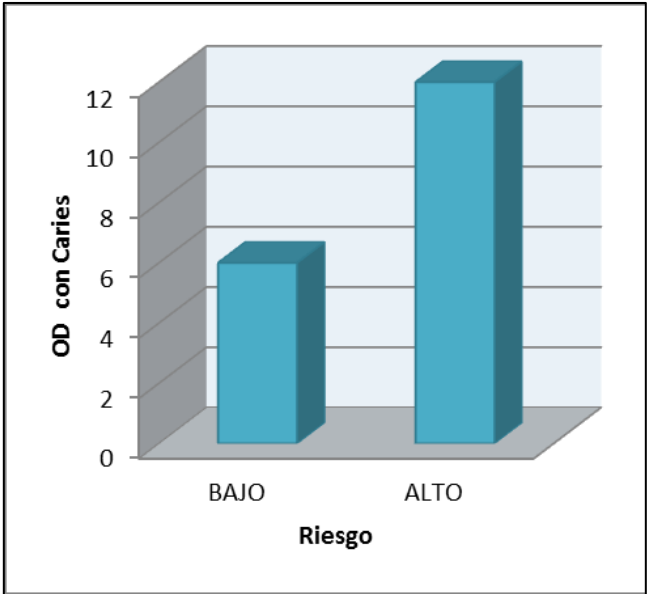


Gráfico 2. Riesgo / Numero de OD con caries

Para comprobar si existe significancia en esta variación del número de órganos dentarios con lesiones cariosas en cada grupo de riesgo se realizó primeramente el análisis de la normalidad de ambos grupos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov y corroborado con la asimetría y la curtosis de la estadística descriptiva en el cual se observó que sus valores se encuentran fuera de la escala permitida (-2 a +2) y son considerados los parámetros para establecer la normalidad en la distribución de una muestra.

Resumen Estadístico Número de OD dentarios con caries de acuerdo al riesgo.

	<i>Bajo riesgo Caries</i>	<i>Alto riesgo Caries</i>
Recuento	20	18
Promedio	1.6	7.22222
Desviación Estándar	1.56945	3.1726
Coefficiente de Variación	98.0903%	43.9282%
Mínimo	0	1.0
Máximo	6.0	12.0
Rango	6.0	11.0
Sesgo Estandarizado	3.0226	-0.352735
Curtosis Estandarizada	2.63489	-0.709055

El grupo de Bajo riesgo a caries presenta un promedio de 1.6 órganos dentarios cariados, mientras que el grupo de Alto riesgo presenta un promedio mayor de 7.22 ± 3.17 de órganos dentarios con presencia de caries. Para determinar la diferencia entre grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, se observó un valor de $(P = 2.96596E-8)$, por lo tanto las diferencias son estadísticamente significativas.

CONCENTRACIÓN DE AMONIO

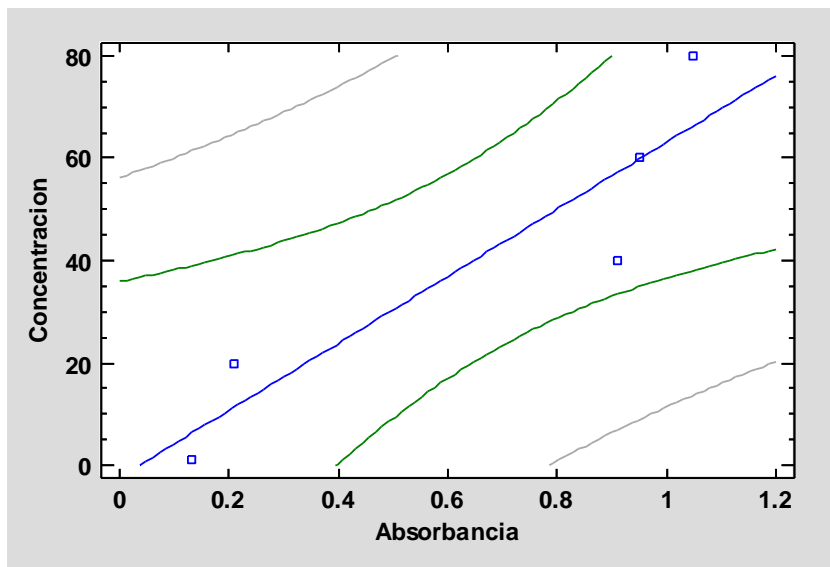
Para determinar la concentración de amonio, se utilizó el espectrofómeto y con la observancia obtenida se realizó una curva de regresión lineal Concentración vs Absorbancia con el paquete estadístico STATGRAPHICS para Windows versión 18.0.

Datos de la curva:

Concentración = $2.279 + 65.353 \cdot \text{Absorbancia}$

Coefficiente de Correlación = 0.922723

Curva de calibración de amonio



ACTIVIDAD ENZIMATICA

Cuando se comparó la actividad enzimática Ureasa en los grupos Bajo riesgo/Alto riesgo, se comprobó la normalidad de la distribución de las muestras mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes corroborado con la asimetría y la curtosis de la estadística descriptiva, por lo que al comparar esta actividad enzimática se utilizó el test estadístico *t* student.

Resumen Estadístico. Comparación de actividad enzimática Ureasa.

	<i>Bajo Riesgo Ureasa</i>	<i>Alto Riesgo Ureasa</i>
Recuento	20	18
Promedio	18.4474	16.8019
Desviación Estándar	12.0513	9.26497
Coefficiente de Variación	65.3278%	55.1423%
Mínimo	2.802	3.455
Máximo	51.555	38.223
Rango	48.753	34.768
Sesgo Estandarizado	1.9523	1.03342
Curtosis Estandarizada	1.5307	0.214071

Al comparar la producción de amoníaco por la actividad de la enzima Ureasa, entre muestras de sujetos de ambos grupos (**Bajo riesgo a caries Ureasa/Alto riesgo a caries Ureasa**), se encontró que los sujetos que se encuentran en un índice de caries **Bajo** determinado por CAMBRA, expresan mayor actividad enzimática con un promedio de 18.44 mmol/mg \pm 12.0513 en biofilm, mientras que aquellos sujetos que presentan **Alto** riesgo a caries muestran una media de 16.80 mmol/mg en biofilm, se observó un valor de ($P = 0.642712$) con un intervalo de confianza de [-5.48747, 8.77839], por lo tanto las diferencias no son estadísticamente significativas.

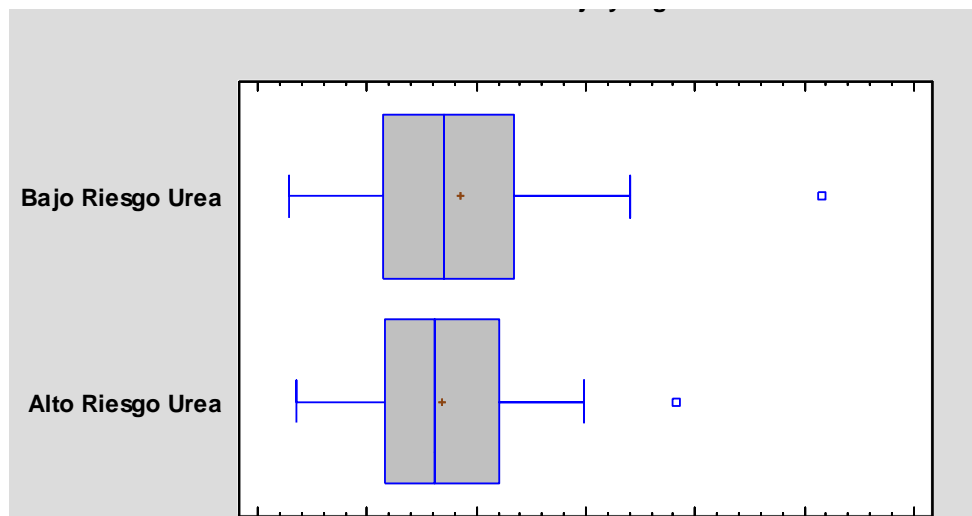


Grafico 3. Concentración de amoníaco por medio de la Urea de acuerdo al Riesgo

Con respecto a la cantidad de amoníaco producida por la ADS en los grupos Bajo Riesgo /Alto Riesgo se determinó que no poseen distribución normal mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes corroborado con la asimetría y la curtosis de la estadística descriptiva, por lo que se utilizó el test estadístico U de Mann-Whitney para su comparación.

Resumen Estadístico. Comparación de actividad enzimática Arginina

	<i>Bajo Riesgo Arginina</i>	<i>Alto Riesgo Arginina</i>
Recuento	20	18
Promedio	33.1419	21.0679
Desviación Estándar	7.20898	4.41664
Coefficiente de Variación	21.7519%	20.9638%
Mínimo	11.69	10.513
Máximo	43.451	27.963
Rango	31.761	17.45
Sesgo Estandarizado	-2.95112	-0.861795
Curtosis Estandarizada	3.11929	0.312807

Al comparar la producción de amoniaco por la actividad de la enzima Arginina Deiminasa (ADS), entre muestras de sujetos de ambos grupos (**Bajo riesgo a caries Arginina/Alto riesgo a caries Arginina**), se encontró que los sujetos que se encuentran en un índice de caries **Bajo** determinado por CAMBRA, expresan mayor actividad enzimática con un promedio de 33.14 mmol/mg \pm 7.20 en el biofilm dental, aquellos que presentan Alto riesgo a caries poseen un promedio de 21.06, presentando un valor de ($P = 4.52646E-7$) en un intervalo de confianza de [8.08549, 16.0624] por lo tanto las diferencias son estadísticamente significativas.

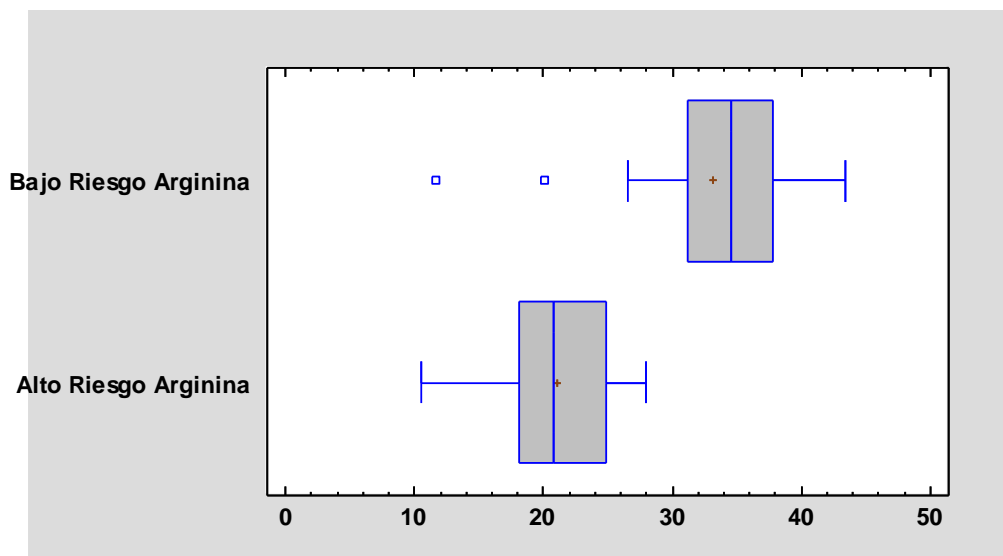


Gráfico 4. Concentración de amoniaco por medio de Arginina Deiminasa de acuerdo al Riesgo

Se realizó una comparación de la actividad de las enzimas en el biofilm dental Urea y Arginina Deiminasa y ambos grupos de riesgo a caries Bajo riesgo y Alto riesgo, mediante una prueba estadística Kruskal Wallis, que nos muestra que puesto que el valor de ($P=0.0000$) de la prueba es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 5% de significancia.

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3214.65	3	1071.55	13.93	0.0000
Intra grupos	5537.74	72	76.9131		
Total (Corr.)	8752.39	75			

Para determinar cuáles son los valores promedio significativamente diferentes, se utilizó una Prueba de Múltiples Rangos.

Pruebas de Múltiple Rangos

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
Bajo Riesgo Urea - Alto Riesgo Urea		1.64546
Bajo Riesgo Urea - Bajo Riesgo Arginina	*	-14.6945
Bajo Riesgo Urea - Alto Riesgo Arginina		-2.62054
Alto Riesgo Urea - Bajo Riesgo Arginina	*	-16.34
Alto Riesgo Urea - Alto Riesgo Arginina		-4.266
Bajo Riesgo Arginina - Alto Riesgo Arginina	*	12.074

* indica una diferencia significativa.

De acuerdo a la prueba estadística realizada podemos comprobar:

1. Existe diferencia significativa en la producción de amoníaco debido a las actividades enzimáticas de Urea y Arginina en el biofilm dental, a pesar de que los individuos se encontraban en un nivel de riesgo Bajo de acuerdo a CAMBRA, lo que puede significar que a pesar de encontrarse en el mismo nivel de riesgo, el nivel de la producción de amoníaco por ambas enzimas, se manifiesta de forma diferente.

2. En esta prueba se corrobora que la producción alta de amoníaco por actividad de la enzima Arginina Deiminasa, es estadísticamente diferente entre los individuos catalogados en un nivel de riesgo Bajo.

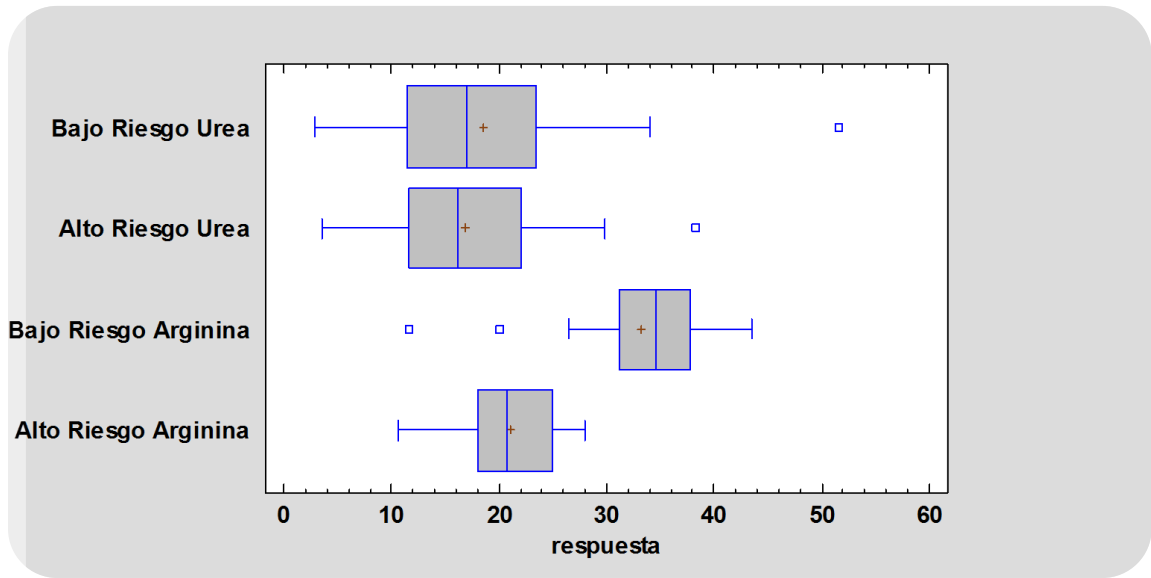


Grafico 5. Comparación de la actividad enzimática de los grupos de riesgo y ambos sistemas enzimáticos

DISCUSIÓN

Numerosas investigaciones plantean que la generación de álcali por parte de la microbiota oral a través de su mecanismo para convertirlo en amonio y liberarlo tiene influencia en el equilibrio ácido-base para el mantenimiento de la salud oral y es un factor importante en la inhibición de la caries dental, surgiendo como una nueva alternativa de prevención^{1,14,30,31,32,34}.

El presente estudio determinó la producción de amoniaco a través de los sistemas enzimáticos Ureasa y Arginina deiminasa en una población infantil y su relación con el riesgo a caries de acuerdo a CAMBRA.

En nuestro estudio, al analizar los resultados obtenidos de la producción de amoniaco a través de la vía enzimática Ureasa, se observan variaciones con los resultados reportados en estudios previos. La diferencia puede estar influenciada por el procedimiento para la toma de muestra ya que difiere en aspectos significativos como el lugar de las distintas superficies dentales de donde se obtiene el biofilm y la susceptibilidad a caries de cada superficie de los individuos estudiados.

Otro factor difícil de controlar y que puede causar variaciones entre nuestros resultados y los ya reportados, fue el ayuno antes de la toma de muestra, debido a la corta edad de los niños y la cooperación de los padres. A pesar que el horario de la toma de muestra trato de ser regulado, al ser un preescolar de turno vespertino, dificultaba la posibilidad del ayuno indicado en el protocolo seguido, en el cual, los sujetos deben abstenerse de realizar higiene bucal y comer (incluso masticar chicle o dulces, o beber líquidos diferentes al agua) durante 12 horas antes de la recolección de la muestra¹⁴. Si nuestros individuos de estudios no mantuvieron este ayuno y si aunamos que existe la posibilidad del consumo de algún tipo de alimento que contiene azúcar, puede ser un gran factor para la diferencia de resultados. Morou-Bermudez E *et al* demuestran, que el consumo de azúcar se asocia negativamente con la expresión de la actividad de ureasa en el biofilm oral y deprimen la actividad de este sistema²⁹. Adicionalmente Gordan V *et al* en el 2014 relacionaron la producción baja de amoniaco, con una higiene oral deficiente, poca ingesta de alimentos con contenido de arginina, y alto consumo de bebidas azucaradas que puede afectar en la disminución de la proporción de bacterias ureolíticas³². Nascimento *et al* señalan que la experiencia de caries está significativamente asociada con la producción de amoniaco por lo tanto afecta la susceptibilidad a la misma³¹.

S. salivarius es una de las bacterias más estudiadas como bacterias urolíticas, Chen *et al* en el 2000, mostró una significativa asociación positiva entre el número de *S. salivarius* y niveles de actividad de ureasa. *S. salivarius* usa urea como fuente de nitrógeno para el crecimiento a través de una vía dependiente de la ureasa. El pH afecta la capacidad de *S. salivarius* para metabolizar ureasa y transformar la urea en amoniaco, por lo que el ambiente oral se convierte en otra variable importante que impacta la actividad de ureasa, los estudios han demostrado que los niveles de pH por debajo de 4 pueden inactivar la actividad del sistema enzimático ureasa y por ende afectar la proporción de amoniaco producido desde esta vía enzimática⁴⁷.

Al comparar la producción de amoniaco por la actividad enzimática de ureasa en el biofilm dental de grupos de Bajo riesgo y Alto riesgo, las diferencias entre los grupos no son estadísticamente significativos. Estos resultados concuerdan con los de Morou-Bermudez E *et al.* quienes en el 2011 realizaron un estudio longitudinal en niños y no encontraron diferencias entre los grupos, concluyendo que la actividad de ureasa permaneció estable durante el tiempo de estudio que fue de 3 años²⁹.

La segunda actividad enzimática estudiada fue la actividad de la enzima Arginina Deiminasa que a través de un conjunto de tres enzimas, en acción secuencial, convierten la arginina en CO₂ y amoniaco, lo que beneficia la alcalinización del ambiente oral²⁷. En este estudio al comparar la actividad por la enzima Arginina Deiminasa (ADS), entre muestras de sujetos de ambos grupos (Bajo riesgo a caries / Alto riesgo a caries), se encontró que los sujetos que se encuentran en un índice de caries Bajo determinado por CAMBRA, expresan mayor actividad enzimática de Arginina Deiminasa (ADS) en el biofilm dental.

Gordan *et al.* en el 2010 investigaron la relación de la arginina deiminasa (ADS) y la actividad de caries a través de un estudio de casos y controles ellos midieron las actividades de ADS en la placa de las superficies dentales y en saliva de 93 sujetos, colocados en tres diferentes grupos: libre de caries, caries activa y con experiencia de caries. La actividad de ADS se midió por cuantificación del amoníaco generado, los resultados revelaron una producción de amoníaco significativamente más alto en las muestras de saliva y placa de los individuos libres de caries comparados con los sujetos caries-activos¹⁴.

Nascimento *et al.* en el 2013 establecen que el metabolismo de la arginina por bacterias orales a través del sistema Arginina deiminasa (ADS) aumenta el pH local, que puede neutralizar los efectos de la acidificación del metabolismo del azúcar y reducir la cariogenicidad del biofilm oral. De acuerdo a su investigación independientemente de la severidad de las lesiones cariosas o del número de

órganos dentarios con lesión en los niños o su tipo de dentición, los pacientes libres de caries demuestran una mayor actividad de ADS en comparación con pacientes que presentan lesiones cariosas en esmalte o dentina. El análisis mostro que un biofilm oral que se obtuvo de una zona sin presencia de lesión de caries tiene una mayor actividad de ADS en comparación con la placa que se toma de una zona que presenta algún tipo de actividad cariogénica³¹.

Gordan *et al.*, realizaron un estudio en donde los sujetos se dividieron en tres grupos según el estado de caries; personas sin caries, caries-activo e individuos con experiencia en caries y mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real) cuantificaron la proporción de ciertos organismos productores de ácido o álcali en las muestras. Ellos concluyeron que los niveles más altos de actividad ADS salival y en el biofilm oral fueron observados en sujetos libres de caries y las proporciones de *Streptococcus mutans* de la saliva y la placa dental de los sujetos caries activo, fueron significativamente más altos que los del grupo libre de caries. Este estudio respalda la teoría de que el aumento del riesgo de caries está asociado con una capacidad reducida generadora de álcali de las bacterias que colonizan la cavidad oral y son generadoras de enfermedad.

La asociación entre sujetos con Bajo riesgo a caries y una mayor generación de amoníaco en el biofilm oral a partir de arginina o urea, como la observada en esta investigación, puede inhibir el desarrollo de una microbiota patógena. Las bacterias arginoliticas en la cavidad oral pueden expresar el sistema enzimático Arginina Deiminasa y ayudar a estabilizar el biofilm de la placa residual en las superficies susceptibles del órgano dentario, al hacerlo previene cambios en la flora del biofilm lo que crea un ambiente desfavorable para que bacterias como el *S. mutans* se instauren y afecta su capacidad para colonizar la placa dental^{24, 25}.

Un conjunto sustancial de evidencia de análisis microbiológico, genético y bioquímico, así como estudios clínicos ha sugerido que el potencial alcalinogénico de las biopelículas dentales se puede utilizar como una estrategia para el control de la caries³³.

CONCLUSIONES

En la población estudiada existe una alta prevalencia de caries, el 81% de los individuos presentan al menos 1 lesión cariosa.

De los 38 individuos estudiados, 18 fueron clasificados de acuerdo a CAMBRA como Bajo riesgo y 20 se encontraron en Alto riesgo, sin denotar ninguna predilección por el sexo de la población de estudio.

La producción de amoníaco por medio de la vía enzimática Ureasa en aquellos individuos con Bajo riesgo a caries presentan oscilaciones en mmol/mg y es mayor a la presentada por los individuos con Alto riesgo a caries de las muestras tomadas en biofilm dental, sin embargo no representan diferencias estadísticamente significativas.

Al estudiar la otra vía enzimática productora de amonio Arginina Deiminasa en individuos que presentan bajo riesgo a caries y contrastarla con los que poseen Alto riesgo se puede observar diferencias estadísticamente significativas.

Las muestras analizadas indican que el aumento de actividad de Amoníaco a través de la vía enzimática de la Arginina Deiminasa (ADS) en biofilm dental en este estudio, se asocia con la disminución de índices de Riesgo a caries de acuerdo a CAMBRA en niños en edad preescolar.

En el biofilm dental el sistema enzimático Ureasa presenta tendencia al aumento en la producción de amoníaco en niños que presentan bajo riesgo a caries, en nuestro estudio esta disminución no fue significativa.

La caries dental sigue siendo un problema de salud pública, por lo que se deben buscar medidas preventivas adicionales a las ya conocidas, beneficiando a la población en riesgo de desarrollar esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cummins D. The exploration of a breakthrough technology for Caries Prevention. *J. Clin Dent.* 2013;24:1–14.
2. Istifanus M.F et al. The occurrence and effect of some antibiotics on *Streptococcus mutans* in dental caries. *Int J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2014; 3(12):16-18.
3. Nuñez P, Garcia L. Biochemistry of dental caries. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 2010;9(2):156-166
4. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33:248-255.
5. Fitzgerald R.J., Keyes P. Ecologic factors in dental caries. *Am J Pathol.* 1963; 42(6):759-772.
6. Barrancos Money. *Operatoria Dental: integración clínica.* 4ª Ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2006. pp. 297-336.
7. Kuramitsu HK et al. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71:653-70.
8. Anderson M. Risk assessment and epidemiology of dental caries: Review of the literature. *Pediatr Dent.* 2002;24:377-85.
9. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004;38:204-211.
10. Caufield P, Griffen A. Dental caries. An infection and transmissible disease. *Pediatr Clin North Am.* 2000;47:1001-1019.
11. Pandey P et al. Estimation of salivary flow rate, pH, buffer capacity, calcium, total protein content and total antioxidant capacity in relation to dental caries severity, age and gender. *Contemp Clin Dent.* 2015;6(1):65–71.

12 Dwitha A. Evaluation of pH, buffering capacity, viscosity and flow rate levels of saliva in caries-free, minimal caries and nursing caries children: An in vivo study. *Contemp Clin Dent*.2014;5(3):324–328.

13 Gamboa L, Cortes A. Dental Caries risk assessment: myth or reality?. *Univ Odontol*.2013; 32(68):69-79. ISSN 0120-431912

14 Gordan V et al. Could Alkali Production Be Considered an Approach for Caries Control?. *Caries Res*.2011;44(6):547–554.

15 Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *JADA*.2008;139(5):18-24.

16 Llana-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*.2006;11:449-455.

17 Echeverri Maria Teresa. La saliva: componentes, función y patología. *Rev Estom*.1995;4(2):100-104.

18 X Cheng et al. Arginine promotes fluoride uptake into artificial carious lesions in vitro. *Aus Dent Journal*.2015;60:104-111.

19 Perez A. La Biopelícula: una nueva visión de la placa dental. *Rev Estomatol Herediana*.2005;15(1):82–85

20 Joann R Gurenlian. The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health. *J. of Dental Hygiene*.2007;81(5):1-11.

21 Chandki R. et al. Biofilms: A microbial home. *J Indian Soc Periodontol*.2011;15 (2):111–114.

22 Martinez A, Sanchez F. Arginine, nitric oxide and endothelial function. *Ars Pharm*.2004;45(4):303-317

23 U. Suchner, D. K. Heyland, K. Peter. Immune-modulatory actions of arginine in the critically. *British J. Nutrition*. 2002; 87 (1): 121-132

24 R. Cantoreet al. In Situ Clinical Effects of New Dentifrices Containing 1.5% Arginine and Fluoride on Enamel De- and Remineralization and Plaque Metabolism. *J Clin Dent*.2013;24:32–44

- 25 Souza MLR et al. Comparing 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 primary root caries. *J Dent.* 2010;38(1):34-40.
- 26 Yin W. A clinical investigation using quantitative light-induced fluorescence (QLF) of the anticaries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate. *J Clin Dent.* 2013;24:15–22
- 27 Valero Guillen Pedro. *Bacterias de Interés Odontológico.* España: editum. 2015. 59-71.
- 28 Reyes É et al. Activity and effects of urease and arginine deiminase in saliva and oral human biofilm. *Rev Fac Odontol Univ Antioq.* 2012; 23(2):343-352.
- 29 Morou-Bermudez E et al. 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.* 2011;56(11):1282–1289.
30. Reyes E. et al. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(3):235-240
- 31 Nascimento et al. Oral Arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *J Dent Res.* 2013,92(7):604-608.
- 32 Gordan V. et al. Alkali production in the mouth and its relationship with certain patient's characteristics. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(6):560-568.
- 33 YL Liu, Nascimento M, Burne R. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int. J. of Oral Science.* 2012;4:135–140.
- 34 Nascimento et al. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(2):89–95.
35. Fujimoto EK. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
36. Lloret S. Determination of ammonia and primary amine compounds and kjeldahl nitrogen in water samples with a modified Roth's fluorimetric method. 2005;65(4):869-875.
37. Marsh P. Dental plaque as a biofilm and a microbial community implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006; 6(1):S14.

38. Stoodley et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56: 187-209
39. Characklis WG. Fouling biofilm development: A process analysis. *Biotechnology and Bioengineering.* 2009; 102 (2): 309-347.
40. Ten Cate JM, Larsen MJ, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. En Fejerskov O, Kidd editors. *Dental caries: the disease and clinical management.* Oxford: Blackwell; 2008.
41. Castellanos JE et al. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. *Univ Odontol.* 2013; 32(69):49-59.
42. Young DA, Featherstone JD. Implementing caries risk assessment and clinical intervention. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):495-505.
43. Teich S et al. Guiding the practitioner through the caries management by risk assessment CAMBRA protocol. *Alpha Omegan.* 2011; 104(3):68-72.
44. Koopman et al. Changes in the oral ecosystem induced by the use of 8% arginine toothpaste. *Archives of Oral Biology.* 2017; 73:79–87.
45. Shivani Sharma et al. Nanoscale characterization of effect of L-arginine on *Streptococcus mutans* biofilm adhesion by atomic force microscopy. *Microbiology.* 2014; 160: 1466-1473.
46. Huang X et al. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Archives of Oral Biology.* 2017; 82: 256-262.
47. Burne R, Chen Y. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection.* 2000; 2: 533-542.
48. Lamont Richard. *Microbiología e inmunología oral.* 1ª edición. Mexico DF: Manual moderno; 2012.

ANEXOS

Anexo 1

Formulario CAMBRA para la evaluación de riesgo de caries

Nombre del alumno:

Grado/grupo:

Edad:

C	
E	
O	
P**	

Formulario para la evaluación del riesgo de caries. Niños de 0-5 años.				
Nombre del paciente:	Edad:		Fecha:	
	1	2	3	Comentarios
1. Factores de riesgo (factores biológicos predisponentes)				
a) Madre o cuidador con caries activas en los últimos 12 meses	Si			
b) Biberón con otros líquidos que no sean agua, leche sola o fórmula simple.		Si		Tipo de líquido:
c) El uso del biberón continua		Si		
d) El niño duerme con el biberón o lo demanda		Si		
e) Consumo entre comidas (frecuencia >3 veces) de snacks con azúcar/almidón cocido/bebidas azucaradas		Si		Frecuencia:
f) Están presentes factores reductores de saliva: 1. Medicamentos (ej. algunos para el asma o hiperactividad) 2. Factores médicos (ej. tratamiento de cáncer) o genéticos		Si		
g) Niño con problemas de desarrollo/niño con necesidades especiales		Si		
h) Los cuidadores tienen poco conocimiento sobre hábitos saludables/ el niño participa en algún programa de educación para la salud		Si		
2. Factores protectores				
a) El niño vive en una comunidad con agua fluorada o toma suplementos de flúor			Si	
b) El niño bebe agua fluorada			Si	
c) Se cepilla los dientes con pasta fluorada (tamaño guisante) al menos 1 vez al día			Si	
d) Se cepilla los dientes con pasta fluorada (tamaño guisante) al menos 2 veces al día			Si	
e) Ha recibido barniz de flúor en los últimos 6 meses			Si	
f) Madre/cuidador toma pastillas o chicles de xilitol 2-4 veces al día. Niño utiliza toallitas de xilitol 3-4 veces al día			Si	
g) Utiliza pastas de calcio y fosfato en los últimos 6 meses			Si	
3. Indicadores de enfermedad/factores de riesgo. Examen clínico del niño				
a) Lesiones de mancha blanca, lesiones de desmineralización del esmalte o caries	Si			
b) Restauraciones presentes (experiencia pasada de caries)	Si			
c) Placa visible sobre los dientes y/o la encía sangra fácilmente		Si		
d) Visualmente inadecuado flujo de saliva		Si		
e) Nueva remineralización desde el último examen (lista de los dientes):				
Riesgo de caries global del niño:	ALTO	MODERADO	BAJO	

CONSENTIMIENTO INFORMADO

A quien corresponda:

Yo _____ declaro libre y voluntariamente, que **ACEPTO** que mi hijo(a)

_____ de _____ años de edad, PARTICIPE en el estudio **“PRODUCCIÓN DE AMONIACO POR ACTIVIDAD DE UREASA Y ARGININA DEIMINASA EN BIOFILM DENTAL, EN NIÑOS ASOCIADO A CARIES”**

Estoy consciente de que los procedimientos, pruebas y tratamientos para lograr los objetivos mencionados, consistirán en:

Determinación de Riesgo a Caries, aplicándose un formato validado, que ayudará a determinar la predisposición que tiene mi hijo(a) a desarrollar caries.

Recolección de placa dentobacteriana. La placa dentobacteriana, es un conjunto de bacterias que se adhieren al diente a través del tiempo, que si no existe adecuada higiene, es un factor que origina caries.

Es de mi consentimiento que seré libre de retirar a mi hijo de la presente investigación en el momento que yo así lo desee. También que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de la participación de mi hijo(a) en este estudio. En caso de que decidiera retirarme, la atención que mi hijo como paciente recibiera en esta institución no se verá afectada.

Nombre padre/madre: _____

Firma del padre/madre: _____

Dirección: _____ Fecha: _____

Firma del investigador

Firma de testigo