



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

**MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE PH SALIVAL CON EL USO DE
DENTÍFRICOS CON ARGININA EN NIÑOS PREESCOLARES**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO

MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN PEDIATRÍA

PRESENTA

Jade Yolanda Sánchez Sánchez
Matricula: 222450012

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. Cristian Dionisio Román Méndez
ID. 100392244

DIRECTOR METODOLÓGICO 2

M. D. P. Abigail Martínez Guerrero
ID. 100528238

DIRECTOR DISCIPLINARIO

E. P. Nila Claudia Gil Orduña
ID. 100202788

Junio 2024



BUAP

Oficio No. FESIEP/CIFE/062/2024

C. Jade Yolanda Sánchez Sánchez
Estudiante de la Maestría en Estomatología
Con opción en Terminal en Pediatría
Matrícula No.: 222450012
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la que suscribe MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; para comunicarle una noticia importante en relación con su proceso académico.

Con agrado, le informo que la Secretaría de Posgrado ha otorgado la aprobación para la impresión de su Tesis Titulada:

“Modificación de los niveles de pH salival con el uso de dentífricos con arginina en niños preescolares”

Esta tesis está inscrita en el libro de registros No. 09, página 01, con el No. de asignación 2024234, en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica. Usted presentará esta tesis para realizar su examen profesional y así obtener el grado de Maestría en Estomatología.

La aprobación de la impresión de su tesis represente un hito significativo en su trayectoria académica y profesional. Es el reflejo de su arduo trabajo, dedicación y la profundidad de su investigación en el campo de la Estomatología.

Le insto a que proceda con los pasos necesarios para la impresión y presentación de Tesis, cumpliendo con todas las normativas y plazos establecidos por la Facultad. Esto incluye la revisión final de su documento, asegurándose de que desempeñe todos los requisitos académicos y formatos establecidos, así como la coordinación con la Secretaría para la programación de su examen profesional.

Para cualquier consulta, aclaración o información adicional, le invito a contactar directamente a este Posgrado, estamos aquí para asistirle en cada paso restante de su proceso académico.

Sin otro particular, le reitero mi más atenta y distinguida consideración y le deseo éxito en la etapa final de esta carrera académica.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a viernes 14 de junio del 2024

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología

* Nota: Se anexa Formato de Impresión de Tesis – C. Jade Yolanda Sánchez Sánchez - Maestría en Estomatología con opción en Terminal en Pediatría – S.I.E.P. – Facultad de Estomatología - B.U.A.P. (origina) - p.s.c.y a.

*C.c.p. Archivo

*MCO. FJMA/MEP. GNRCQ/yaneth

Secretaría de Investigación y
Estudios de Posgrado
Facultad de
Estomatología

31 poniente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22*22 29 55 00
Ext. 5526



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

Para obtener el Grado de: **Maestra en Estomatología con opción terminal en Pediatría**

No. Registro CIFE: 2024234 **Fecha de Registro ante CIFE:** lunes 22 de enero del 2024.

Título de la Tesis: "Modificación de los niveles de pH salival con el uso de dentífricos con arginina en niños preescolares".

Nombre del alumno: Jade Yolanda Sánchez Sánchez.

Matrícula: 222450012.

Domicilio: Calle Xicohtencatl 21 Santa María Acuitlapilco 90110 Tlaxcala, Tlaxcala.

Tel: 77*12 27 65 93.

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 03 de enero del 2022.

Firma: _____.

Director de Tesis: DC. Cristian Dionisio Román Méndez.

Grado académico: Doctor en ciencias químico-biológicas

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100392244.

Tel: 22*21 83 83 36.

Firma: _____.

Director Disciplinario: EEP. Nila Claudia Gil Orduña.

Grado académico: Especialidad en estomatología pediátrica.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100202788.

Tel: 22*22 12 67 11.

Firma: _____.

Director Metodológico: MDP. Abigail Martínez Guerrero. **Grado académico:** Maestría en desarrollo pedagógico.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100528238.

Tel: 22*24 55 33 87.

Firma: _____.

Lector: MO. Estela del Carmen Velasco León.

Grado académico: Maestría en ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100225455

Tel: 22*23 23 48 42.

Firma: _____.

Nombre y firma de aprobación del responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Pediatría.

EEP. Nila Claudia Gil Orduña

Firma: _____

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

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana



Fecha actual: jueves 13 de junio del 2024.

Sello _____



BUAP

Constancia No. FESIEP/CIFE/005/2024

DC. Cristian Dionisio Román Méndez
Responsable del Proyecto de Investigación
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo la que suscribe MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y tras un detenido análisis y evaluación en el Proyecto de Investigación (Colectivo):

Nombre del Título del Proyecto:

“Modificación de los niveles de pH salival con el uso de dentífricos con arginina en niños preescolares”.

Presentado por:

No.	Cargos	Nombres	ID y/o Matrícula
1	Responsable del Proyecto de Investigación:	DC. Cristian Dionisio Román Méndez	100392244
2	Directora Metodológica:	MEP. Abigail Martínez Guerrero	100528238
3	Directora Disciplinaria:	EEP. Nila Claudia Gil Orduña	100202788
4	Asesora Externa:	Dra. Marcela Montes Villarreal Universidad Autónoma de Nuevo León	S/N
5	Estudiante de Maestría en Estomatología: Terminal en Pediatría	C. Jade Yolanda Sánchez Sánchez	222450012

HAGO CONSTAR, que, ha sido oficialmente ACEPTADO. Este relevante proyecto, ha sido registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.), inscrito en el libro de registros No. 09, página 01, bajo el No. de asignación 2024234, en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica.

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a lunes 22 de enero del 2024

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*C.c.p. Archivo

*MCO. FJMA/MEP. GNRCQ/Yaneth

Secretaría de Investigación y
Estudios de Posgrado
Facultad de
Estomatología

31 poniente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22*22 29 55 00
Ext. 5526

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar presente en cada pensamiento, palabra y acción, por darme las fuerzas, sabiduría e impulso para realizar este proyecto a pesar de las adversidades.

A mis padres, abuelos y hermanas, por siempre apoyar mis nuevas metas y estar día a día por estos dos años, siendo pacientes y dando su eterno amor.

A mi director de tesis y equipo de asesores, por guiarme, enseñarme y corregirme, por brindar su tiempo, conocimiento y paciencia. Este proyecto no sería lo que es sin ustedes.

A mis amigos y maestros del posgrado de pediatría, a quien ahora llamo familia, sin quienes estos dos años no hubieran sido los mismos. Por su alegría y motivación que me inspiran a ser mejor.

ÍNDICE

INDICE DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES GENERALES	12
1. Caries	12
1.1 Proceso de desmineralización - remineralización.....	12
2. Biofilm.....	14
3. Bacterias productoras de amonio	15
4. Saliva.....	16
4.1 pH salival	17
5. Arginina.....	18
5.1 Acción de la Arginina	19
6. Urea	21
6.1 Acción de la Urea	22
7. Riesgo a caries.....	22
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	33
Objetivo general	33
Objetivos específicos	33
MATERIAL Y MÉTODOS	34
Diseño de estudio:.....	34
Población y muestra	34
Selección de la muestra	34
Criterios de selección.....	34
Criterios de inclusión:.....	34
Criterios de exclusión:	34

Criterios de eliminación:.....	35
VARIABLES.....	36
CONCORDANCIA Y FIABILIDAD	37
UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO	38
LOGÍSTICA	38
Recursos humanos	38
Recursos materiales	38
Recursos financieros.....	39
BIOÉTICA	40
PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN.....	41
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIÓN.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS.....	67
Anexo 1.....	67

INDICE DE ABREVIATURAS

ADS Arginina deiminasa

ADS+ Arginina deiminasa positivas

ANOVA Análisis de varianza bidireccional

Arg Arginina

ATP Adenosín trifosfato

CFD Dentífricos comerciales para niños

EDS dispersión de energía

EFU Captación de fluoruro del esmalte

F Fluoruro

FTIR Espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier

H+ Hidrogeno

ICP-EOS Espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente

IEPS Polisacáridos extracelulares insolubles

NaF Fluoruro de sodio

NH₃ Amoniaco

PAF Fluoruros potencialmente disponibles

SMF Fluoruro de monofluorofosfato de sodio

SMF+Arg Arginina y monofluorofosfato de sodio

TAD Difusión de ácido de Taves modificado

INTRODUCCIÓN

La caries es una enfermedad dinámica mediada por biofilm, modulada por la dieta, de naturaleza multifactorial. Al inicio del proceso de caries, ocurren cambios en el ambiente del biofilm dental, que lleva a un desbalance donde el pH se vuelve ácido y favorece una población de alta cariogenicidad que resulta en una desmineralización, la causa de la pérdida mineral de los tejidos duros.

La saliva tiene un efecto amortiguador, que ayuda a regular el pH, a través de sistemas como el de Arginina Deiminasa (ADS) que produce amonio generando álcali en el medio bucal. El amonio actúa como aceptor de iones de hidrógeno, lo que ayuda a mantener un pH ambiental neutro en el biofilm dental.

La arginina es un aminoácido que en biofilms supragingivales es metabolizado en amoníaco, dióxido de carbón y adenosín trifosfato (ATP) por bacterias arginolíticas. En estudios anteriores se ha demostrado que la arginina puede tener un papel importante en la neutralización de ácidos y de este modo disminuir una población bucal de microorganismos de alta cariogenicidad evitando el desarrollo de lesiones de caries. Actualmente, en México, existen en el mercado dentífricos que contienen diferentes porcentajes de arginina, además de contener flúor; asegurando su acción remineralizante, antibacteriana y desensibilizante.

Este estudio tuvo el propósito de determinar si el incremento de arginina en el medio bucal a través de un dentífrico comercial con arginina al 1.5% aumenta el porcentaje de bacterias arginolíticas y el amonio en boca, de esta forma neutralizando el pH; manteniéndolo estable o volviéndolo más neutro. Lo que se puede relacionar con

una disminución del riesgo a caries a largo plazo al realizar uso de un dentífrico con mayores beneficios para los pacientes que se presentan a consulta.

Palabras clave: pH salival, dentífricos, arginina, urea, niños, preescolares.

ANTECEDENTES GENERALES

1. Caries

Caries dental es una enfermedad dinámica mediada por el biofilm, modulada por la dieta y no transmisible, que da por resultado la pérdida de minerales de los tejidos duros del diente. Hoy en día, se considera una enfermedad multifactorial, en la que se ven involucrados la dieta alta en carbohidratos, especies de bacterias acidogénicas y acidúricas, la susceptibilidad del paciente, factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. (1)(2)(3) Actualmente se considera un problema de salud pública al tener una alta prevalencia en el mundo. (4)

En su desarrollo, se observa que existe un cambio en el ambiente del biofilm dental, el que es favorecido por el acceso frecuente y constante a una dieta con alto consumo de carbohidratos (1) y azúcares rápidamente fermentables. (5) Este desbalance lleva a una población de microorganismo con baja cariogenicidad a una población de alta cariogenicidad y por consiguiente a una alta producción de ácidos orgánicos; conocido como disbiosis polimicrobial. Como resultado, inicia la pérdida mineral, presentándose de manera clínica como una mancha blanca (6)(7). Este es un proceso en el que el calcio y el fosfato se disuelven lejos de los cristales de hidroxiapatita dentro del esmalte. (8)

1.1 Proceso de desmineralización - remineralización

Los patógenos cariogénicos que prevalecen en la matriz extracelular del biofilm dental producen un microambiente altamente ácido. Este microambiente favorece el desarrollo de un entorno progresivamente acidógeno y acidófilo para la

microbiota, lo que a su vez favorece una mayor acidificación del biofilm.(7) Esta interacción da como resultado una desmineralización, que se define como la pérdida de mineral y disolución de la estructura en el diente, debido a la presencia de ácidos(3). En la caries dental, este proceso es mediado por el biofilm y ocurre cuando el pH es menor a 5.5. (7)

El desarrollo de lesiones de caries se puede detener o revertir cuando se elimina el medio ácido y la saliva saturada devuelve los minerales de calcio, fosfato y fluoruro a la superficie del esmalte, reparando la estructura de hidroxiapatita. (9) A este proceso, llamado remineralización, se le define como la ganancia neta de mineral en un tejido previamente desmineralizado, que depende directamente de la presencia de estos iones en la saliva.(10) La palabra remineralización puede ser confundida ya que no implica que la lesión haya recuperado su contenido mineral original(2), solo puede reemplazar minerales en un esmalte y dentina parcialmente desmineralizados o crear una precipitación mineral amorfa en los espacios intercristalinos.(11)

El tratamiento de la caries dental consiste en equilibrar los procesos de desmineralización y remineralización, así como en controlar los factores de riesgo y las dietas ricas en hidratos de carbono. Se indica cepillar los dientes para evitar la acumulación de biofilm dental, utilizar dentífricos y otros productos bucales que contengan fluoruro, de esta manera exponiéndolo a los tejidos duros del diente.(9)

La remineralización puede ocurrir de manera natural o ser inducida por terapias. Entre las terapias disponibles se encuentra el fluoruro, el cual tiene un alto nivel de evidencia científica. (11) Se ha evidenciado que el fluoruro, uno de los mejores

agentes cariostáticos, impide la desmineralización en condiciones ácidas, reduce la pérdida de minerales en el diente y aumenta la remineralización en condiciones neutras, lo que se traduce en una disminución de la pérdida de minerales.(5) De manera natural, los iones de calcio libres en el medio bucal sobresaturan la saliva y favorecen la remineralización, a pesar de la carga negativa de los cristales de hidroxiapatita desmineralizados.(9)

2. Biofilm

El biofilm oral es importante tanto para el estado de salud como para el de enfermedad. El cambio de la simbiosis a la disbiosis del biofilm es introductorio al estado patológico de las enfermedades crónicas mediadas por el biofilm, como la caries dental.(12) El biofilm supragingival comprende comunidades microbianas de múltiples especies con una organización estructural compleja y sofisticada, con actividades metabólicas y funcionales. (8)

La sacarosa es uno de los carbohidratos dietéticos cariogénicos más importantes, debido a que tiene la capacidad de cambiar la estructura tridimensional del biofilm dental, haciendo a este más poroso y mejora la adherencia a la superficie dental. (4) Las bacterias del biofilm dental descomponen la sacarosa para producir ácido orgánico, que contribuye a la acidificación del ambiente. Debido al bajo pH, las bacterias beneficiosas para la salud bucodental se ven desplazadas y las bacterias acidófilas y acidúricas se ven favorecidas para prosperar y dominar.(6)

Como diversos estudios han demostrado que el riesgo de desarrollar caries está asociado con la habilidad de ciertos microorganismos de producir ácidos a partir de

carbohidratos fermentables que provienen del tipo de dieta, la homeostasis del biofilm puede ser una alternativa efectiva para el control de lesiones, producción de ácidos e inhibir la desmineralización dental. (3)

3. Bacterias productoras de amonio

Las bacterias son los principales constituyentes de los microorganismos presentes en la cavidad bucal y tienen un rol en la patogénesis y desarrollo de enfermedades bucales(3). Entre las especies de bacterias acidogénicas-acidúricas, el *Streptococcus mutans* es reconocido como una variable importante del proceso de caries; por ejemplo, en caries de la primera infancia, lesiones de caries en el esmalte, lesiones cavitadas y lesiones en dentina, al igual que en pacientes libres de caries.(6) Se encuentra involucrado en los cambios de la estructura del biofilm dental al inducir polisacáridos extracelulares insolubles (IEPS) que se sintetizan exclusivamente en presencia de sacarosa por la actividad enzimática de las glucosiltransferasas.(5)(7) Otras bacterias relevantes en el proceso de caries son, *Bifidobacterium spp*, *Scardovia wiggsiae*, *Lactobacillus fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. plantarum* y el grupo de *L. casei-paracasei*, entre otros. (1)(4)

Al contrario de *S. mutans* en caries, *Streptococcus sanguinis* es considerado una bacteria comensal modelo asociada con el establecimiento de biofilms dentales sanos y como un comensal arginolítico, capaz de mantener un pH alcalino dentro del microambiente bucal mediante la producción de amoníaco (NH_3) a partir de urea o arginina, utilizando el sistema arginina deiminasa activado por valores de pH

ambientales ligeramente ácidos que incrementa el pH celular y el pH del biofilm oral.(6)(13)(14) El sistema arginina deiminasa está altamente activo en *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus sanguinis*, pero ausente en *Streptococcus* del tipo *mutans*.(15)

El establecimiento temprano en las superficies dentales de cepas arginólíticas con altas capacidades para competir con *S. mutans* en biofilms orales puede ser un potente elemento disuasorio para el inicio de lesiones de caries. (14) Evidencia previa sostiene que la protección contra caries podría ser lograda al incrementar la capacidad de las comunidades microbianas de neutralizar el pH del biofilm.(8)

4. Saliva

Saliva es una solución supersaturada de calcio y fosfato, la fuente de estos iones es el proceso dinámico de precipitación y disolución de la hidroxiapatita de calcio, que es el componente inorgánico esencial de los tejidos duros del diente(10).

La superficie dental está en constante contacto con saliva y tiene superficies topográficas distintas e irregulares, lo que promueve sitios de retención que a su vez crean sitios de formación de biofilms.(3). En un equilibrio dinámico, la sobresaturación de la saliva es una barrera contra la desmineralización y un requisito previo para el proceso de remineralización(10).

Las diferentes proteínas salivales que se encuentran en la saliva, como las mucinas, las estaterinas, las proteínas ricas en prolina, las inmunoglobulinas y las fosfoproteínas, pueden fijar el calcio e impedir que las sales de calcio precipiten en la saliva. Otros componentes tienen la capacidad de elevar el pH de la biopelícula,

uno de estos compuestos es la sialina, un tetrapéptido con arginina que se encuentra en la saliva parotídea.

La capacidad de la saliva para eliminar y neutralizar los ácidos del biofilm, así como el metabolismo de los sustratos salivales, son mecanismos fisiológicos que pueden evitar la acidificación del medio. La hidrólisis de urea por enzimas ureasas y el metabolismo de arginina a través del sistema de la arginina deiminasa son los dos procesos principales para producir álcali y de esta forma neutralizar el pH del ambiente. (16)(17) La saliva contiene de 2 a 6 mmol/L de amonio, que se produce debido a estos dos procesos.(10)

En estudios *in vitro* se ha identificado al aminoácido L-arginina como el principal componente responsable del efecto de aumento del pH en la saliva. (18)

4.1 pH salival

El pH es una medida de acidez o alcalinidad. En saliva, el pH de 7 es definido como neutral. Los rangos de pH salival en niños van de 6.2 a 7.4, este es un valor de categoría individual, condicionado hereditariamente, inalterable y dependiente de las secreciones salivales(10).

Cuando las condiciones termodinámicas se vuelven desfavorables a medida que desciende el pH del entorno bucal, provoca la desmineralización. Cuando las condiciones termodinámicas se vuelven favorables y provocan una precipitación de hidroxapatita de calcio, da lugar a la remineralización, causando que el nivel de pH de la boca se establezca o vuelva a la normalidad.(10)

Un valor de pH alto en saliva reduce significativamente la acidez en la superficie dental, lo que reduce la liberación de iones hidrogeno (H^+) de la superficie del esmalte y disminuye la aparición de nuevas lesiones de caries. Se ha comprobado que los pacientes con bajo riesgo a caries presentan valores de pH salival más altos, por lo que el pH se considera un parámetro crítico en la evaluación del riesgo a caries(10).

5. Arginina

Arginina o L-arginina es un aminoácido semiesencial secretada por la saliva en concentraciones micromolares ($50 \mu\text{mol/L}$)(19) mediante la renovación de proteínas y la síntesis de arginina de novo a partir de citrulina(18)(15). También se encuentra disponible en dietas proteicas y utilizado como suplemento dietético. (3,16)

La molécula de arginina es bipolar, lo que significa que tiene carga tanto positiva como negativa. Su carga positiva es importante tomando en cuenta que la superficie del diente está cargada de forma negativa. Opuestos se atraen. (20)

En biofilms supragingivales, la arginina es metabolizada en amoníaco, dióxido de carbón y adenosín trifosfato (ATP) a través del sistema arginina-deiminasa(5,16) por bacterias arginolíticas como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus australis*, *streptococcus cristatus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus* y *Actynomyces* ssp. (14) En estudios *in vivo*, alta actividad del sistema arginina deiminasa es reportado en placa de individuos libres de caries, en comparación con aquellos con caries activa. (15)(21)(22)

El amoníaco ejerce un efecto amortiguador actuando como aceptor de iones de hidrógeno, lo que ayuda a mantener un pH ambiental neutro en el biofilm.(5)(3) El metabolismo de la arginina produce amoníaco, que eleva el pH de la saliva y es un mecanismo de defensa utilizado por las bacterias bucales para evitar que las bacterias acidogénicas liberen protones. Este pH ambiental relativamente neutro favorece la supervivencia de las bacterias ADS-positivas (ADS+) a la vez que previene los procesos de desmineralización y el desarrollo de lesiones de caries en el esmalte.(16)

La expresión del gen ADS es normalmente inducible por la arginina y sensible a la inhibición de los catabolitos de carbohidratos, según estudios que emplean cepas de laboratorio de estreptococos, pero también se ve potenciada por el pH bajo y los entornos anaeróbicos. La actividad ADS en biofilms orales y la salud dental tienen una asociación favorable, según los hallazgos clínicos y de laboratorio.(14)

5.1 Acción de la Arginina

La presencia y la calidad de la matriz extracelular del biofilm dental puede influir en la adhesión y la colonización bacteriana durante la maduración y el desarrollo de la formación de biofilms debido a las interacciones específicas de los microorganismos, así como a la vitalidad de las bacterias y la rugosidad de la superficie del biofilm.

El glucano es uno de los componentes de la matriz extracelular y es un factor de virulencia que proporciona estabilidad, permitiendo que las células se organicen en un ecosistema multicelular cohesivo, modulando el crecimiento y proporcionando

protección a los patógenos. La arginina reduce la rugosidad y las fuerzas de adhesión del biofilm debido a la baja producción de glucano. (3)(23)

Hoy en día, existe tecnología diseñada para administrar arginina para la producción de amoníaco por parte de las bacterias del biofilm; se incorporó a pastas dentales (16) para suprimir la pérdida mineral a través de un efecto amortiguador (buffer) (5) y puede ayudar a controlar la caries dental. (3)

La combinación de arginina con fluoruro de sodio presenta un efecto sinérgico frente a *S. mutans* al disminuir la proporción *S. mutans*/*S. sanguinis* hacia un consorcio predominante de *S. sanguinis* y neutralizando la acidificación del biofilm. Este mecanismo impide la selección de *S. mutans* y favorece la hegemonía de especies productoras de álcali como *S. sanguinis*(3)(24)(23). La incorporación del 2% de arginina en pastas dentales fluoradas comercialmente disponibles incrementaron significativamente sus propiedades remineralizantes, como se demostró al incrementar la ganancia de minerales, el porcentaje de remineralización y la captación de fluoruro en el esmalte.(24) En México, existen presentaciones de dentífricos que dentro de sus ingredientes incluyen arginina. Estos pertenecen a la casa comercial Palmolive®; entre ellas Colgate Sensitive Pro Alivio con arginina al 8%, Colgate Máxima Protección Anticaries con arginina al 1.5% y Colgate Total 12® con arginina al 1.5%.(25)

Aunque los mecanismos de acción entre arginina y fluoruro son diferentes, estos se complementan y/o tienen un efecto sinérgico. El metabolismo de la arginina afecta de manera positiva la homeostasis del pH, la ecología bacteriana y su

patogenicidad, mientras que el fluoruro mejora la resistencia mineral del diente en pH bajo y reduce la producción de ácido por el biofilm oral supragingival. (8)

Nuevos enfoques han sido diseñados para incrementar el efecto existente de las terapias con fluoruro en lugar de reemplazarlas, pero aquellas que no involucren fluoruro pueden ser una alternativa para aquellos pacientes que se rehúsan a su uso.(11) Una estrategia ideal para el control de caries dental debería suprimir las bacterias cariogénicas, reducir la matriz extracelular, y proteger la superficie del diente de ataques ácidos.(7)

6. Urea

La urea forma parte del sistema buffer de la saliva y participa en la neutralización del ácido en la cavidad bucal. Es una sustancia nitrogenada orgánica(26) presente en la sangre y la saliva como una sustancia orgánica que se sintetiza a partir de aminoácidos y dióxido de carbono. Su concentración en saliva es de aproximadamente 4mmol/l. La urea es una de las principales fuentes de álcalis en la boca y las concentraciones en las secreciones de todas las glándulas salivales oscilan entre 3 y 10 mM en individuos sanos. (27)(26)

Streptococcus Salivarius tiene la capacidad de hidrolizar la urea en amoníaco y de esta forma amortiguar el subproducto ácido del consumo de glucosa, es el principal microorganismo bucal ureolítico. *Actinomyces naeslundii* y *haemophili* también tienen acción ureolítica. (28)

6.1 Acción de la Urea

A través de la ureolisis, tiene una doble función: inhibe la multiplicación y el metabolismo de las bacterias e influye indirectamente en la neutralización del ácido en la cavidad bucal.

La literatura recientemente ha mostrado que la actividad de ureasa en biofilm dental de pacientes sin caries es tres veces más alta comparada con aquellos pacientes con caries activa.(27) Según Kleinberg (1967), la urea es el único sustrato nitrogenado que puede producir álcali lo suficientemente rápido como para amortiguar los ácidos salivales y contribuir así a un aumento del pH.(26)

7. Riesgo a caries

Se define como “proceso clínico de establecer la probabilidad de un paciente a desarrollar lesiones de caries en un cierto periodo de tiempo o la posibilidad de que haya un cambio en el tamaño o actividad de las lesiones ya presentes”.(29) La evaluación del nivel de riesgo a futuras incidencias de lesiones de caries dental es importante como el primer paso para el manejo de estas. El riesgo a caries determina de manera personalizada el enfoque de manejo que se le dará a cada paciente(30) formulando un plan de tratamiento individualizado que tiene como objetivo enfocarse en los factores de riesgo biológicos, ambientales y sociales. (31)

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Bijle *et al.* en el 2018, examinaron de manera *in vitro* el potencial remineralizante de tres concentraciones de arginina (Arg) en pastas con 1100 ppm de fluoruro de sodio (NaF) en muestras de esmalte donde se indujeron lesiones de caries de manera artificial. Cincuenta muestras de esmalte asignadas a cinco grupos (n=10) fueron sometidos un ciclo de pH de 10 días para tratar las muestras según el grupo, [1]: 2 % Arg – NaF, [2]: 4 % Arg – NaF, [3]: 8 % Arg – NaF, [4]: NaF y [5]: agua desionizada. Las soluciones de prueba se sometieron a medición de pH, estimación de fluoruro, análisis de elemento Na-Cl usando análisis de espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-EOS) y espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR). La densidad mineral de las muestras se evaluó mediante micro-CT; mientras que la relación Ca/P y la concentración de fluoruro en las muestras se determinaron mediante espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS) y la captación de fluoruro del esmalte (EFU) mediante el método de grabado ácido. La ganancia mineral media ($0,40 \pm 0,07$ g/cm³) y el porcentaje de remineralización ($27,91 \pm 4,66$ %) del grupo de Arg-NaF al 2 % fueron significativamente superiores a los de los otros 4 grupos ($p < 0,001$). La EFU del grupo Arg-NaF al 2% ($6,84 \pm 1,59$ µg/cm²) fue mayor que la del grupo NaF ($5,22 \pm 1,88$ µg/cm²) ($p < 0,001$). Demostrando así, que la incorporación de 2% de arginina en pastas fluoradas incrementan significativamente la remineralización en lesiones de caries en esmalte cuando se compara con una pasta solo con fluoruro. (24)

Bijle *et al.* en el 2019 realizaron un estudio *in vitro* donde investigaron el efecto antibacteriano de arginina (Arg) en pastas fluoradas (NaF). Cultivos de tres

especies, *S. mutans*, *S. sanguis* y *S. gordonii* fueron tratadas y separadas en 5 grupos: Grupo 1 2% Arg – dentífrico NaF, Grupo 2 4% Arg – dentífrico NaF, Grupo 3 8% Arg – dentífrico NaF, Grupo 4 dentífrico NaF y Grupo 5 agua desionizada. Para el biofilm de *S. mutans*, la proporción de bacterias vivas/muertas fue significativamente menor en el grupo de Arg-NaF al 2 % que en los otros grupos ($p < 0,05$). El biofilm de *S. sanguis* tratadas con 2 % de Arg-NaF y agua desionizada presentaron una relación vivo/muerto significativamente mayor en comparación con 4 % de Arg-NaF, 8 % de Arg-NaF y NaF ($p < 0,05$). Concluyeron que las pastas fluoradas con 2% de arginina promueve el efecto antimicrobiano contra bacterias cariogénicas y mantienen una mejor homeostasis ecológica mediante la regulación positiva de los estreptococos no mutans. (13)

Berto *et al.* en el 2019 evaluaron los efectos, in vitro, de la arginina (Arg) como aditivo en pasta dental sobre los estreptococos orales con y sin sistema arginina deiminasa (ADS) y biopelículas cariogénicas. Se cultivaron suspensiones de *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* y *S. sanguinis* y *S. gordonii* ADS positivo (ADS+) con y sin L-arginina al 1.5% durante 24 h. A partir de esto, se formaron biopelículas que constaban de las cuatro especies sobre superficies de poliestireno con y sin L-arginina al 1.5% durante un máximo de 10 días. Finalmente, las biopelículas que se formaron en las superficies del esmalte se expusieron a una limpieza mecánica diaria con una pasta de dientes que contenía arginina y monofluorofosfato de sodio (SMF+Arg), una pasta de dientes que contenía fluoruro de monofluorofosfato de sodio (SMF) y un control negativo durante un máximo de 10 semanas. En diferentes tiempos de incubación, se determinó el pH en los medios de cultivo, la producción

de citrulina y el porcentaje de bacterias ADS+ dentro de las biopelículas. En los resultados obtenidos se mostró que la presencia de 1.5% de arginina, *S. sanguinis* y *S. gordonii* tenían un alto nivel de producción de citrulina después de 6 horas de incubación comparado con *S. mutans* y *S. sobrinus*. Después de 1, 2 y 4 días de formación de biopelículas, el porcentaje de especies ADS+ en las biopelículas fue mayor para el grupo con suplementos de arginina en comparación con el grupo de control ($p < 0.05$). Por lo tanto, la adición de arginina incrementa el pH y el porcentaje de especies ADS+, con limpieza mecánica intermitente de las superficies. (15)

Nascimento *et al.* en el 2019 investigaron el perfil metabólico de la placa supragingival en respuesta al uso de pastas dentales con arginina (Arg: 1.5 % de arginina, sin fluoruro) o con fluoruro (F: 1100 ppm F/NaF) en un estudio de cohorte, doble ciego, aleatorizado. Ochenta y tres adultos con diferentes estados de caries fueron reclutados y asignados al tratamiento con Arg o F durante 12 semanas. Las lesiones de caries se diagnosticaron usando el Sistema Internacional de Evaluación y Detección de Caries II, y se recolectaron muestras de placa de superficies dentales cariadas y libres de caries. De las 509 lesiones activas diagnosticadas al inicio del estudio, 70 (14%) estaban inactivas después de 12 semanas. El modelo lineal generalizado mostró que las lesiones del esmalte tenían significativamente más probabilidades de volverse inactivas en comparación con las lesiones de la dentina ($P < 0,0001$). La presencia de arginina aumentó significativamente la actividad ADS de la placa ($P = 0,031$) y los valores de pH de la placa después de la incubación con glucosa ($P = 0,001$). Análisis de componentes principales reveló que Arg afectó significativamente las concentraciones de 16 metabolitos, incluidos

fenetilamina, agmatina y glucosamina-6-fosfato ($P < 0,05$). El presente estudio concluyó que el aumento de la actividad de ADS en la placa impacta favorablemente en los perfiles de pH, reduciendo el riesgo de progresión de caries y que los mecanismos de acción de arginina y fluoruro son complementarios y/o sinérgicos.

(8)

Cabral Oliveira *et al.* en el 2019 realizaron un estudio *in vitro* donde evaluaron el incremento de microdureza por un dentífrico que contiene fluoruro y arginina en comparación con un control (solo fluoruro) y un control negativo (sin fluoruro) en superficies sanas y desmineralizadas de esmalte bovino. Las muestras fueron asignados aleatoriamente a diferentes tratamientos que incluían ciclos diarios de pH y cepillado tres veces al día con uno de los siguientes dentífricos ($n = 8$): Neutraçucar (arginina y fluoruro), Colgate Total 12 (fluoruro) y My First Colgate (sin fluoruro). La microdureza se midió al inicio del estudio y después de una, dos y cinco semanas de tratamiento utilizando un indentador Knoop. El análisis estadístico involucró análisis de varianza bidireccional (ANOVA) y la prueba de Tukey. Después de cinco semanas, tanto la pasta Total 12 como Neutraçucar habían aumentado la microdureza de las muestras ($p < 0,05$). Por lo tanto, los resultados demostraron que los dentífricos a base de arginina aumentan la microdureza de las superficies sanas y desmineralizadas del esmalte.(9)

Bijle *et al.* en el 2020 examinaron las concentraciones de fluoruro en dentífricos comerciales para niños (CFD) e investigaron el efecto de la incorporación de arginina (Arg) en CFD sobre la biodisponibilidad del fluoruro. Se examinaron cinco CFD comerciales para determinar las concentraciones de fluoruro. Los fluoruros

totales, solubles totales e insolubles en CFD se determinaron mediante el método de difusión de ácido de Taves modificado (TAD). F iónico y monofluorofosfato se estimaron por método directo modificado con técnica de adición estándar. L-arginina (L-Arg)/monoclorhidrato de L-arginina (L-Arg.HCl) se incorporaron al 2 % p/p en los CFD comerciales. Se determinaron el pH de las pastas dentífricas, la capacidad amortiguadora del Arg agregado, los fluoruros potencialmente disponibles (PAF) y el PAF de 1 min por TAD. Los resultados demostraron que los CFD tenían de 4 a 32% de fluoruros insolubles. La adición de L-Arg/L-Arg.HCl mejoró significativamente la biodisponibilidad del fluoruro en los CFD ($p < 0,05$) y la incorporación de L-Arg aumentó significativamente el pH de las pastas dentífricas ($p < 0,05$). Concluyendo así que los dentífricos comerciales para niños con solo fluoruro tienen altas concentraciones de fluoruro biodisponibles, mientras que la incorporación de arginina al 2% mejora la biodisponibilidad de fluoruro en dentífricos. (32)

Kumar *et al.* en el 2021 evaluaron la actividad ureolítica en saliva y biofilm dental en niños con caries y libres de caries de una institución para ciegos. 52 niños fueron divididos en dos grupos; grupo A con caries y grupo B sin caries. En saliva, el grupo sin caries tuvo niveles medios de ureasa más altos de $1,82 \pm 0,497$ en comparación con el grupo con caries activa que tuvo niveles medios de ureasa de $0,445 \pm 0,304$. En biofilm, el grupo con caries activa tuvo niveles medios de ureasa más bajos de $0,877 \pm 0,942$ en comparación con el grupo libre de caries que tuvo niveles medios de ureasa de $1,570 \pm 0,918$. La actividad de ureasa específica fue significativamente mayor en individuos con tasas bajas de caries. En conclusión, los niños sin caries

tuvieron una mayor actividad de generación de amoníaco mediante ureasa tanto en muestras de saliva como de placa que los niños con baja actividad de caries.(33)

Vaziriamjad *et al.* en el 2022 investigaron el efecto de la L-arginina sobre el crecimiento, la formación de biopelículas y la susceptibilidad antibiótica en *Streptococcus mutans*. La concentración estándar (0,5 McFarland) de suspensión bacteriana se inoculó con precisión en el medio TSB y luego se dividió en 2 grupos, grupo control y el grupo tratado. La formación de biopelículas se evaluó por el método de la placa de microtitulación. La prueba de susceptibilidad al antibiograma se realizó mediante el método de difusión en disco en agar Müller-Hinton. Las bacterias proliferaron más rápido después de 2 h de exposición a 100 μM de arginina, alcanzando el mayor nivel después de 12 h, que es sustancialmente diferente del grupo de control ($P>0,05$). La formación de biofilms bacterianos, a concentraciones de 50 y 100 μM de arginina, se redujo significativamente en comparación con el grupo de control ($P<0,05$). Los autores concluyeron que recomiendan la optimización de la concentración de L-arginina y su uso como terapia adyuvante o en combinación con otros medios para prevenir la caries. (34)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al presente, la caries es una enfermedad con alta prevalencia en la población infantil a nivel mundial, lo que continúa siendo un reto para la odontología pediátrica y que la motiva a implementar diferentes medios de prevención e intervención según los alcances, tanto del odontólogo como del paciente. Ahora es más aceptado por los padres y/o tutores llevar a cabo un cambio de hábitos en casa que mejoren la salud bucal de sus hijos.

La caries es una enfermedad a raíz de un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, como resultado de un desequilibrio del medio bucal. Diferentes factores pueden incrementar el riesgo a caries de los niños preescolares; como defectos de la estructura del diente, bajo flujo salival, un ambiente oral ácido, exposición frecuente a hidratos de carbono y azúcar en la dieta, baja exposición al fluoruro y falta de conocimiento por parte de los padres y/o tutores. A través de la exposición constante a la arginina por medio de un dentífrico comercial y a un aumento de la población de bacterias productoras de amonio, como resultado del sistema arginina deiminasa y la hidrólisis de urea, se pretende estabilizar la microbiota oral y causar un aumento, mantenimiento y neutralización del pH salival que evite el desarrollo de lesiones de caries, y por consiguiente, disminuir el riesgo a caries de los pacientes a futuro. Por lo que nuestro propósito es investigar nuevas alternativas que permitan mejorar la salud bucal, enfocándose en una alternativa sencilla y preventiva.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe modificación de los niveles de pH salival con el uso de dentífricos con arginina en niños preescolares?

JUSTIFICACIÓN

La producción de amonio a través del sistema arginina deiminasa juega un rol importante en la alcalinización del medio bucal, lo que se cree a largo plazo poder disminuir el riesgo a caries de los pacientes. Considerando los diferentes factores que pueden incrementar este riesgo en los niños de edad preescolar, como la ausencia de higiene, la falta de capacidad motora, la deficiencia de atención por parte de los padres, entre otras; al incorporar la arginina por medio de un dentífrico comercial en la rutina de higiene en casa, se pretende incrementar su concentración en boca y modificar un ambiente ácido a un ambiente neutro con un pH salival aumentado. El uso de dentífricos con arginina dentro de sus componentes puede implementarse como un medio preventivo fácil, sencillo y de cierta manera económico que los odontólogos pediatras pueden indicar en casos que cumplan con los criterios de un alto riesgo a caries.

Actualmente, no existen estudios *in vivo* donde se evalúe el nivel de pH, a mediano plazo, al realizar el uso de un dentífrico con arginina al 1.5% en pacientes pediátricos. El presente estudio busca demostrar que el incremento de uso de arginina en la higiene bucal puede mejorar el medio para mantener una baja incidencia de caries en los niños preescolares.

HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación (HI):

Existe modificación de los niveles de pH salival con el uso de dentífricos con arginina en niños preescolares

Hipótesis nula (HO):

No existe modificación de los niveles de pH salival con el uso de dentífricos con arginina en niños preescolares

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la modificación de los niveles de pH salival con el uso de un dentífrico con arginina en niños preescolares.

Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones de amonio en el biofilm dental que puede neutralizar la acidez en niños preescolares.
- Cuantificar la diferencia del pH inicial con el posterior al uso del dentífrico con arginina.
- Cuantificar la diferencia de la concentración de amonio en el biofilm inicial con el posterior al uso del dentífrico con arginina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de estudio:

Ensayo clínico controlado, analítico, longitudinal, prospectivo y homodémico.

Población y muestra

Universo de estudio: Preescolares que cursan el tercer año en el “Círculo infantil BUAP”

Unidades de estudio: Secreción salival no estimulada y biofilm de niños que cumplen con los criterios de selección.

Selección de la muestra

No probabilístico por conveniencia, de acuerdo con los criterios de inclusión. Por secuencia.

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

Niños cuyos padres firmaron el consentimiento informado.

Todos los niños en edad preescolar que cursen el tercer año en el “Círculo infantil BUAP”

Niños de cualquier género.

Niños sistémicamente sanos.

Niños libres de caries.

Criterios de exclusión:

Niños que cursan con enfermedad viral el día de la toma de muestras de primera vez, al mes y al segundo mes.

Niños que presentan una discapacidad y no permiten su cooperación para realizar cepillado dental.

Niños que presentan una discapacidad y no permiten su cooperación para realizar la toma de muestra.

Niños con presencia de aparatología ortodóncica.

Criterios de eliminación:

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

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

Niños que no regresan a citas de revaloración y toma de muestra al primer y segundo mes.

VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escalas y categorías
PH SALIVAL	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa.	0 a 14 pH >7 alcalino pH=7 neutro pH <7 ácido	Cuantitativa Continua Dependiente
AMONIO POR ADS	Cantidad de amoniaco producido por vías enzimáticas de la arginina deiminasa.	Micromoles (mM) de amonio por gramo (mM/g) de placa	Cuantitativa Continua Dependiente
ARGININA	Aminoácido semiesencial secretado por la saliva en concentraciones micromolares.	Colgate total 12 con 1.5% de arginina	Cuantitativa Continua Independiente
BIOFILM DENTAL	Conjunto de microorganismos que se rodean de una compleja matriz biopolimérica, compuesta principalmente por proteínas, polisacáridos y material genético.	Gramo (g)	Cuantitativa Continua Independiente
EDAD	Tiempo transcurrido en años que han pasado desde el nacimiento de una persona.	Edad en años cumplidos; durante la toma de la muestra.	Cuantitativa Continua Independiente

CONCORDANCIA Y FIABILIDAD

Para comprobar la consistencia y la confiabilidad de las diferentes medidas realizadas en momentos diferentes e independientes de la realización de las dos curvas de amonio, se realizó la prueba estadística coeficiente de correlación intraclase, obteniendo un resultado de 0.97 y 0.99.

El espectrofotómetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech) utilizado para leer la absorbancia de amonio de las diferentes muestras fue previamente calibrado con una muestra blanco (sin presencia de amonio).

El potenciómetro para la lectura de pH salival fue previamente calibrado con una solución buffer a un pH de 7.01, incluida por el mismo fabricante.

UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO

Círculo infantil BUAP

Laboratorio de microbiología FEBUAP

LOGÍSTICA

Recursos humanos

Un tesista: Jade Yolanda Sánchez Sánchez

Director Disciplinario: Dra. Nila Claudia Gil Orduña

Directores Metodológicos: Dr. Cristian Dionisio Román Mendez

Dra. Abigail Martínez Guerrero

Recursos materiales

Tubos Eppendorf

Tubos de ensayo

Gradillas.

Cucharillas Hu-friedy

Coleman - Micropipeta

Puntas de micropipetas

Refrigerador

Ultracongelador (-80°C).

Sonificador

Centrífuga refrigerada

Reactivo Nessler

Espectrofotómetro

Cubetas de vidrio de 1.5 ml para espectrofotómetro.

potenciómetro

Recursos financieros

Recursos proporcionados por la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado y recursos propios

BIOÉTICA

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

Como lo menciona la NOM012SSA32012, se establecen los criterios normativos de carácter administrativo, ético y metodológico para solicitar la autorización de protocolos con fines de investigación, para el empleo en seres humanos de una pasta dental de la cual no se tiene suficiente evidencia de su eficacia terapéutica y seguimiento de dicho protocolo.

De acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre el manejo de RPBI, el biofilm dental que se obtendrá, 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.

PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN

En la presente investigación se acudió al “Círculo infantil BUAP” donde los niños del tercer año de preescolar fueron seleccionados, para ello:

1. Se presentó una plática a los padres sobre el tema de investigación, las ventajas del estudio, la técnica de cepillado con apoyo de un vídeo y se les dieron indicaciones sobre el uso del dentífrico:
 - a. El cepillado debía ser realizado por los padres.
 - a. Se debía realizar el cepillado todos los días antes de ingresar al Círculo Infantil BUAP y posterior a su salida.
 - b. La dosis del dentífrico debía ser del tamaño de un “chícharo”.
 - c. El niño preescolar no debía hacer enjuague con agua posterior al cepillado.
2. Firma de consentimiento por parte de los padres y/o tutores.
3. Los 42 alumnos fueron divididos de manera aleatoria en dos grupos, aquellos a los que se les proporcionó pasta dental con flúor con 1450 ppm (Oral B) y a aquellos que se les proporcionó pasta dental con flúor 1450 ppm + arginina 1.5% (Colgate total 12).
4. Entrega de los dentífricos con flúor 1450 ppm (Oral B) y flúor 1450 ppm + arginina 1.5% (Colgate total 12). Se les informa a los padres que los participantes debían abstenerse del cepillado dental al menos 12 horas antes de las tomas de muestra.
5. En la revisión inicial se tomaron muestras de la siguiente forma: Las muestras de biofilm dental fueron recolectadas con barreras de protección y una

cucharilla estéril de todas las superficies vestibulares de los órganos dentarios de los preescolares (Fig. 1) y fueron transportadas en 500 μ l de fosfato dipotásico (K_2HPO_4 10 mM pH 7) dentro de tubos Eppendorf estériles (Fig. 2) en una hielera a 4°C, para su posterior almacenamiento en ultracongelador a -80° hasta su procesamiento. También se recolectó muestras de saliva no estimulada, con ayuda de un embudo estéril (Fig. 3) y tubo Eppendorf para su posterior traslado y almacenamiento, de la misma manera que el biofilm.

Previa asignación de letra y número para su identificación y almacenamiento correcto. A continuación, se les pidió a los participantes iniciar con el uso del dentífrico asignado.

6. A los 15 días se tomó la primera muestra posterior al uso del dentífrico, nuevamente de biofilm dental y saliva no estimulada.
7. Al mes, segunda muestra de biofilm dental y saliva no estimulada.
8. Por último, a los dos meses, toma de muestra de biofilm dental y saliva no estimulada.



Fig. 1 Recolección de biofilm de las superficies vestibulares con cucharilla estéril.



Fig. 2 Tubo eppendorf con 500 μ l K_2HPO_4 .



Fig. 3 Embudo estéril para recolección de saliva total.

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO:

Curva de calibración de amonio

Previo a la determinación de los valores de amonio de las muestras de biofilm dental y saliva total, se realizó una curva de calibración de amonio. Esta curva se realizó a través del método de Nessler(35). De acuerdo con los resultados obtenidos se hicieron dos curvas, una para biofilm con concentraciones de amonio que va de 0.5 mM a 2 mM y otra para saliva que va de 2.5 mM a 20 mM, debido a que las muestras de biofilm presentaban valores menores al mínimo realizado para las muestras de saliva. A partir de estas concentraciones conocidas de amonio, se mezcla el sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con 100 μl de reactivo de Nessler (KI 5%, HgCl 2,5%,KOH 16%) y agua destilada para obtener un total de 1000 μl .

Posterior a la preparación, se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech)(Fig. 4) a una longitud de onda de 395 nm, calibrada previamente con una solución blanco, libre de amonio. Con los datos obtenidos de 5 pruebas independientes se realizó una regresión lineal y se obtuvo una curva estándar de la concentración de



Fig. 4 Espectrofotómetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech)

amonio versus la absorbancia (Tabla 1 y 2). En esta curva se extrapolaron los valores de longitud de onda del amoniaco formado por la actividad de ADS y ureasa de las muestras de saliva y biofilm dental tomadas en los pacientes preescolares para obtener la concentración en mM/g.

Tabla 1. Curva de calibración de amonio para biofilm

Concentración de amonio	Absorbancia (395 nm)*
0.5 mM	0.1344
1 mM	0.1854
1.5 mM	0.2458
2 mM	0.3306
*Cada una de las longitudes de onda corresponde al promedio de 5 lecturas independientes.	

$$y = 0.1545x + 0.0247$$

$$R^2 = 0.9703$$

Tabla 2. Curva de calibración de amonio para saliva

Concentración de amonio	Absorbancia (395 nm)*
2.5 mM	0.45
7.5 mM	0.8696
15 mM	1.572
20 mM	2.1258
*Cada una de las longitudes de onda corresponde al promedio de 5 lecturas independientes.	

$$y = 0.1012x + 0.0928$$

$$R^2 = 0.9927$$

Procesamiento de muestras de biofilm dental

Las muestras fueron sacadas del ultracongelador una hora antes de iniciar el procesamiento dejando atemperarse a temperatura ambiente. El biofilm se disgregó en sonicador (Sonic, Vibracell™) a una amplitud de 70 ciclos/segundo, se realizaron dos ciclos de 30 segundos cada uno colocando la muestra sobre hielo (4°C) durante este proceso. Posteriormente se centrifugaron muestras a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de 10 mM de Tris Maleato (pH 7). Finalmente, se suspendió el precipitado en 500 µl de 10 mM de Tris Maleato (pH 7). (22)

Producción de amonio a partir de arginina deiminasa y ureasa

Para determinar la actividad de las enzimas arginina deiminasa y de ureasa, de cada una de las muestras de biofilm se tomaron 25 μ l, se agregaron 20 μ l de Tris maleato (pH 6), 25 μ l del sustrato ya sea L-Arginina 1M o Urea 1M y 480 μ l de agua destilada estéril para obtener un volumen final de 500 μ l. Dichas soluciones se prepararon en tubos de ensayo estériles y se cerraron tubos con tapones de silicón estériles para su posterior incubación a 37°C por 90 minutos.

Se incluye un testigo negativo que consiste en agua destilada estéril con Tris maleato (pH 6) y un testigo positivo de cepas de *Streptococcus salivarius* aislado de saliva, el cual es arginina positivo y urea positivo. De cada muestra se realizaron tres eventos independientes para obtener un promedio de los resultados obtenidos.

Posterior al periodo de incubación, se detuvo la producción enzimática colocando las muestras sobre hielo por 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 minutos para usar sobrenadante. Se realizó determinación de amonio de la siguiente manera: se agregó 25 μ l de la reacción enzimática de la placa en 875 μ l de agua destilada, mas 100 μ l de reactivo de Nessler para un volumen final de 1000 μ l. Se leyó la absorbancia a longitud de onda a 395 nm en el espectrofotómetro. Los resultados obtenidos de los 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) se expresó la actividad específica enzimática como mM/g de placa.

Procesamiento y determinación de amonio en saliva

Se descongelaron las muestras una hora antes de iniciar su procesamiento a temperatura ambiente. Se realizó toma de pH con un potenciómetro (HANNA®)(Fig. 5)

Para determinar la producción de amonio en saliva se realiza el mismo proceso realizado para determinar la producción de amonio por enzimas arginina deiminasa y ureasa (25 μ l de saliva total, 875 μ l de agua destilada y 100 μ l de reactivo Nessler).

Se leyó la absorbancia a longitud de onda a 395 nm en el espectrofotómetro. Los resultados obtenidos de los 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) se expresó la actividad específica enzimática como mM/ml de saliva.



Fig. 5 potenciómetro HANNA®

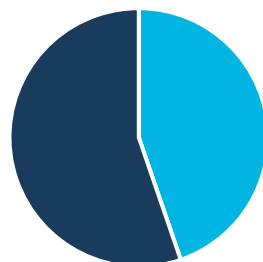
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se guardaron en Office Excel 365 y se vaciaron en el paquete estadístico SPSS v.22. Se utilizó estadística descriptiva. Para variables cualitativas se utilizó porcentajes y gráficos; y para variables cuantitativas se utilizó la media y desviación estándar. Se realizó prueba de normalidad Shapiro-Wilk, comparación de medias Friedman y ANOVA para medidas repetidas, según el caso. Prueba de hipótesis Tukey. Todas con un valor de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

En el estudio participaron 42 niños preescolares, de los cuales 4 fueron eliminados por no presentarse a la toma de muestras posterior a la toma inicial. De los 38 participantes restantes, 17 pertenecieron al sexo masculino y 21 al sexo femenino (Tabla 3), con una media de edad de 5.3 (Tabla 4).

Tabla 3. Sexo		
	Frecuencia	Porcentaje
Masculino	17	44.7%
Femenino	21	55.3%
Total	38	100%



■ Masculino ■ Femenino

Tabla 4. Edad				
	Frecuencia	Porcentaje	Media	Desviación estándar
5 años	25	65.8%	5.34	.481
6 años	13	34.2%		
Total	38	100%		

Para verificar si existe significancia en la producción de amonio y por consiguiente una neutralización del pH salival, se realizó prueba de Shapiro Wilk, considerando que los casos son menores a 50, para saber la normalidad de los datos. En las pruebas de normalidad de las concentraciones de amonio producido en biofilm por arginina deiminasa, ureasa y en saliva son menores a 0.05, por lo que no tienen distribución normal, 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). Al ser un estudio longitudinal con más de dos mediciones, se realizó la prueba no paramétrica de Friedman (Tabla 5, 6, 7).

Tabla 5. Resumen producción de amonio en biofilm por arginina deiminasa			
	Media	Desviación estándar	p valor
Toma inicial	1.874 mM/mg	2.621	0.044
15 días	0.187 mM/mg	0.312	
1 mes	0.090 mM/mg	0.216	
2 meses	0.020 mM/mg	0.205	
p=Friedman			

Tabla 6. Resumen producción de amonio en biofilm por ureasa			
	Media	Desviación estándar	p valor
Toma inicial	2.181 mM/mg	2.796	0.013
15 días	0.970 mM/mg	1.680	
1 mes	0.885 mM/mg	1.012	
2 meses	0.323 mM/mg	0.840	
p=Friedman			

Tabla 7. Resumen producción de amonio en saliva			
	Media	Desviación estándar	p valor
Toma inicial	11.248 mM/ml	2.427	0.001
15 días	12.157 mM/ml	1.826	
1 mes	12.077 mM/ml	1.963	
2 meses	10.530 mM/ml	1.740	
p=Friedman			

La significancia asintótica es menor a 0.05 por lo que con un 95% de confianza se descarta la hipótesis nula ya que existe una diferencia significativa entre los grupos dependientes. Concluye que no todas las medianas de población son iguales.

Para saber dónde se encontraban las diferencias significativas de las pruebas de producción de amonio en biofilm y saliva, tanto en el grupo control como en el experimental, se realizó la prueba de Tukey con una significancia de 0.05.

Tabla 8. Producción de amonio por arginina deiminasa en niños que usaron pasta con arginina:

(I) Factor	(J) Factor	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
INICAL	15 DIAS	621,510288*	199,3301637	.014	95,25815054	1147,762425
	1 MES	633,309684*	195,8182772	.010	116,3292889	1150,290080
	2 MESES	653,593040*	195,8182772	.008	136,6126444	1170,573436
15 DIAS	INICAL	-621,510288*	199,3301637	.014	-1147,76243	-95,2581505
	1 MES	11,79939663	207,4107305	1.000	-535,786268	559,3850614
	2 MESES	32,08275215	207,4107305	.999	-515,502913	579,6684169
1 MES	INICAL	-633,309684*	195,8182772	.010	-1150,29008	-116,329289
	15 DIAS	-11,7993966	207,4107305	1.000	-559,385061	535,7862681
	2 MESES	20,28335552	204,0379735	1.000	-518,397884	558,9645949
2 MESES	INICAL	-653,593040*	195,8182772	.008	-1170,57344	-136,612644
	15 DIAS	-32,0827522	207,4107305	.999	-579,668417	515,5029126
	1 MES	-20,2833555	204,0379735	1.000	-558,964595	518,3978839

En el grupo experimental, se encontró que hay diferencia significativa en aquellos pacientes que utilizaron pasta con arginina, al comparar la toma inicial con la producción de amonio por arginina deiminasa (mM/g) a los 15 días, al mes y a los dos meses ($p < 0.05$). Mostrando que la producción de amonio se mantuvo de forma constante durante el periodo de seguimiento (Tabla 8).

Tabla 9. Produccion de amonio por arginina deiminasa en niños que usaron pasta con solo flúor:

(I) Factor	(J) Factor	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
INICAL	15 DIAS	174.1175556	75.5852058	.108	-25.264023	373.499134
	1 MES	185.8355556	72.0676660	.058	-4.267321	375.938432
	2 MESES	205.4353595 ^a	73.1198044	.032	12.557112	398.313607
15 DIAS	INICAL	-174.1175556	75.5852058	.108	-373.499134	25.264023
	1 MES	11.7180000	75.5852058	.999	-187.663579	211.099579
	2 MESES	31.3178039	76.5890374	.977	-170.711721	233.347329
1 MES	INICAL	-185.8355556	72.0676660	.058	-375.938432	4.267321
	15 DIAS	-11.7180000	75.5852058	.999	-211.099579	187.663579
	2 MESES	19.5998039	73.1198044	.993	-173.278444	212.478052
2 MESES	INICAL	-205.4353595 ^a	73.1198044	.032	-398.313607	-12.557112
	15 DIAS	-31.3178039	76.5890374	.977	-233.347329	170.711721
	1 MES	-19.5998039	73.1198044	.993	-212.478052	173.278444

En los pacientes del grupo control que usaron pasta con solo flúor únicamente se observo diferencia significativa de la producción de amonio por arginina deiminasa (mM/g) al comparar la toma inicial con la muestra al mes y al segundo mes ($p=0.058$ y $p=0.032$) (Tabla 9).

Tabla 10. Producción de amonio por ureasa en niños que usaron pasta con arginina:

(I) Factor	(J) Factor	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
INICAL	15 DIAS	284.2611755	284.8528442	.751	-467.779636	1036.301987
	1 MES	475.5160288	279.8341815	.333	-263.274997	1214.307054
	2 MESES	590.6729203	279.8341815	.161	-148.118105	1329.463946
15 DIAS	INICAL	-284.2611755	284.8528442	.751	-1036.301987	467.779636
	1 MES	191.2548533	296.4003811	.917	-591.272644	973.782350
	2 MESES	306.4117447	296.4003811	.730	-476.115752	1088.939242
1 MES	INICAL	-475.5160288	279.8341815	.333	-1214.307054	263.274997
	15 DIAS	-191.2548533	296.4003811	.917	-973.782350	591.272644
	2 MESES	115.1568915	291.5805415	.979	-654.645733	884.959516
2 MESES	INICAL	-590.6729203	279.8341815	.161	-1329.463946	148.118105
	15 DIAS	-306.4117447	296.4003811	.730	-1088.939242	476.115752
	1 MES	-115.1568915	291.5805415	.979	-884.959516	654.645733

Tabla 11. producción de amonio por ureasa en niños que usaron pasta solo con flúor:

(I) Factor	(J) Factor	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
INICAL	15 DIAS	98.3301573	122.0019131	.851	-223.491207	420.151522
	1 MES	-53.5755246	113.9300527	.965	-354.104624	246.953574
	2 MESES	200.8788985	115.6379752	.313	-104.155424	505.913221
15 DIAS	INICAL	-98.3301573	122.0019131	.851	-420.151522	223.491207
	1 MES	-151.9056819	123.4312730	.610	-477.497467	173.686103
	2 MESES	102.5487412	125.0094538	.845	-227.206030	432.303513
1 MES	INICAL	53.5755246	113.9300527	.965	-246.953574	354.104624
	15 DIAS	151.9056819	123.4312730	.610	-173.686103	477.497467
	2 MESES	254.4544231	117.1450112	.142	-54.555218	563.464064
2 MESES	INICAL	-200.8788985	115.6379752	.313	-505.913221	104.155424
	15 DIAS	-102.5487412	125.0094538	.845	-432.303513	227.206030
	1 MES	-254.4544231	117.1450112	.142	-563.464064	54.555218

En los resultados del grupo experimental de aquellos niños que usaron pasta con arginina, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) sobre la producción de amonio por ureasa durante el periodo de seguimiento. Al igual que en el grupo control de niños que solo usaron pasta con flúor, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (Tabla 10 y 11).

Tabla 12. Producción de amonio en saliva de niños que usaron pasta con arginina:

(I) factor	(J) factor	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Inicial	15 días	-.73392	.75260	.764	-2.7290	1.2611
	1 mes	-1.13906	.75260	.437	-3.1341	.8560
	2 meses	.57558	.76831	.877	-1.4611	2.6123
15 días	Inicial	.73392	.75260	.764	-1.2611	2.7290
	1 mes	-.40514	.78818	.955	-2.4945	1.6842
	2 meses	1.30951	.80319	.371	-.8197	3.4387
1 mes	Inicial	1.13906	.75260	.437	-.8560	3.1341
	15 días	.40514	.78818	.955	-1.6842	2.4945
	2 meses	1.71464	.80319	.155	-.4145	3.8438
2 meses	Inicial	-.57558	.76831	.877	-2.6123	1.4611
	15 días	-1.30951	.80319	.371	-3.4387	.8197
	1 mes	-1.71464	.80319	.155	-3.8438	.4145

Tanto en el grupo experimental como control de la producción de amonio en saliva (mM/ml), no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los tres tiempos de medición ($p > 0.05$). (Tabla 12 y 13).

Tabla 13. Producción de amonio en saliva de niños que usaron pasta con solo flúor:

(I) factor	(J) factor	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Inicial	15 días	-1.30712	.79218	.359	-3.4025	.7883
	1 mes	-.71110	.74892	.778	-2.6921	1.2699
	2 meses	.59510	.74892	.857	-1.3859	2.5761
15 días	Inicial	1.30712	.79218	.359	-.7883	3.4025
	1 mes	.59602	.80284	.880	-1.5276	2.7196
	2 meses	1.90222	.80284	.095	-.2214	4.0258
1 mes	Inicial	.71110	.74892	.778	-1.2699	2.6921
	15 días	-.59602	.80284	.880	-2.7196	1.5276
	2 meses	1.30620	.76018	.324	-.7046	3.3170
2 meses	Inicial	-.59510	.74892	.857	-2.5761	1.3859
	15 días	-1.90222	.80284	.095	-4.0258	.2214
	1 mes	-1.30620	.76018	.324	-3.3170	.7046

En la prueba de normalidad Shapiro Wilk del pH salival, el resultado es mayor a 0.05, por lo que los datos tienen distribución normal. Al ser un estudio longitudinal con más de dos mediciones, se realizó ANOVA para medidas repetidas con una significancia de 0.05.

Tabla 14. pH salival en niños que usaron pasta con arginina

	Media	Desviación estándar
ph	7.3811	.24907
ph	7.5722	.31586
ph	7.6033	.44077
ph	7.5867	.27717

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. ^a	95% de intervalo de confianza para diferencia ^a	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-.191	.130	1.000	-.645	.262
	3	-.222	.124	.666	-.654	.209
	4	-.206	.101	.455	-.556	.145
2	1	.191	.130	1.000	-.262	.645
	3	-.031	.120	1.000	-.447	.385
	4	-.014	.091	1.000	-.330	.302
3	1	.222	.124	.666	-.209	.654
	2	.031	.120	1.000	-.385	.447
	4	.017	.125	1.000	-.416	.450
4	1	.206	.101	.455	-.145	.556
	2	.014	.091	1.000	-.302	.330
	3	-.017	.125	1.000	-.450	.416

Tabla 15. pH salival en niños que usaron pasta con solo flúor

	Media	Desviación estándar
ph	7.6075	.51667
ph	7.6525	.31941
ph	7.7575	.31238
ph	7.7183	.26666

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. ^a	95% de intervalo de confianza para diferencia ^a	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-.045	.184	1.000	-.634	.544
	3	-.150	.120	1.000	-.535	.235
	4	-.111	.130	1.000	-.529	.308
2	1	.045	.184	1.000	-.544	.634
	3	-.105	.127	1.000	-.512	.302
	4	-.066	.128	1.000	-.475	.344
3	1	.150	.120	1.000	-.235	.535
	2	.105	.127	1.000	-.302	.512
	4	.039	.067	1.000	-.177	.255
4	1	.111	.130	1.000	-.308	.529
	2	.066	.128	1.000	-.344	.475
	3	-.039	.067	1.000	-.255	.177

La significancia es mayor a 0.05 por lo que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tres tiempos de medición. Con una confianza del 95% se acepta la hipótesis nula, no existe evidencia estadística de que los niveles de pH

salival en las tres medidas de tiempo sean diferentes, por lo tanto, se concluye que se mantiene un medio bucal neutro en ambos grupos.

DISCUSIÓN

La saliva juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis bucal debido a sus componentes orgánicos e inorgánicos que son responsables de las diferentes funciones que esta presenta, como su capacidad buffer, actividad antimicrobiana, digestiva, lubricante, formación de película adquirida, procesos de remineralización, etc. Conociendo las características funcionales de la saliva, así como sus componentes, es posible evaluar la sensibilidad a la caries dental y a su vez diseñar nuevas estrategias para prevenirla.

Estudios realizados que se enfocan en los procesos de caries, a partir de estrategias que estimulan bacterias que generan moléculas con actividad neutralizante de pH ácido, como es el amonio, han obtenido resultados favorables. Estos estudios están principalmente centrados en arginina deiminasa y ureasa, los cuales se encargan de neutralizar el ácido por bacterias acidogénicas y como consecuencia mantener pH cercanos a la neutralidad, reduciendo el riesgo a caries.

El presente estudio se enfocó en la producción de amonio a través de arginina deiminasa en una población infantil sin caries, y el comportamiento del pH a lo largo de dos meses al incorporar a sus hábitos de higiene dental una pasta con flúor (1450 ppm) + arginina al 1.5%.

Nascimento y cols. realizaron un estudio donde su objetivo era investigar el perfil metabólico del biofilm supragingival en respuesta al uso de pastas dentales con arginina (1.5%) o fluoruro (1100 ppm) por 12 semanas. 83 adultos, con un rango de edad de 18 a 65 años y con diferentes estatus de caries, fueron reclutados para su

estudio. La actividad de ADS en biofilm fue medida mediante el monitoreo de formación de citrulina utilizando un protocolo estandarizado por el mismo autor en 2019, mientras que el pH fue registrado antes y después del periodo de incubación de la muestra. La actividad de ADS en pacientes libres de caries fue significativamente mayor que en aquellos con caries ($P < 0.0001$), al igual que incrementó su actividad desde el inicio del estudio hasta las 12 semanas ($p = 0.031$). También observaron que incrementó significativamente la actividad de ADS en los participantes que usaron arginina en comparación contra aquellos que usaron solo fluoruro ($p = 0.022$) y encontraron valores más altos de pH en participantes que usaron arginina en comparación con solo fluoruro ($p = 0.028$).⁽³⁶⁾ Estos resultados fueron similares a los obtenidos en la presente investigación, donde los niños libres de caries tuvieron un aumento en la actividad enzimática de ADS con diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.044$). A pesar de que en este estudio el monitoreo fue a través de la producción de amonio, la actividad de ADS también incrementó desde la toma inicial hasta los dos meses que duró el estudio ($p < 0.05$). Podemos diferir que en el presente estudio no existió una diferencia significativa del cambio de pH ($p > 0.05$) entre los grupos que usaron arginina o fluoruro debido a que nuestros participantes eran libres de caries y presentaban un pH neutro desde el comienzo del estudio.

Koopman JE y cols. realizaron un estudio con el objetivo de mejorar el conocimiento sobre el efecto de la arginina en el ecosistema bucal y sobre su potencial prebiótico. Incluyeron 9 voluntarios sanos sin caries que realizaron cepillado dental por dos semanas con pasta fluorada, cuatro semanas con pasta con arginina al 8% y

nuevamente pasta fluorada. Se tomaron muestras de saliva estimulada en las que midieron la producción de amonio por espectrofotometría y observaron que la producción de amonio en saliva solo incrementó durante el periodo de uso de la pasta con arginina al 8% ($p=0.0005$).⁽³⁷⁾ A diferencia de estos resultados, en nuestro estudio a pesar de observarse un ligero incremento de producción de amonio en saliva, a lo largo de dos meses en niños que usaron pasta con arginina al 1.5%, no era estadísticamente significativo ($p>0.05$), lo que demuestra que la producción de amonio en saliva se mantuvo estable a lo largo del estudio debido a las condiciones favorables que propiciaba una buena técnica de cepillado, la actividad enzimática de arginina deiminasa y otras bacterias con actividad neutralizante. Se debe destacar que en el estudio de esta investigación la arginina se encontraba a un porcentaje menor (1.5%) que al incluido en el estudio de Koopman JE y cols. (8%) lo que podría explicar las variaciones en los resultados.

En un estudio in situ realizado por Hassan H y cols. compararon el efecto sobre el pH salival y su capacidad buffer en adultos después de un período de seis semanas de uso de pasta con 1.5% de arginina + 1450 ppm de fluoruro o pasta solo con 450 ppm de fluoruro + 1000 ppm de monofluorofosfato de sodio, en un grupo libre de caries y otro con caries. El pH y la capacidad buffer fueron medidos con el kit de tiras reactivas Saliva-Check y encontraron que no había diferencia significativa en la capacidad buffer y el pH entre los grupos, ni antes ni después de realizar el uso de pasta con o sin arginina ($p>0.05$).⁽³⁸⁾ Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, en el que no hay diferencia significativa en pH tanto del grupo experimental como control ($p>0.05$), donde solo se incluyeron

pacientes libres de caries. Es importante tomar en cuenta que en el estudio realizado por Hassan y cols. las pastas utilizadas no tenían los mismos ingredientes, lo que pudo afectar los resultados obtenidos. Sin embargo, en este estudio no se presenta este sesgo y a pesar de ello se obtuvieron los mismos resultados.

En un estudio realizado por Kumar V y cols. donde evaluaron la actividad ureolítica en saliva y biofilm en un grupo libre de caries y otro con caries, de 52 niños con rango de edad de 6 a 12 años, midieron la producción de amonio por ureasa al estimularla con urea al 3% y buffer fosfato con pH de 7.2. En los resultados concluyeron que la actividad de ureasa tanto en biofilm como en saliva era mayor en los niños libres de caries que en aquellos con caries ($p=0.00$ y $p=0.01$).⁽³³⁾ Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestra investigación, donde los niños libres de caries tuvieron una diferencia significativa de producción de amonio en biofilm, en comparación con la producción de amonio en saliva. Cabe mencionar que en la presente investigación se utilizó una pasta con arginina al 1.5%, para estimular a las bacterias productoras de amonio que a su vez favorecieron la producción enzimática de arginina deiminasa a lo largo de 15 días, un mes y dos meses. A diferencia de Kumar y cols. utilizaron urea al 3%.⁽³³⁾

Sampaio C y cols. en 2024 evaluaron el efecto de una pasta con arginina, con o sin fluoruro de sodio (1450 ppm). Para su estudio tomaron muestras de saliva estimulada obtenida de tres adultos de entre 20 y 30 años sin caries activa, se cultivaron biopelículas en bloques de esmalte bovino en medio McBain modificado que contenía sacarosa al 0.2 %, y se dividieron en seis grupos experimentales: control (McBain 0.2 %), 2.5 % arginina; 8 % arginina, fluoruro de sodio (NaF), 2.5 %

arginina con NaF y 8 % arginina con NaF. Se evaluó el pH cada 24 horas con un electrodo durante cinco días. Como resultado observaron que, al adicionarse arginina al segundo día, los valores de pH se elevaron a 8.0 independiente de su concentración y combinación con NaF, y estos valores permanecieron estables hasta el quinto día.(39) En el presente estudio el comportamiento del pH solo fue medido en saliva no estimulada, a comparación del realizado por Sampaio C y cols. donde el medio era controlado y en menor lapso. Si bien, en nuestro estudio, la media de pH más cercana a 8.0 fue en el grupo que usaron pasta con solo flúor al mes y a los dos meses (7.7) esto se puede deber a el compromiso y mejoría de la técnica de cepillado realizada por los padres. En nuestro estudio no sabemos si existió un comportamiento similar al estudio de Sampaio y cols. durante estos primeros cinco días, en el grupo con arginina, pero sí se observa un aumentó al primer mes y se mantuvo estable posteriormente. Este comportamiento no es estadísticamente significativo ($p>0.05$).

CONCLUSIÓN

Los niños que realizaron cepillado dental con arginina al 1.5% tuvieron un mayor incremento de producción de amonio por arginina deiminasa desde el inicio del estudio, a los 15 días, al mes y a los dos meses.

Los niños que realizaron cepillado dental con solo flúor 1450 ppm tuvieron un incremento de producción de amonio al mes y a los dos meses.

Los niños que realizaron cepillado dental con pasta con arginina y pasta con solo flúor no tuvieron producción de amonio por ureasa de manera significativa a lo largo del estudio.

En saliva, la producción de amonio tanto en niños que realizaron el cepillado con arginina como con solo flúor no tuvieron una producción de amonio significativa comparando la toma inicial hasta los dos meses que duró el estudio.

El pH salival se mantuvo neutro tanto en pacientes que realizaron uso de pasta con arginina como pasta con solo flúor a lo largo del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Conrads G, About I. Pathophysiology of dental caries. *Monogr Oral Sci.* 2018;27:1–10.
2. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. Vol. 54, *Caries Research.* S. Karger AG; 2020. p. 7–14.
3. Miranda ML, Silva BNS, Salomão KB, de Oliveira AB, Gabbai-Armelin PR, Brighenti FL. Effect of arginine on microorganisms involved in dental caries: a systematic literature review of in vitro studies. *Biofouling.* 2020 Aug 4;36(6):696–709.
4. Beatriz De la Cruz Campos S, Esp Odontopediatría Egresada C, Albites Achata U. Efectividad de las pastas dentales en la reducción del recuento de *Streptococcus mutans* en niños de 5 años de edad. Vol. 14, *Odontol Pediatr.* 2015.
5. Sanchez AY, de Oliveira CL, Negrini TC, Hashizume LN, Hara AT, Maltz M, et al. In situ effect of arginine-containing dentifrice on plaque composition and on enamel demineralization under distinct cariogenic conditions. *Caries Res.* 2018 Nov 1;52(6):588–97.
6. Lozano CP, Díaz-Garrido N, Kreth J, Giacaman RA. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* Expression of Competition-Related Genes, under Sucrose. *Caries Res.* 2019 Feb 1;53(2):194–203.
7. Jiang W, Luo J, Wang Y, Chen X, Jiang X, Feng Z, et al. The ph-responsive property of antimicrobial peptide gh12 enhances its anticaries effects at acidic pH. *Caries Res.* 2021 Feb 1;55(1):21–31.
8. Nascimento MM, Alvarez AJ, Huang X, Browngardt C, Jenkins R, Sinhoreti MC, et al. Metabolic profile of supragingival plaque exposed to arginine and fluoride. *J Dent Res.* 2019 Oct 1;98(11):1245–52.

9. Cabral Oliveira PH, Cabral Oliveira MR, Cabral Oliveira LH, Sfalcin RA, Pinto MM, Rosa EP, et al. Evaluation of different dentifrice compositions for increasing the hardness of demineralized enamel: An in vitro study. *Dent J (Basel)*. 2019 Mar 1;7(1).
10. Surdilovic D, Ille T. Correlation between the ph value of stimulated and unstimulated saliva and the caries risk in children. Vol. 9, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* www.ejpmr.com | . 2022.
11. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent advances in remineralization therapies for caries lesions. Vol. 29, *Advances in dental research*. 2018. p. 55–9.
12. Bijle MN, Pichika MR, Mak KK, Parolia A, Babar MG, Yiu C, et al. Concentration-dependent multi-potentiality of L-arginine: Antimicrobial effect, hydroxyapatite stability, and mmps inhibition. *Molecules*. 2021 Nov 1;26(21).
13. Bijle MNA, Ekambaram M, Lo ECM, Yiu CKY. The combined antimicrobial effect of arginine and fluoride toothpaste. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
14. Huang X, Browngardt CM, Jiang M, Ahn SJ, Burne RA, Nascimento MM. Diversity in antagonistic interactions between commensal oral streptococci and streptococcus mutans. In: *caries research*. S. Karger AG; 2018. p. 88–101.
15. Berto LA, Lauener A, Carvalho TS, Lussi A, Eick S. In vitro effects of arginine-containing toothpastes on cariogenic biofilms. *Oral Health Prev Dent [Internet]*. 2019 Jun 14;1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31204391>
16. Nascimento M. Potential uses of arginine in dentistry. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):98–103.
17. Thepchuay Y, Mesquita RBR, Nacapricha D, Rangel AOSS. Micro-PAD card for measuring total ammonia nitrogen in saliva. *Anal Bioanal Chem*. 2020 May 1;412(13):3167–76.

18. Nascimento MM, Alvarez AJ, Huang X, Hanway S, Perry S, Luce A, et al. Arginine metabolism in supragingival oral biofilms as a potential predictor of caries risk. *JDR Clin Trans Res*. 2019 Jul 1;4(3):262–70.
19. Zaura E, Twetman S. Critical appraisal of oral pre- and probiotics for caries prevention and care. Vol. 53, *Caries Research*. S. Karger AG; 2019. p. 514–26.
20. Nugent Guignon Anne. Arginine: A magical weapon in the war against oral microbial diseases. *Clinical*. 2019 Mar 19;44–6.
21. Nascimento MM, Browngardt C, Xiaohui X, Klepac-Ceraj V, Paster BJ, Burne RA. The effect of arginine on oral biofilm communities. *Mol Oral Microbiol*. 2014 Feb;29(1):45–54.
22. Nascimento MM, Gordan V V., Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Apr;24(2):89–95.
23. Das A, Patro S, Mohanty A, Miglani S. A broad review on arginine and its application in dentistry. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. 08(2):2021.
24. Bijle MNA, Ekambaram M, Lo EC, Yiu CKY. The combined enamel remineralization potential of arginine and fluoride toothpaste. *J Dent*. 2018 Sep 1;76:75–82.
25. Cabral Oliveira PH, Cabral Oliveira MR, Cabral Oliveira LH, Sfalcin RA, Pinto MM, Rosa EP, et al. Evaluation of different dentifrice compositions for increasing the hardness of demineralized enamel: An in vitro study. *Dent J (Basel)*. 2019 Mar 1;7(1).
26. D'souza LL, Lawande SA, Samuel J, Wiseman Pinto MJ. Effect of salivary urea, pH and ureolytic microflora on dental calculus formation and its correlation with periodontal status. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2023 Jan 1;13(1):8–12.

27. Pavlevska M, Gjorgjievsk E, Jankulovska M, Saveski M, Poposki B. Salivary urea and ph of non-stimulated saliva in correlation with dental caries intensity. *Academic Medical Journal*. 2023;3(3):17–29.
28. Berger V, Green Buzhor M, Evstafeva D, Mügeli L, Leroux JC. 3D printing of a controlled urea delivery device for the prevention of tooth decay. *Int J Pharm*. 2023 Jan 25;631.
29. Chapple ILC, Papapanou PN. A concise guide for clinical application risk assessment in oral health.
30. Featherstone JDB, Alston P, Chaffee BW, Rechmann P. Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA): an update for use in clinical practice for patients aged 6 through adult. *J Calif Dent Assoc*. 2019 Jan 1;47(1):25–34.
31. Featherstone JDB, Crystal YO, Chaffee BW, Zhan L, Ramos-Gomez FJ. An updated CAMBRA caries risk assessment tool for ages 0 to 5 years. *J Calif Dent Assoc*. 2019 Jan 1;47(1):37–47.
32. Bijle MN, Tsoi J, Ekambaram M, Lo ECM, Carey CM, Yiu CKY. Enhanced fluoride bioavailability with incorporation of arginine in child dentifrices. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2020 Nov 12;44(5):332–41.
33. Kumar V, Nanda A, Harish Bhat K, Ashrit P, Babu A, Shakir MK. Urease activity in saliva and plaque as endogenous protection against dental caries in institutionalized blind children. *J Nat Sci Biol Med*. 2021 Jan 1;12(1):109–12.
34. Vaziriamjad S, Solgi M, Kamarehei F, Nouri F, Taheri M. Evaluation of L-arginine supplement on the growth rate, biofilm formation, and antibiotic susceptibility in *Streptococcus mutans*. *Eur J Med Res*. 2022 Dec 1;27(1).
35. Miyares-Estrada M, Torres-Idavoy D, Padrón-Morales S, Valdés-Hernández J, Díaz-Martínez M, Mildrey Bonilla-Hernández R. Aplicación del reactivo de Neesler en la cuantificación de amonio para las fermentaciones de productos biotecnológicos [Internet]. Vol. 24, *VacciMonitor*. 2015. Available from: www.finlay.sld.cu/vaccimonitor.html

36. Nascimento MM, Alvarez AJ, Huang X, Browngardt C, Jenkins R, Sinhoreti MC, et al. Metabolic profile of supragingival plaque exposed to arginine and fluoride. *J Dent Res.* 2019 Oct 1;98(11):1245–52.
37. Koopman JE, Hoogenkamp MA, Buijs MJ, Brandt BW, Keijser BJJ, Crielaard W, et al. Changes in the oral ecosystem induced by the use of 8% arginine toothpaste. *Arch Oral Biol.* 2017 Jan 1;73:79–87.
38. Hassan H, Ghali L, Wildeboer D, Sarwar S, Lingstrom P, Carlen A. Interproximal in situ plaque pH after a sugar challenge in relation to caries in adults before and after short-term use of 1.5% arginine toothpaste. *Int J Dent Oral Health.* 2020;6(4).
39. Sampaio C, Méndez DAC, Buzalaf MAR, Pessan JP, Cruvinel T. Arginine and sodium fluoride affect the microbial composition and reduce biofilm metabolism and enamel mineral loss in an oral microcosm model. *J Dent.* 2024 Jun 1;145.

ANEXOS

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

A quien corresponda:

Yo _____ declaro libre y voluntariamente, que acepto que mi hijo(a) _____, de _____ años, participe en el estudio "Modificación de los niveles de pH salival con el uso de dentífricos con arginina en niños preescolares" para obtener el título de maestría en estomatología con terminal en pediatría.

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

- Recolección de placa dentobacteriana, la cual es un conjunto de bacterias adheridas al diente y se acumulan cuando no existe un correcto cepillado, para obtener un conteo de concentración de amonio.
- Toma de muestra de saliva para determinar el pH salival.

Es de mi consentimiento que seré libre de retirar a mi hijo de la presente investigación en el momento que así lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca del estudio en el que participa mi hijo(a). En caso de mi retiro del estudio, la atención como paciente y obtención de información no será negada.

Nombre padre/madre/tutor:

Firma padre/madre/tutor:

Fecha: _____

Firma del investigador

Firma del testigo