



**UNIVERSIDAD DE TALCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE REHABILITACIÓN BUCO MÁXILO-FACIAL**

**“INFLUENCIA DEL RITMO CIRCADIANO EN LA CARACTERIZACIÓN  
PROTEICA DE LA SALIVA NO ESTIMULADA DE ADULTOS JÓVENES:  
ESTUDIO CLÍNICO”**

*"INFLUENCE OF THE CIRCADIAN RHYTHM ON PROTEIN CHARACTERIZATION OF NON-  
STIMULATED SALIVA, IN YOUNG ADULTS: A CLINICAL STUDY"*

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la Universidad de Talca como parte de los requisitos científicos exigidos para la obtención del título de Cirujano Dentista.

**ESTUDIANTES: MARÍA ANTONIETA ALBORNOZ BRAVO**  
**ALBERT ANDRÉS SOBARZO VERGARA**  
**PROFESOR GUÍA: DR. RODRIGO GIACAMAN SARAH**  
**TM. NATALIA GARCÍA MANRÍQUEZ**

**FONDECYT Regular 1210188**

**TALCA - CHILE**

**2021**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

## INFORMACIONES CIENTÍFICAS

<b>Nombre del profesor guía</b>
Rodrigo Giacaman Sarah
<b>ORCID del profesor guía</b>
<a href="https://orcid.org/0000-0003-3362-5173">https://orcid.org/0000-0003-3362-5173</a>
<b>Google Scholar del profesor guía</b>
<a href="https://scholar.google.com/citations?user=Oa_CitgAAAAJ&amp;hl=nl">https://scholar.google.com/citations?user=Oa_CitgAAAAJ&amp;hl=nl</a>
<b>Correo electrónico del profesor guía</b>
giacaman@utalca.cl
<b>Enlace al archivo SciELO <i>preprints</i></b>

## CERTIFICADOS DE PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

## DEDICATORIA

Al concluir esta etapa de aprendizaje, agradezco a la gente que me rodeo dentro de la carrera y me formo a ser el profesional que soy ahora. A su vez, este logro es dedicado a mis padres, los cuales me han formado como persona, me han apoyado desde que era un niño a alcanzar mis metas, siempre estando a mi lado en todo momento y dándome ánimos para perseguir mis sueños. También quiero dedicarle el poder haber llegado hasta este punto a mi hermana, la cual, a pesar de su condición, ha sabido alegrarme con su sonrisa y darme energías para afrontar los desafíos que he llevado a cabo. También agradezco a mi hermano por siempre estar ahí en los momentos más difíciles de mi vida apoyándome a salir adelante.

*Albert Sobarzo Vergara*

A mis padres y hermana, por nunca soltar mi mano, por ser mis pilares, mi fortaleza e inspiración. Han sido la guía que he necesitado en momentos de dificultad. Cada uno de mis logros son para ustedes. En especial para ti, papá. pues siempre has creído en mí, me has enseñado que puedo lograr todos mis sueños y que no existe obstáculo que no pueda ser superado con esfuerzo y perseverancia. Gracias, por como tú dices: “ser mi sombra”.

No puedo dejar de mencionar a Dios, segura estoy que, sin su ayuda, nada de esto sería posible.

Mamá, sé que te sentirías orgullosa de la mujer en la que me estoy convirtiendo, pues tú, con tanto amor, te encargaste de inculcarme valores sólidos para ser una persona de bien, y por ende una buena profesional.

Gracias infinitas, a cada uno de ustedes.

*M. Antonieta Albornoz*

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer a nuestro docente guía, el Dr. Rodrigo Giacamán Sarah, quien nos ha dado las herramientas necesarias para poder avanzar en nuestra tesis, además de darnos consejos y guiarnos de la mejor manera posible, sin escatimar en el tiempo requerido para llegar a esta instancia. También a Natalia García Manríquez, nuestra co-guía, que, en conjunto con Felipe Muñoz, nos han brindado la orientación para poder lograr los objetivos propuestos y adquirir nuevos aprendizajes más allá de la Odontología, pudiendo obtener conocimientos de otras áreas, las cuales pueden ser de ayuda a futuro.

Este trabajo no sería posible sin la ayuda de nuestro equipo de trabajo en el laboratorio de cariología, los cuales permitieron poder presentar actualmente esta memoria. Esto no sería posible sin el apoyo de los docentes que fueron parte del proyecto y que nos brindaron la ayuda necesaria para llevarlo a cabo.

De igual manera, le agradecemos a cada docente que participó en nuestra formación profesional, pues nos han entregado los saberes necesarios, para crear y devolver sonrisas.

## INDICE

<b>1.RESUMEN</b> .....	1
<b>1.1 Palabras clave:</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>2.1 Keywords</b> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	5
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	5
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	6
<b>5.1. Diseño general</b> .....	6
<b>5.2. Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de la saliva (Estudio de estabilidad)</b> .....	6
<b>5.2.1. Variaciones de pH en intervalos de tiempo reducido</b> .....	7
<b>Inhibidor de proteasas.</b> .....	7
<b>Temperatura y tiempos de almacenamiento.</b> .....	7
<b>5.2.2. Variaciones de pH en tiempos extendidos</b> .....	7
<b>Temperatura y tiempo de almacenamiento.</b> .....	8
<b>5.3. Análisis de ritmo circadiano (Estudio principal)</b> .....	9
<b>Sujetos</b> .....	9
<b>Estandarización de la dieta y la higiene oral, para controlar su efecto sobre el ritmo circadiano.</b> .....	9
<b>Obtención de la saliva en los tiempos establecidos del ritmo circadiano</b> .....	10
<b>Procesamiento de las muestras de saliva</b> .....	10
<b>5.3.1 Determinación de los valores de pH de las muestras de saliva no estimulada</b> .....	12

5.3.2 Concentración de proteínas: .....	12
5.3.3 Electroforesis .....	12
5.4 Análisis estadístico y descriptivo de los datos .....	12
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
6.1 Variabilidad de pH en cortos periodos de tiempo según variables en estudio.....	14
6.1.1 Medición de la variación de pH salival influenciada por Inhibidor de proteasas .....	14
6.1.2 Medición de la variación de pH salival influenciada por temperatura y tiempo .....	14
6.2 Variabilidad de pH salival a largo plazo de acuerdo a temperatura de almacenamiento.....	15
6.2 Influencia del Ritmo Circadiano en las características proteicas cualitativas y cuantitativas en la muestra de saliva total. ....	16
Medición de la variabilidad ejercida por el ritmo circadiano frente al pH salival: .....	16
Medición de la influencia del ritmo circadiano en la Concentración de proteínas en saliva total.....	17
Valoración del efecto del ritmo circadiano en Patrón electroforetico .....	19
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>21</b>
<b>10. Anexos .....</b>	<b>30</b>
Anexo N°1: Consentimiento informado para voluntarios de estudio. ....	30
Anexo N°2: Protocolo de toma de muestra de flujo salival no estimulado .....	38
Anexo N°3: Protocolo de dieta .....	40
Anexo N°4: Precipitación de proteínas con Acido tricloroacético (TCA) .....	44
Anexo N°5: Preparación de geles para Electroforesis.....	46

## 1.RESUMEN

La saliva contiene una pequeña fracción de componentes orgánicos, principalmente una amplia variedad de proteínas. La influencia del ritmo circadiano sobre la secreción de proteínas salivales es poco clara. De ahí que el objetivo del estudio fue determinar la influencia del ritmo circadiano sobre la concentración y el patrón electroforético de las proteínas totales de la saliva no estimulada en personas sanas jóvenes. El proyecto fue dividido en dos estudios: el primero fue un estudio de estabilidad, para determinar las condiciones óptimas para el manejo de saliva, mediante el pH, incluyendo la evaluación de un inhibidor de proteasas (PMSF). El segundo buscaba evaluar el efecto del ritmo circadiano sobre el pH y las características proteicas de la saliva. Se invitó a participar a 11 voluntarios adultos jóvenes, quienes donaron saliva total no estimulada, en 6 intervalos, durante un periodo comprendido entre las 7:00 am y 3:00 am del día siguiente. Para el análisis estadístico se utilizó un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ). Los resultados del estudio de estabilidad mostraron que el pH salival disminuye cuando las muestras son tratadas con PMSF ( $p < 0,05$ ), pero no es afectado por el tiempo o la temperatura. El estudio principal mostró que el ritmo circadiano no induce variaciones estadísticamente significativas en el pH salival, ni en la concentración de proteínas totales de la saliva no estimulada, con ostensibles variaciones individuales entre los distintos participantes. Se observó una tendencia a una disminución de la concentración total de proteínas salivales durante la noche. Al analizar las imágenes de los geles, luego de la electroforesis, se observó una correlación entre la menor concentración total de proteínas salivales en la noche (3:00 am) y los demás horarios. La saliva parece ser un fluido bastante estable en distintas condiciones. La concentración de proteínas de la saliva total no estimulada no parece ser afectada por las variaciones circadianas, al menos en sujetos jóvenes sanos. Futuros estudios debiesen explorar otros grupos etarios y con condiciones sistémicas que puedan ser sujetas a fluctuaciones del ritmo circadiano.

### 1.1 Palabras clave:

Saliva, Proteínas, Péptidos, Ritmo Circadiano, pH, Electroforesis



## 2. ABSTRACT

Saliva contains a small fraction of organic components, mainly a wide variety of proteins. The influence of the circadian rhythm on salivary protein secretion is unclear. Hence, the objective of the study was to determine the influence of the circadian rhythm on the concentration and electrophoretic pattern of total proteins in unstimulated saliva of young healthy adults. The project was divided into two studies: the first was a stability assay, to determine the optimal conditions for saliva management, using pH, including the evaluation of a protease inhibitor (PMSF). The second sought to evaluate the effect of the circadian rhythm on the pH and protein characteristics of saliva. Eleven young adult volunteers were invited to participate, who donated total unstimulated saliva, at 6 intervals, during a period between 7:00 am and 3:00 am of the following day. For the statistical analysis, a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ) was used. The results of the stability study showed that salivary pH decreases when the samples are treated with PMSF ( $p < 0.05$ ), but it is not affected by time or temperature. The main study showed that the circadian rhythm does not induce statistically significant variations in salivary pH, nor in the concentration of total proteins in unstimulated saliva, with wide individual variations among participants. A trend towards a decrease in the total concentration of salivary proteins was observed during the night. When analyzing the electrophoretic patterns in the gels, a correlation was observed between the lower total concentration of salivary proteins at night (3:00 am) and the other hours. Saliva appears to be a stable fluid under various conditions. The protein concentration of unstimulated total saliva does not appear to be affected by circadian variations, at least in young healthy subjects. Future studies should explore other age groups and with systemic conditions that may be subject to fluctuations in the circadian rhythm.

### 1.1 Keywords:

Saliva, Proteins, Peptides, Circadian Rhythm, pH, Electrophoresis

### 3. INTRODUCCIÓN

La caries dental es la enfermedad no transmisible más común del ser humano (1), afectando a un 35% de la población a nivel mundial con lesiones de caries no tratadas, y cuyo porcentaje es aún mayor en Latinoamérica, alcanzando un 45% (2). Es una enfermedad dinámica, multifactorial, mediada por un biofilm disbiótico a causa de una ingesta excesiva de azúcares provocando una alteración en los procesos de desmineralización y remineralización, de los tejidos duros dentales (3). La saliva juega un papel clave en la formación o reversión de las lesiones de caries, siendo definida como una secreción exocrina mucoserosa clara, ligeramente ácida. Es una mezcla compleja de líquidos proveniente de las glándulas salivales mayores, menores y del líquido crevicular gingival que contiene bacterias orales, células descamadas de la mucosa oral y restos de comida (4). Dentro de sus principales funciones destaca la protección y lubricación, dilución, limpieza, capacidad buffer y un importante rol protector sobre el esmalte dental, encargándose del mantenimiento de su integridad físico-química modulando la remineralización y desmineralización (5).

La secreción salival diaria oscila normalmente entre 0,5 a 1,5 litros (6), regulada por los ritmos circadianos, pues las glándulas salivales son controladas rítmicamente por la activación del nervio simpático del núcleo supraquiasmático (SCN), que funciona como el principal oscilador de los ritmos circadianos (7). El núcleo supraquiasmático consiste en núcleos bilaterales dentro del hipotálamo anterior que perciben entrada de luz ambiental a través del tracto retino hipotalámico (RHT) (8). Esta información externa es interpretada y enviada a la epífisis provocando la secreción de melatonina, la cual tiene por función principal transmitir información sobre el ciclo diario de luz y oscuridad a sus células diana (9). Estos ritmos presentan oscilaciones de 24 horas activando una gran cantidad de genes maestros que controlan el tiempo correcto y la sincronización de diversos procesos fisiológicos y metabólicos (10), como la secreción de hormonas Adrenocorticotrófica, Cortisol, Tirotrópina, Foliculoestimulante, Luteinizante, Estradiol y Renina.

La saliva está compuesta por 99% de agua, conteniendo una variedad de electrolitos (sodio, potasio, calcio, cloruro, magnesio, bicarbonato, fosfato) y una gran diversidad de proteínas en su porción orgánica. Dentro de las proteínas se pueden identificar enzimas, inmunoglobulinas y otros factores antimicrobianos, glicoproteínas mucosas, trazas de

albúmina y algunos polipéptidos y oligopéptidos de importancia para la salud bucal (5). Las proteínas son un elemento de interés ya que juegan un rol relevante en la prevención de caries, mediante la acción de glicoproteínas salivales entre las que destacan: las mucinas, glicoproteínas ricas en prolina y las inmunoglobulinas. Además contiene una serie de proteínas salivales menores, tales como Aglutinina, Lactoferrina, Cistatinas, Lisozimas (11), entre otras. Las Mucinas y Glicoproteínas ricas en Prolina (12) protegen al esmalte continuamente contra el desgaste, además participan en la inhibición de la desmineralización de las superficies dentales expuestas. La Estaterina participa de la promoción de la remineralización del esmalte mediante la sobresaturación con respecto a las sales de calcio y fosfato (13). Las Histatinas y Cistatinas tienen acción antimicrobiana, inhibiendo la adherencia de especies cariogénicas a la superficie del esmalte y las aglutininas e inmunoglobulinas provocan la agregación y eliminación de microorganismos de la cavidad oral (14).

Las proteínas de la saliva han capturado la atención de varios grupos de investigación en el mundo durante la última década (15), ya que, para fines diagnóstico, la recolección de saliva tiene la ventaja de ser fácil técnicamente y no invasiva (16). La saliva normalmente se obtiene en cantidades suficientes para realizar análisis, con simples procedimientos de recolección, seguros e indoloros siendo amigables para el paciente (17). Debido a sus cualidades, investigaciones actuales proponen a la saliva como un fluido potencial para el estudio de biomarcadores esenciales presentes en enfermedades orales y sistémicas (18).

Aunque se ha señalado que el ritmo circadiano afecta la secreción de saliva y algunos de sus componentes, como es el caso de la proteína IgA aumentando su secreción durante el día(19) no existen estudios clínicos que evalúen cómo varía la composición de este fluido considerando el periodo diurno y nocturno. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar si el ritmo circadiano induce variaciones en las características proteicas de la saliva en adultos jóvenes en un estudio clínico observacional.

## **4. OBJETIVOS**

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:**

¿Ejerce el ritmo circadiano una influencia sobre el pH y las características proteicas de la saliva no estimulada en adultos jóvenes?

### **HIPÓTESIS:**

El ritmo circadiano induce variaciones en el pH y sobre las características proteicas de la saliva no estimulada, con mayores concentraciones durante el día en adultos jóvenes.

#### **4.1 Objetivo general**

Determinar si el ritmo circadiano induce variaciones en la saliva no estimulada, en términos del pH y del componente proteico de su composición, en adultos jóvenes.

#### **4.2 Objetivos específicos**

Objetivo específico 1: Determinar las condiciones óptimas de almacenamiento de la saliva total no estimulada, basadas en las fluctuaciones del pH.

Objetivo específico 2: Determinar si existe influencia de las variaciones circadianas en los valores de pH de la saliva no estimulada.

Objetivo específico 3: Establecer una asociación entre el ritmo circadiano y la concentración de proteínas de la saliva no estimulada total de adultos jóvenes.

Objetivo específico 4: Comparar los patrones electroforéticos de la saliva total obtenidos en distintos momentos del ritmo circadiano de los participantes en el estudio.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Diseño general

Este estudio forma parte del proyecto Fondecyt Regular N°1210188, adjudicado a Rodrigo A. Giacaman Sarah. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética Científico (CEC) de la Universidad de Talca, bajo el folio 14/2021. Cada participante del estudio debió firmar un consentimiento informado, el cuál fue leído y explicado previamente (**Anexo 1**).

Para optimizar la recolección de flujo salival no estimulado, se realizaron pruebas preliminares para establecer el tiempo de recolección y cantidad de muestra necesaria para cada análisis estableciendo un volumen mínimo a recolectar por voluntario, según las fluctuaciones del pH.

Para evitar interferencias sobre las variables a estudiar, se realizó la estandarización de las técnicas. Las variables identificadas que pudieran tener un efecto sobre las variables en estudio fueron: inhibidor de proteasas, tiempo y temperatura de almacenamiento. Estas fueron evaluadas con el fin de determinar las condiciones adecuadas para mantener la integridad de las muestras.

Una vez establecidas las condiciones de estabilidad óptimas, se seleccionaron 11 voluntarios con el fin de determinar la influencia del ritmo circadiano en el pH salival, la cantidad de proteínas y los patrones electroforéticos resultantes de la saliva no estimulada.

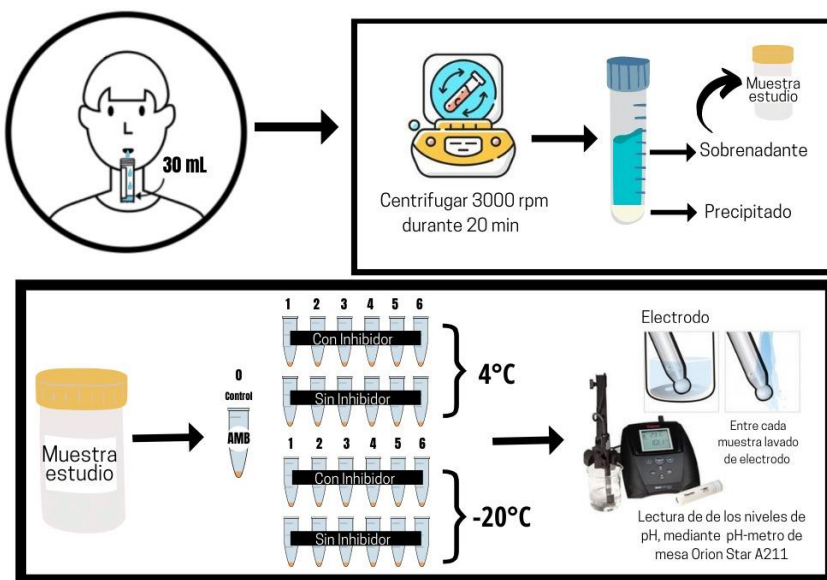
### 5.2. Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de la saliva (Estudio de estabilidad).

En la estandarización de las variables que afectan el pH salival participaron 3 voluntarios adultos jóvenes sanos entre 24 y 28 años de edad que forman parte del equipo de investigación, donando muestras de saliva no estimulada siguiendo el protocolo de recolección de flujo salival no estimulado (**Anexo 2**). Se establecieron 2 parámetros a investigar respecto la estabilidad de las muestras de saliva: el uso de inhibidor de proteasas y las condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo de almacenamiento). El pH salival fue la variable dependiente a medir para ambos parámetros, el cual fue cuantificado mediante el uso de un pHmetro de mesa (Orion Star A211, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), previamente calibrado.

### 5.2.1. Variaciones de pH en intervalos de tiempo reducido.

**Inhibidor de proteasas.** Para evitar la degradación proteolítica de la saliva es necesario tratar las muestras con un inhibidor de proteasas. De este modo, con la finalidad de evaluar el efecto del inhibidor sobre la estabilidad de las muestras, se les solicitó a los voluntarios depositar un mínimo de 30 mL de saliva en tubos Falcon de 50mL, los cuales fueron centrifugados a 3000 rpm por 20 min. El sobrenadante de las muestras fue alicuotado en tubos Eppendorf de 1.5 mL correctamente identificados y divididos por grupos: 1) Sin Inhibidor 2) Con Inhibidor. El inhibidor utilizado fue Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) 0,1 M. en una relación 1:100 (inhibidor: muestra).

**Temperatura y tiempos de almacenamiento.** Las muestras previamente con/sin inhibidor fueron subdivididas y almacenadas a 4°C y a -20°C durante un periodo de 6 horas. Para cada determinación de pH se extrajo una alícuota independiente en intervalos de 1 hora (9:00-10:00-11:00-12:00-13:00-14:00 hrs) (Fig.1).



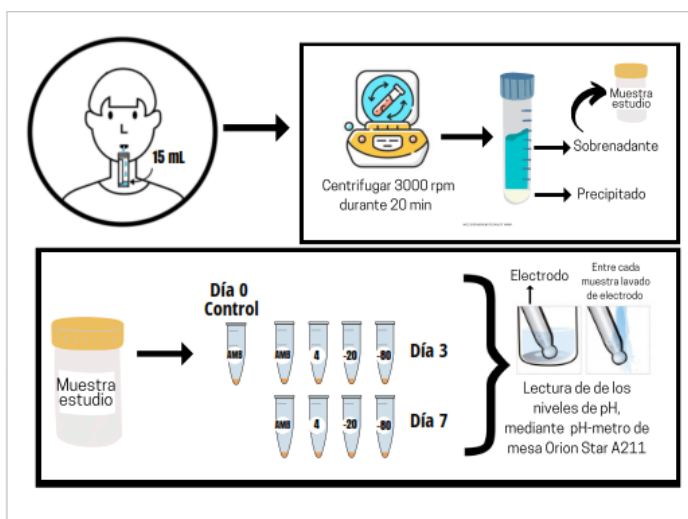
**Figura 1.** Diseño general de almacenamiento de muestras en tiempo reducido. Una vez obtenidas las muestras de saliva, se centrifugaron y el sobrenadante fue dividido en alícuotas con Inhibidor y sin Inhibidor y utilizado para medir pH. Las muestras fueron medidas cada

una hora en un periodo de 6 horas a temperatura ambiente, 4°C y -20°C. La primera medición fue realizada al momento de obtener la muestra, con el fin de obtener un control inicial de pH de la muestra, antes de someterla a diferentes variables de estudio.

### 5.2.2. Variaciones de pH en tiempos extendidos

Con el fin de evaluar el efecto del almacenamiento en tiempos más extensos sobre la estabilidad del pH, se analizaron las muestras de saliva no estimulada de 3 voluntarios, las cuales fueron almacenadas a diferentes temperaturas y tiempos.

**Temperatura y tiempo de almacenamiento.** Con la finalidad de evaluar la estabilidad de las muestras en un periodo más extenso, se les solicitó a los 3 voluntarios depositar un mínimo de 15 mL de saliva en un tubo Falcón de 50 ml y se les agregó PMSF 0,1 M. en una relación 1:100 (inhibidor: muestra). Estas muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 20 min. El sobrenadante de las muestras fue alicuotado en tubos Eppendorf correctamente identificados por su temperatura (21°C, 4°C, -20°C y -80°C) y tiempo de almacenaje (día 0, día 3 y día 7). El pH de cada muestra fue analizado en 3 mediciones repetidas (Fig. 2).



**Figura 2.** Diseño general de almacenamiento de muestras en tiempos extendidos. Una vez obtenidas las muestras de saliva, se centrifugaron y el sobrenadante fue utilizado para medir el pH, a los 0, 3 y 7 días a temperatura ambiente, 4°C, -20°C y -80°C.

### **5.3. Análisis de ritmo circadiano (Estudio principal)**

**Sujetos.** Para evaluar las variaciones de la composición salival frente al ritmo circadiano, se invitó a participar a 11 voluntarios, mediante publicidad vía redes sociales y contacto dentro de las Clínicas odontológicas de la Universidad de Talca, detallándoles por medio de una charla online sobre la metodología a seguir, extensión del proyecto y los parámetros a estudiar. Los sujetos (3 hombres y 8 mujeres), eran estudiantes universitarios de la carrera de Odontología de la Universidad de Talca, de entre 18 a 35 años y sin enfermedades de base. Cada participante fue examinado clínicamente, se practicó una anamnesis general, una evaluación clínica intra y extraoral, sin radiografías por un odontólogo calibrado en los criterios ICDAS. Para ser parte del estudio, los sujetos voluntarios debían tener una adecuada higiene oral, salud gingival y no presentar lesiones de caries cavitadas según los criterios ICDAS, códigos 3-6 o lesiones ICDAS no cavitadas activas según los criterios de actividad de Nyvad (20). Los sujetos que se ofrecieron a participar pero que presentaban enfermedades conocidas por generar una disminución o alteración del flujo salival, como patologías autoinmunes, reacciones alérgicas, que se encontraban bajo tratamiento con corticoides o que fueran fumadores fueron excluidos del estudio. Todos los voluntarios fueron informados de su situación de salud bucal, incluyendo a aquellos que no cumplían los criterios de inclusión

**Estandarización de la dieta y la higiene oral para controlar su efecto sobre el ritmo circadiano.** Se puso a disposición de los voluntarios minutas de alimentación tipo “mediterránea”, diseñadas por una nutricionista, calculada en base a los requerimientos de macro y micronutrientes dependientes del estado nutricional promedio de los participantes según su edad y actividad física (**Anexo 3**). Esto con la finalidad de que la variabilidad de la dieta no alterará los resultados de los análisis.

A los participantes se les indicó seguir pautas de alimentación durante los 3 días previos a la toma de muestra en base a una minuta de dieta mediterránea, pero no estricta. El día de recolección de la saliva no estimulada se les indicó consumir solo los alimentos indicados en la minuta entregada. Asimismo, se les demandó no consumir alimentos ni bebidas azucaradas al menos 1 hora antes de la toma de muestra y realizar un ayuno de 8 horas previo a la primera



recolección del día. Aquellos participantes que tuvieran dificultad para conseguir los alimentos propuestos, se les proporcionaron los alimentos en las cantidades necesarias para llevar a cabo el estudio.

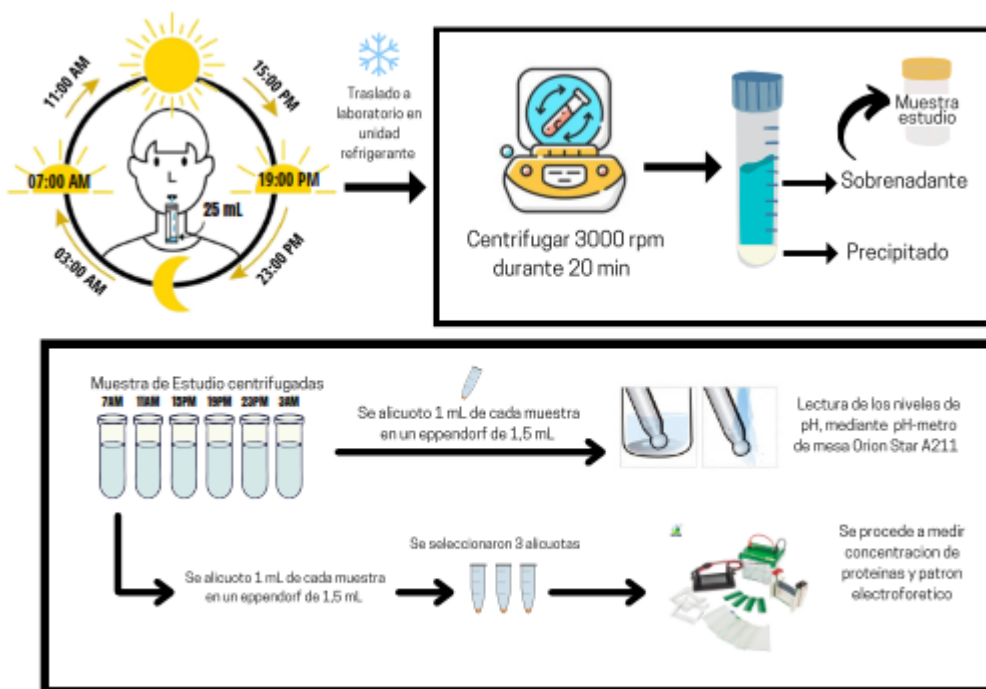
Respecto a la higiene bucal, se les solicitó a los voluntarios que durante el día de toma de muestra realizaran el cepillado sin el uso de pasta dental, al menos una hora previa a cada recolección (mañana, medio día y en la noche). Asimismo, se les indicó abstenerse del cepillado antes de la primera toma de muestra del día (7 AM).

Para llevar detallado el cumplimiento de la recolección, el seguimiento de la dieta y el control de higiene por parte de los voluntarios, se realizó la motivación por medio de posters y mensajes alusivos a lo tratado en el proyecto mediante recordatorios en mensajería instantánea. Además, se les hizo seguimiento individual en las diferentes etapas de la recolección consultando por cualquier dificultad presentada a lo largo de la recolección de las muestras para ser solucionadas a la brevedad.

**Obtención y manejo de la saliva en los tiempos establecidos del ritmo circadiano.** Las muestras de saliva no estimulada fueron recolectadas por los voluntarios durante intervalos de 4 horas, específicamente en los siguientes horarios: 7:00 AM, 11:00 AM, 15:00 PM, 19:00 PM, 23:00 PM y 3.00 AM. Se solicitó a los voluntarios un mínimo de 25 mL de saliva por recolección, sin considerar la espuma generada. La saliva fue depositada en un tubo estéril tipo Falcon de 50 mL con 250 uL de PMSF al 0,1 M, rotulado con la fecha, horario de recogida y código del voluntario. Una vez completado el volumen mínimo, cada participante agitó suavemente la saliva recolectada dentro del tubo para incorporar el inhibidor de proteasas a la muestra. Cada voluntario almacenó inmediatamente el tubo a  $-20^{\circ}\text{C}$  en sus casas, dentro de una bolsa plástica de cierre hermético hasta el día siguiente para ser retirados.

**Procesamiento de las muestras de saliva.** Las muestras fueron retiradas por el equipo de investigadores en un periodo menor a 48 hrs y trasladadas en una unidad refrigerante. Estas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. De la muestra total, se extrajeron 4 mL, para ser divididos en alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf de 1,5 mL, de

las cuales 1 fue destinada para medición de pH y las otras 3 para realizar el triplicado de muestra de las mediciones de concentración y patrón electroforético (**Fig.3**). La saliva restante fue almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por motivos de conservación de las muestras para futuras investigaciones.



**Figura 3.** Diseño general de obtención de muestras siguiendo horarios establecidos. Una vez obtenidas las muestras de saliva, se centrifugaron y el sobrenadante fue dividido en 4 alícuotas de 1 ml cada una, las que fueron utilizadas para realizar la medición de pH, concentración de proteínas y patrón electroforético.

### **5.3.1 Determinación de los valores de pH de las muestras de saliva no estimulada.**

La alícuota destinada para el análisis de pH fue cuantificada inmediatamente al ser obtenida, en triplicado en intervalos de 10 minutos.

Al igual que en el proceso de estandarización, el pH de las muestras fue determinado mediante un pHmetro (Orion Star A211, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), el cual permitió obtener datos con respecto a los niveles de pH y temperatura de la muestra en estudio.

### **5.3.2 Concentración de proteínas:**

Para obtener un pellet de proteínas que permita su medición es necesario precipitarlas desde la saliva en solución. La precipitación de las proteínas se llevó a cabo mediante la técnica del ácido tricloroacético (TCA) (21). El protocolo para la precipitación está descrito en el **Anexo 4**, pero brevemente consiste en: la utilización de TCA en las muestras previamente alícuotadas. Posterior a su uso, dichas muestras se deben refrigerar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 min y ser centrifugadas al momento de cumplirse el tiempo establecido. De esta manera será posible eliminar el sobrenadante y lavar el pellet formado, con acetona fría y así finalmente dejar evaporar los restos de esta, para reconstituir la muestra con tampón fosfato salino (PBS) enriquecido con Dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) y fueron medidas en el espectrofotómetro (Infinite 200 PRO NanoQuant, Tecan, Männedorf Bezirk Meilen, Suiza). Los valores de absorbancia fueron interpolados en curva de calibración realizada según las indicaciones del proveedor, obteniendo las concentraciones de proteínas de las muestras. Se evaluaron las muestras obtenidas en cada horario establecido, realizando la medición de cada alícuota acorde al tiempo de almacenamiento y realizando la cuantificación en triplicado por cada muestra analizada.

### **5.3.3 Electroforesis**

Se analizó el patrón electroforético mediante el uso de una cámara de electroforesis con un gel de poliacrilamida Stain-Free de Bio-Rad al 12% con el fin de generar la separación de proteínas según el peso molecular siguiendo un protocolo previamente descrito (**Anexo 5**),

la cual se basa en el tamaño de los poros dentro del propio gel. Posterior a la electroforesis se realizó la visualización de los geles en un documentador de geles (Gel Doc EZ Imager, Bio-rad, Hércules, CA, USA).

#### **5.4 Análisis estadístico y descriptivo de los datos**

Se realizaron comparaciones para determinar la normalidad de la distribución de los datos. Se utilizaron análisis paramétricos con ANOVA y un test post-hoc para comparar los grupos entre sí y con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ). Los datos se analizaron mediante el programa de software SPSS. Las diferencias en cuanto al patrón electroforético fueron estimadas cualitativamente, de acuerdo a la observación de las diferentes bandas obtenidas.

## 6. RESULTADOS

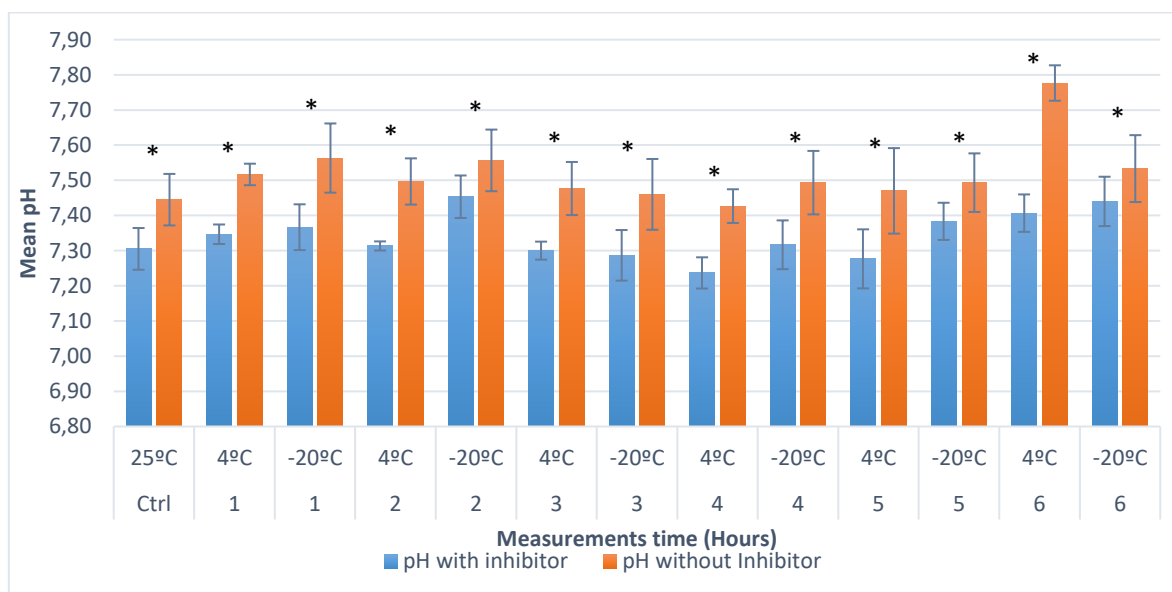
### 6.1 Variabilidad de pH en cortos periodos de tiempo según variables en estudio

#### 6.1.1 Medición de la variación del pH salival influenciada por Inhibidor de proteasas

El inhibidor de proteasas utilizado PMSF 0,1 M, provocó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) del pH en las muestras salivales (Fig.4). Esta disminución se puede observar tanto en el control, al cual se le determinó el pH a temperatura ambiente luego de terminada la toma de muestra, como en aquellas muestras que fueron almacenadas a diferentes temperaturas y se les determinó el pH después de 1 a 6 horas de ser dejadas a 4°C y -20°C.

#### 6.1.2 Medición de la variación de pH salival influenciada por temperatura y tiempo

El almacenamiento en un corto periodo de tiempo (máximo 6 horas) en las temperaturas de 4°C y -20°C, no causó una variación estadísticamente significativa ( $p = 0,831$ ) en el pH salival (Fig.4).

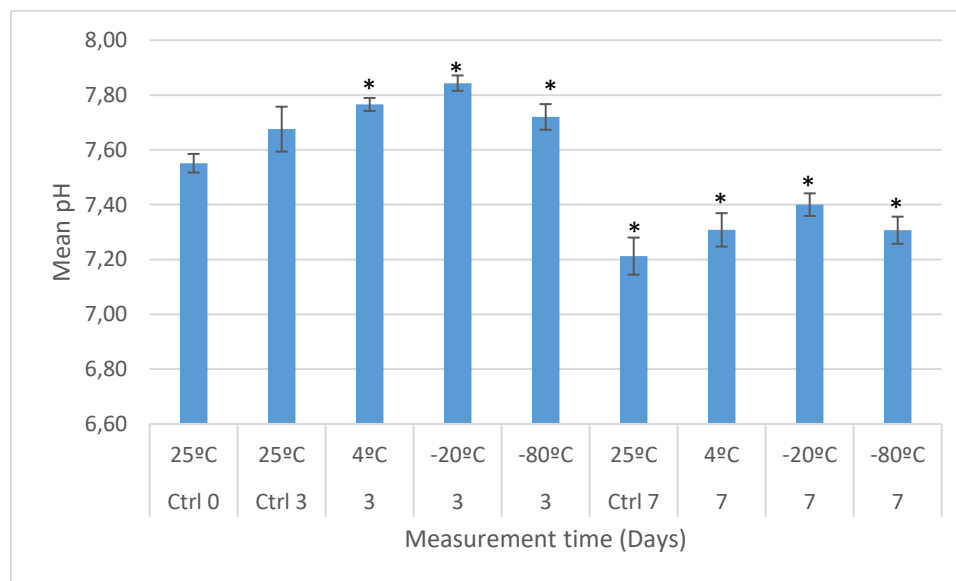


**Figura 4:** Promedio valores de pH salival en los voluntarios, con o sin el uso de inhibidor de proteasas, sometidas a diferentes tiempos y Temperaturas de almacenamiento. El grafico muestra la diferencia en promedios de los valores de pH salival de los voluntarios a temperaturas de 25°C, 4°C, -20°C Y -80°C, durante periodos de almacenamiento establecidos (Día 0, 3 y 7). Las barras de error representan el error estándar de cada condición experimental. \*Valor  $p < 0,05$

## 6.2 Variabilidad del pH salival a largo plazo y a diferentes temperaturas de almacenamiento

Tras agregar inhibidor de proteasas a las muestras, se determinó los valores de pH salival, en periodos de tiempo más largos (día cero, 3 y 7) y a diferentes temperaturas de almacenamiento (25°C, 4°C, -20°C y -80°C).

Los resultados se observan en la Fig. 5. Los valores obtenidos entre el control del día 0 en comparación a los valores obtenidos del día 3, a temperaturas de 4°C, -20°C y -80°C fueron más básicas, excepto a 25°C, que no resultó estadísticamente significativa ( $p=0,990$ ), manteniéndose estable con respecto al control. Por otro lado, al evaluar las muestras almacenadas hasta el día 7, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ) con respecto al control del día 0, siendo más ácidas que el control.

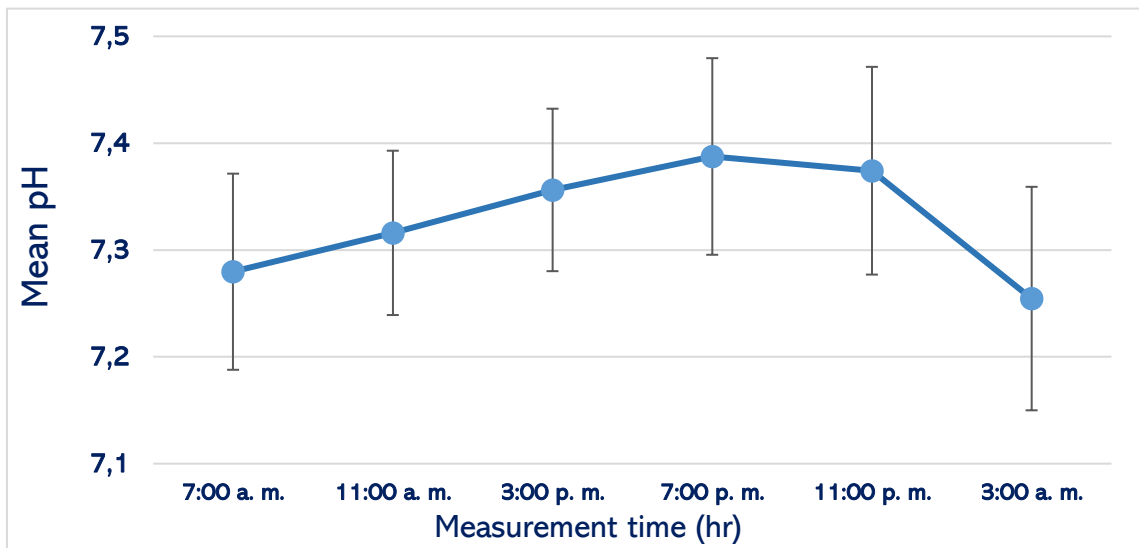


**Figura 5: Promedio valores de pH salival en los voluntarios, sometidas a diferentes tiempos y Temperaturas de almacenamiento.** El grafico muestra la diferencia en promedios de los valores de pH salival de los voluntarios a temperaturas de 25°C, 4°C, -20°C Y -80°C, durante periodos de almacenamiento establecidos (Día 0, 3 y 7). La barra de error representa el error estándar de cada condición experimental. \* Valor  $p < 0.05$

## 6.2 Influencia del Ritmo Circadiano en las características proteicas cualitativas y cuantitativas en la muestra de saliva total.

### Medición de la variabilidad ejercida por el ritmo circadiano frente al pH salival:

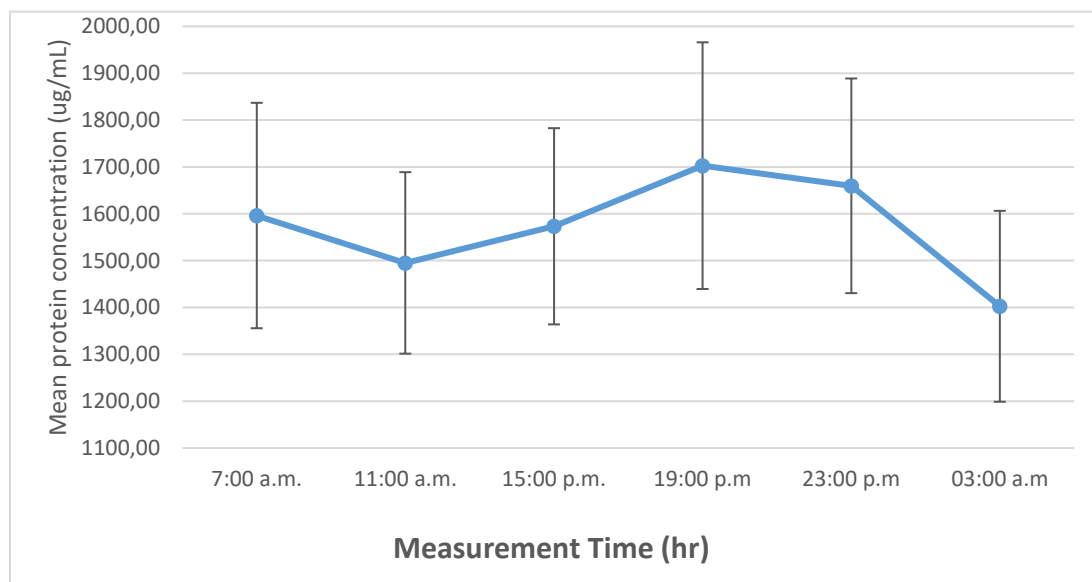
Tras la realización de 3 mediciones de pH en las muestras salivales de los 11 voluntarios, en los 6 tiempos predefinidos del ciclo (7 am, 11 am, 3 pm, 7pm, 11 pm y 3 am), se evidenció que las variaciones en los valores de pH salival, no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,867$ ), por los que se puede deducir que los valores del pH salival no son influenciados por el ritmo circadiano, manteniéndose estables en un periodo de 24 horas (Fig. 6). Sin embargo, se detectaron oscilaciones de pH durante el ciclo circadiano.



**Figura 6: Promedio de valores de pH salival en diferentes horarios de día, en un periodo de 24 horas.** El grafico muestra la diferencia en promedios de los valores de pH salival de 11 voluntarios, sobre muestras obtenidas en un horario establecido (7 am, 11 am, 3 am, 7 pm, 11 pm y 3 am). La barra de error representa la desviación estándar de cada condición experimental. Valor  $p= 0,867$ .

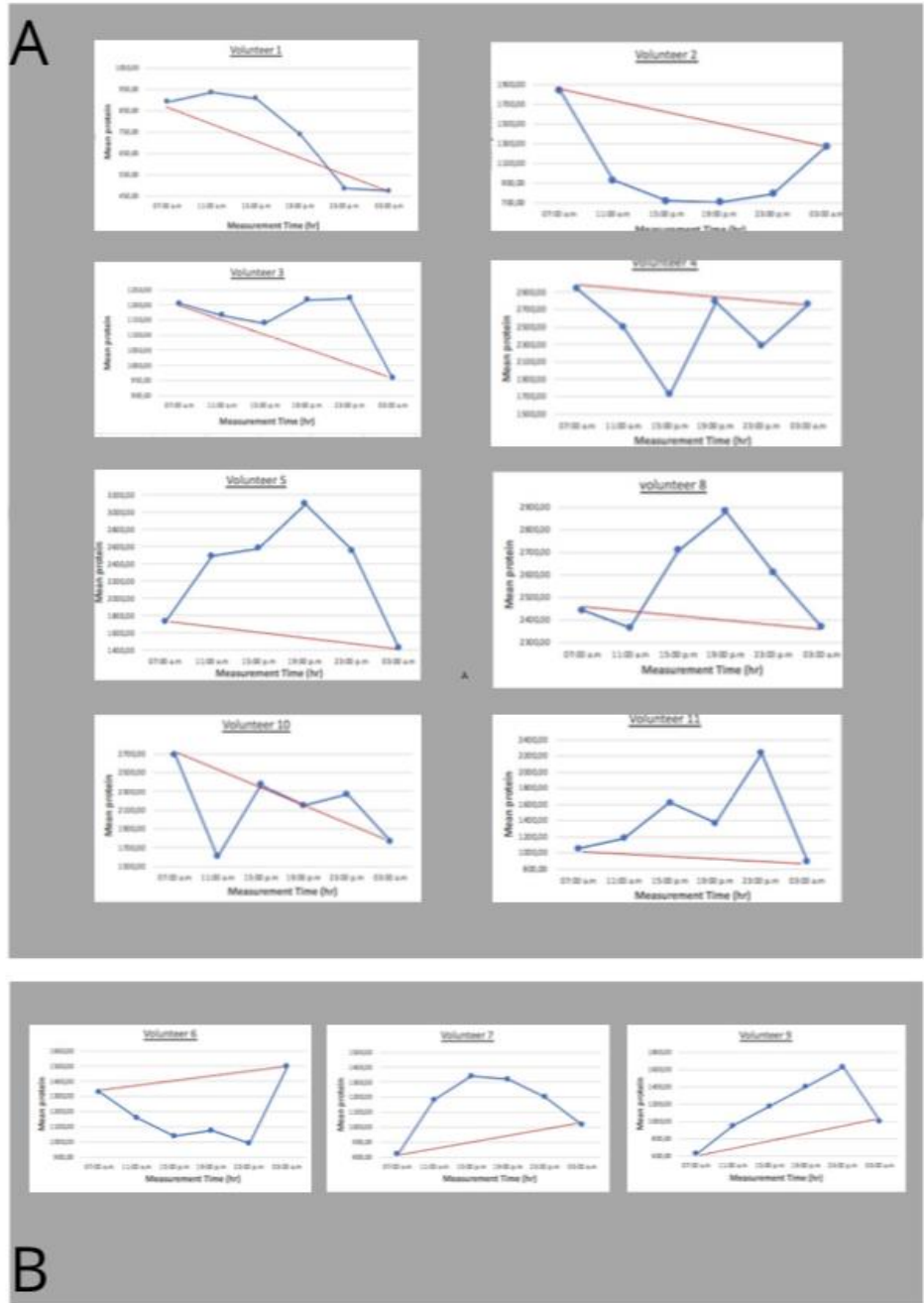
### **Medición de la influencia del ritmo circadiano en la concentración de proteínas en saliva total no estimulada.**

Los análisis ejecutados para determinar la concentración de proteínas, no fueron estadísticamente significativos ( $p=0,944$ ) durante el ciclo circadiano, por lo que se puede inferir que el ritmo circadiano no provoca variaciones en la concentración de proteínas salivales. La **Fig. 7** ilustra los promedios de concentración de proteínas entre los 11 voluntarios en los 6 periodos estudiados. Sin embargo, existieron variaciones marcadas entre los voluntarios del estudio. En la **Fig. 8** se observan los 2 patrones (A y B) que se observaron.. Los sujetos clasificados en el primer patrón (Fig. 8, Panel A) evidenciaron una disminución en la concentración de proteínas salivales desde las 7 a.m. a las 3 a.m. con fluctuaciones en demás horarios. Los sujetos del segundo patrón (Fig. 8, Panel B), mostraron un aumento a las 3 a.m. en comparación a las 7 a.m.



**Figura 7: Promedio de valores de concentración de proteínas salivales en diferentes horarios del día, en un periodo de 24 horas.** La figura muestra la diferencia en promedios de los valores de concentración de proteínas en la saliva de 11 voluntarios, sobre muestras obtenidas en un horario establecido (7 am, 11 am, 3 am, 7 pm, 11 pm y 3 am). Las barras de error representan la desviación estándar de cada condición experimental. Valor  $p= 0,944$

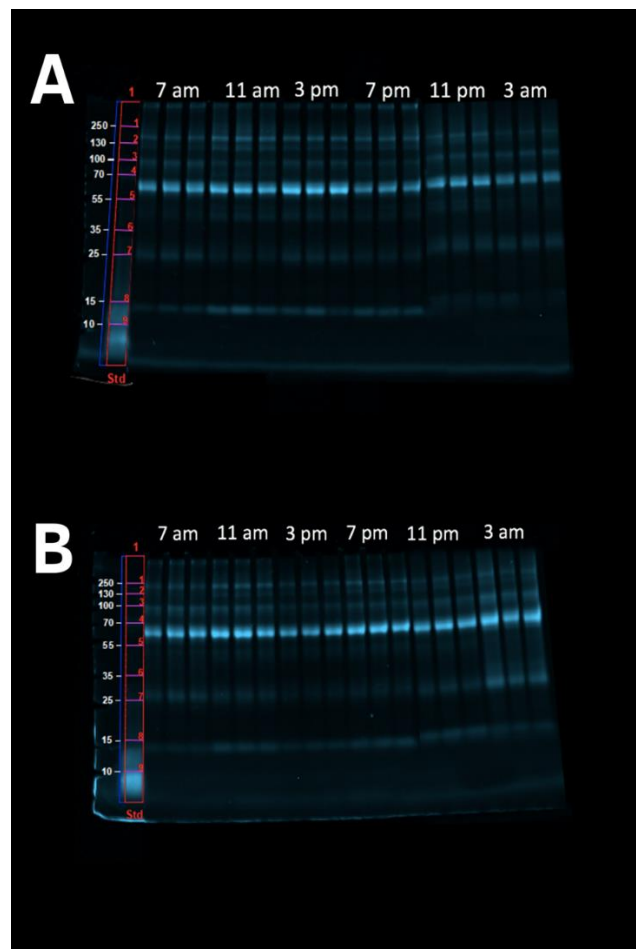




**Figura 8: Patrones individuales en la influencia del ritmo circadiano en la concentración de proteínas totales en saliva no estimulada.** Se muestra la diferencia de la concentración de proteínas en la saliva de 11 voluntarios, sobre muestras obtenidas en un horario establecido (7 am, 11 am, 3 am, 7 pm, 11 pm y 3 am). Se identifican dos tendencias; en el panel A, se observa una disminución en la concentración de proteínas salivales desde las 7 a.m. a las 3 a.m. y en el panel B un aumento a las 3 a.m. en comparación a las 7 a.m.

### **Efecto del ritmo circadiano sobre el patrón electroforético de las proteínas totales de saliva no estimulada.**

En la Fig. 9 se observan imágenes representativas de los geles cargados con proteínas totales de saliva no estimulada y el resultante patrón electroforético. Es destacable una banda visualizada entre los 55 a 75 kDa y otra entre los 10 a 15 kDa. Al analizar en el panel A, se observa que a las 3 a.m. las bandas se vuelven más tenues en comparación con las generadas con la saliva de las 7 am. En el panel B, se observa una banda más marcada a las 3 am a los distintos pesos moleculares, en comparación con las bandas detectadas a las 7 am. Estos geles representan las 2 tendencias más comunes entre los 11 voluntarios.



*Figura 9: Valoración del efecto del ritmo circadiano sobre el patrón electroforético de las proteínas totales de la saliva no estimulada. Se muestran geles correspondientes a 2 voluntarios representativos de la diferencia de patrones electroforéticos de los voluntarios en un horario*

*establecido (7 am, 11 am, 3 am, 7 pm, 11 pm y 3 am). Se pueden distinguir dos tendencias; en el panel A, se observan bandas más tenues de proteínas salivales a las 7 a.m. comparado con las 3 a.m. y en el panel B, se observa la tendencia contraria, con un aumento a las 3 a.m. en comparación con las 7 a.m.*

## 8. DISCUSIÓN

Los ritmos circadianos son cambios físicos, mentales y conductuales que siguen un ciclo de 24 horas (10). Estos procesos naturales responden, principalmente, a la luz y la oscuridad, afectando a la mayoría de los seres vivos (22). Este estudio evaluó si los ritmos circadianos inducían algún tipo de variabilidad en las características cuantitativas y cualitativas de las proteínas y en el pH de la saliva no estimulada (23).

Al evaluar el efecto de diferentes variables (PMSF, temperatura y tiempo) sobre la estabilidad de los parámetros salivales de interés, surgieron varios hallazgos. En primer lugar, es que el uso del inhibidor de proteasas PMSF, indujo variaciones significativas en el pH salival, reduciéndolo en relación con la saliva no tratada con el inhibidor. En segundo lugar, ocurrió que los valores de pH se mantuvieron estables a diferentes temperaturas en un plazo no superior a 6 horas. Sin embargo, al almacenar las muestras por más de 3 días, fue posible evidenciar alteraciones en los valores de pH (estadísticamente significativos), pero no con las diferentes temperaturas evaluadas.

Respecto al efecto del ritmo circadiano sobre ciertas características salivales es posible inferir de acuerdo con los resultados obtenidos, que este no induce variaciones en el pH, pues tiende a mantenerse estable en el transcurso del ciclo, evidenciándose este comportamiento en los diferentes participantes del estudio. La concentración de proteínas se mantuvo relativamente estable durante el transcurso del día, cuyas diferencias no fueron estadísticamente significativas. A pesar de esto, fue posible evidenciar 2 tendencias al trazar una línea desde la concentración de la muestra recolectada a las 7 AM con la de las 3 A.M, las cuales corresponden a: 1) disminución de la concentración de proteínas (voluntarios 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11) 2) aumento de la concentración de proteínas (voluntarios 6, 7, 9).

El efecto producido por el PMSF sobre la muestra, ocurre debido a que es una sustancia ácida y de vida media corta, que para perpetuar su acción, debe estar a pH ácido dado que se inactiva a temperaturas mayores a 4°C y valores de pH sobre los 7,5 (24), explicando de esta manera la disminución en los valores de pH salival a 4°C y -20°C a las cuales se les añadió

inhibidor de proteasas (25). En la cavidad oral existen sistemas que permiten regular estos cambios de pH, más comúnmente conocidos como sistemas tampones o buffers, destacando a los buffers químicos quienes mantienen las funciones preventivas ante la acidificación de medio oral, requisito para la formación de una lesión de caries (26).

Ante una disminución de pH, la saliva presenta tres sistemas buffers principales: tampón de carbonato, fosfato y proteínas (27). Estos sistemas actúan en ciertos rangos de pH en los cuales su amortiguación es eficiente, para los buffers de fosfato y carbonato dicho pH es 7,2 y 6,3 respectivamente, en cambio las proteínas poseen una actividad tamponante efectiva cuando el pH es inferior a 5 (28). A partir de esto podemos deducir que las muestras con un pH descendido por el PMSF generan una amortiguación con los buffers de bicarbonato y fosfato ya que el pH obtenido no fue inferior a 5. Lilienthal et al (29) informaron de un comportamiento similar, indicando que el sistema tampón de proteínas por sí solo no posee un efecto significativo, sino que interactúa con otros componentes de la saliva para aumentar dicho efecto. De lo anterior se puede inferir que la concentración de buffers de fosfato y carbonato existentes en la saliva no estimulada al momento de la recolección no fue capaz de neutralizar la disminución del pH producto de la adición de PMSF.

Al realizar el estudio del análisis de almacenamiento de saliva en periodos de corta duración, se observó que al almacenar las muestras a las temperaturas de 4°C y -20°C y evaluarlas a las 6 horas de medición, se evidencia una variación mínima de pH, siendo en un rango de 7,31 a 7,78. Esta estabilidad en el pH se puede deber a la capacidad tampón de la saliva (29) lo cual se asocia a la acción del Fosfato y bicarbonato.

No obstante, al realizar un análisis de la variabilidad de pH salival en periodos más extensos, se observó que las muestras del día 3 aumentan su valor, mientras que al día 7 disminuyen. El aumento de pH observado en el día 3 podría ser explicado por la pérdida de CO<sub>2</sub> en las muestras, las cuales pueden haber sido procesadas y medidas en periodos muy prolongados de tiempo, lo que genera que el CO<sub>2</sub> se difunda por las diferencias de presión existente entre la muestra y el ambiente. El dióxido de Carbono es el sustrato de la anhidrasa carbónica para producir bicarbonato, el cual cumple la función de mantener el pH estable (28). Por otro lado, al día 7 las muestras presentaron un pH inferior, que puede ser ocasionado por la actividad

del PMSF y por la influencia de las bacterias presentes en las muestras, ya que al metabolizar sustratos generan ácido el cual es liberado al medio en el que se encuentran.

Por otra parte, al evaluar el efecto del ritmo circadiano sobre el pH salival, se puede evidenciar que las fluctuaciones son mínimas (Fig. 7), lo cual puede ser explicado a que la totalidad de los voluntarios que participaron en este estudio no presentaban lesiones de caries activas, lo cual se ha evidenciado por la relación causal entre la presencia de caries y disminución de pH (30). Además se ha descrito que la dieta puede influir en el pH salival de acuerdo a los alimentos consumidos (31), aumentando o disminuyendo sus valores (26). En este estudio, se les entregó a los voluntarios un formato de dieta estándar en base a una misma dieta de tipo mediterránea la que proporciona una alimentación equilibrada y variada (32), con el fin de evitar este tipo de variaciones, además de realizar las recolecciones de saliva alejadas de las ingestas, lo que disminuye la influencia directa de los alimentos sobre el pH oral.

Al analizar los resultados de la influencia del ritmo circadiano sobre la concentración de proteínas, se evidenció que los valores no fueron estadísticamente significativos, ya que las concentraciones proteicas se mantuvieron estables durante el tiempo ensayado. Al analizar los datos individuales se observó una tendencia al aumento a las 7 AM y una disminución a las 3 AM lo cual puede estar asociado a la producción de cortisol (33). Esta hormona es regulada por el SCN alcanzando sus niveles máximos en las primeras horas de la mañana y más bajos durante la primera mitad de la noche en estados fisiológicos (34).

Al analizar las fluctuaciones de la concentración de proteínas, se evidencian 2 tendencias claras, las cuales se observan en los paneles A y B de la Figura 8 y 9 respectivamente. Estas pueden deberse a la influencia de ciertos factores asociados a la secreción de proteínas, como lo sería la velocidad de flujo salival (35) y los propios ritmos circadianos (36) que frente a estímulos de luz generan variaciones en la secreción (37). Además, frente a situaciones que generan estrés, se estimula la vía simpática de las glándulas salivales (38) produciendo fluctuaciones en las concentraciones de proteínas. Dada la multiplicidad de factores que modulan la secreción de proteínas salivales, no se pudieron detectar tendencias generales para los 11 voluntarios. Sin embargo, del análisis individual, es más frecuente

observar una disminución de la concentración total de proteínas durante la noche (Fig. 8 A). Los sujetos con un patrón distinto podrían estar influenciados por otras variables como la duración del sueño, el stress u otras condiciones no controladas en este estudio.

Al analizar las imágenes digitalizadas de los geles obtenidos luego de la electroforesis, se evidencia que existe una correlación entre la concentración de proteínas y la intensidad de las bandas en los diferentes horarios. La cantidad de bandas observadas en el patrón electroforético a lo largo del día no difieren, manteniéndose constante en todos los voluntarios incluidos. Este comportamiento podría explicarse en base a que en todo momento la presencia de las proteínas es la misma, solo varía su concentración en el fluido salival por diferentes factores tales como la alimentación, flujo salival, niveles de estrés y alteraciones fisiológicas producidas el día de recolección de la muestra.

Una de las limitaciones de la investigación tiene relación con la cantidad de muestras analizadas, ya que solo se procesaron muestras de un día para evaluar el ritmo circadiano (24 horas), lo cual no es suficiente para mostrar tendencias reproducibles en el tiempo en cuanto a las variables estudiadas. Para un análisis robusto se hace necesario el procesamiento de un número mayor de muestras en días consecutivos de recolección. Además hay otros factores que pueden influir en los voluntarios tales como el estado hormonal, estrés, alteraciones del sueño, entre otros, lo que genera una alta variabilidad de la saliva en su composición normal (39).

Dentro de las limitaciones metodológicas que presentó el estudio, fue la estandarización de la dieta en los voluntarios, la cual se realizó para disminuir la influencia de esta sobre las variables analizadas. Las minutas de alimentos fueron calculadas en base a actividad física liviana y requerimientos nutricionales de los voluntarios de acuerdo con la talla y peso de la población general. A pesar de esto, puede no estarse cumpliendo el objetivo principal de estandarización, ya que debe ser calculada conforme a las necesidades calóricas respectivas de cada individuo, como lo presentado en el estudio de Jennings A. et al (40) el cual tomo en consideración una dieta mediterránea personalizada para cada participante

Dentro de las limitaciones técnicas, la utilización de TCA para la precipitación de proteínas, que requiere periodos de centrifugación prolongados y el pellet generado no precipita del todo, lo que puede llevar a la pérdida de muestras y alteración de los resultados. Por otro lado, lo ideal para analizar los geles, sería realizar Western Blot, que es una técnica útil para la identificación de proteínas específicas (41). Otra limitación es la utilización del PMSF como inhibidor de proteasas en las muestras, pues a cambios bruscos de temperatura, tiende a inactivarse aumentando el pH de las muestras.

A pesar de las limitaciones existentes en la realización de ambos estudios, se puede determinar que el proceso de recolección de saliva es una técnica indolora y fácil de ser ejecutada. Además, se puede inferir que los resultados no presentan diferencias significativas debido a la homogeneidad de los voluntarios, ya que en general poseen un estado de salud sistémico y oral favorables. A su vez, con respecto a los resultados, se pudo evidenciar cómo puede variar el pH salival frente a parámetros como el tiempo de almacenamiento, la temperatura o la utilización de inhibidor de proteasas PMSF, siendo este último aquel que afecta mayormente a los resultados, por lo cual se sugiera usar otro tipo de inhibidor para estudios posteriores. También es necesario considerar analizar las muestras de manera inmediata ya que a partir del tercer día de almacenamiento comienzan a sufrir alteraciones en sus valores de pH.

Por otro lado, con respecto al comportamiento intraindividual diario de la concentración de proteínas salivales, aunque no existe una diferencia significativa, existen tendencias en las horas estudiadas que pueden indicar una mayor susceptibilidad del medio oral a la formación de caries dental, lo cual puede ayudar a la instauración de nuevas estrategias preventivas.

Consideramos que es necesario realizar estudios posteriores en los cuales se apliquen cuestionarios individuales de hábitos alimenticios, calidad del sueño, estrés, entre otros factores, que puedan influir en los ritmos circadianos. Sumado a lo anterior, es necesario realizar un estudio para establecer las diferencias de los parámetros por sexo, ya que existen controversias en la literatura respecto al tema. A su vez, sería ideal considerar la aplicación de un densitograma, para otorgar un valor numérico a las intensidades de las bandas, para tener datos cuantitativos. A partir de esto se sugiere complementar con Western Blot, que es una técnica útil para la identificación de proteínas específicas (41) y así poder relacionarlas con los ritmos circadianos. Para finalizar, se sugiere la continuación de este estudio con



grupos etarios de importancia para la salud pública, utilizando dos o más variables de estudio como lo serían la comparación en voluntarios con lesiones de caries activas e inactivas.

## 9. REFERENCIAS

1. Giacaman RA, Aranguiz V, Botelho J, Bustos IP, Cabello R, Candiales Y, et al. Creación de un Currículo de Competencias en Cariología para Estudiantes de Pregrado de Odontología en Chile. %J Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral. 2018;11:58-68. doi: 10.4067/S0719-01072018000100058
2. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. J Dent Res. 2015;94(5):650-8. doi: 10.1177/0022034515573272.
3. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17030. doi: 10.1038/nrdp.2017.30.
4. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85(2):162-9. doi: 10.1067/mpr.2001.113778.
5. de Almeida Pdel V, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. J Contemp Dent Pract. 2008;9(3):72-80.
6. Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. J Oral Rehabil. 2007;34(10):711-23. doi: 10.1111/j.1365-2842.2007.01794.x.
7. Wada M, Orihara K, Kamagata M, Hama K, Sasaki H, Haraguchi A, et al. Circadian clock-dependent increase in salivary IgA secretion modulated by sympathetic receptor activation in mice. Scientific Reports. 2017;7(1):8802. doi: 10.1038/s41598-017-09438-0.
8. Marcheava B, Ramsey KM, Peek CB, Affinati A, Maury E, Bass J. Circadian clocks and metabolism. Handb Exp Pharmacol. 2013(217):127-55. doi: 10.1007/978-3-642-25950-0\_6.
9. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. Neurochirurgie. 2015;61(2-3):77-84. doi: 10.1016/j.neuchi.2015.03.002.
10. Papagerakis S, Zheng L, Schnell S, Sartor MA, Somers E, Marder W, et al. The circadian clock in oral health and diseases. J Dent Res. 2014;93(1):27-35. doi: 10.1177/0022034513505768.
11. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res. 2004;38(3):247-53. doi: 10.1159/000077762.
12. Gabryel-Porowska H, Gornowicz A, Bielawska A, Wójcicka A, Maciorkowska E, Grabowska SZ, et al. Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries. Med Sci Monit. 2014;20:72-7. doi: 10.12659/msm.889718.
13. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. J Dent. 2005;33(3):223-33. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009.
14. Wang K, Zhou X, Li W, Zhang L. Human salivary proteins and their peptidomimetics: Values of function, early diagnosis, and therapeutic potential in combating dental caries. Arch Oral Biol. 2019;99:31-42. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.12.009.
15. Esteves CV, Campos WG, Souza MM, Lourenço SV, Siqueira WL, Lemos-Júnior CA. Diagnostic potential of saliva proteome analysis: a review and guide to clinical practice. Braz Oral Res. 2019;33:e043. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0043.
16. Scarano E, Fiorita A, Picciotti PM, Passali GC, Calò L, Cabras T, et al. Proteomics of saliva: personal experience. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2010;30(3):125-30.
17. Amado F. C-LMJ, Ferreira R., Vitorino R. . Sample Treatment for Saliva Proteomics. In: Capelo-Martínez JL. (eds) Emerging Sample Treatments in Proteomics. Advances in Experimental Medicine and Biology. (2019).
18. Kaczor-Urbanowicz KE, Martín Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT. Saliva diagnostics - Current views and directions. Exp Biol Med (Maywood). 2017;242(5):459-72. doi: 10.1177/1535370216681550.

19. Dimitriou L, Sharp NC, Doherty M. Circadian effects on the acute responses of salivary cortisol and IgA in well trained swimmers. *Br J Sports Med.* 2002;36(4):260-4. doi: 10.1136/bjism.36.4.260.
20. Nyvad B, Baelum V. Nyvad Criteria for Caries Lesion Activity and Severity Assessment: A Validated Approach for Clinical Management and Research. *Caries Res.* 2018;52(5):397-405. doi: 10.1159/000480522.
21. Koontz L. TCA precipitation. *Methods Enzymol.* 2014;541:3-10. doi: 10.1016/b978-0-12-420119-4.00001-x.
22. Brain Basics: Understanding Sleep. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 2019; <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Understanding-Sleep>.
23. Fenoll-Palomares C, Muñoz Montagud JV, Sanchiz V, Herreros B, Hernández V, Mínguez M, et al. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev Esp Enferm Dig.* 2004;96(11):773-83. doi: 10.4321/s1130-01082004001100005.
24. James GT. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal Biochem.* 1978;86(2):574-9. doi: 10.1016/0003-2697(78)90784-4.
25. PMSF. Cold Spring Harbor Protocols. 2006;2006(1):pdb.rec8772. doi: 10.1101/pdb.rec8772.
26. Pyati SA, Naveen Kumar R, Kumar V, Praveen Kumar NH, Parveen Reddy KM. Salivary Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Total Protein, Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Children with and without Dental Caries. *J Clin Pediatr Dent.* 2018;42(6):445-9. doi: 10.17796/1053-4625-42.6.7.
27. Cheaib Z, Lussi A. Role of amylase, mucin, IgA and albumin on salivary protein buffering capacity: a pilot study. *J Biosci.* 2013;38(2):259-65. doi: 10.1007/s12038-013-9311-1.
28. Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. *Arch Oral Biol.* 2000;45(1):1-12. doi: 10.1016/s0003-9969(99)00119-3.
29. Lilienthal B. An analysis of the buffer systems in saliva. *J Dent Res.* 1955;34(4):516-30. doi: 10.1177/00220345550340040701.
30. Kutsch VK. Dental caries: an updated medical model of risk assessment. *J Prosthet Dent.* 2014;111(4):280-5. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.07.014.
31. Mandel AL, Peyrot des Gachons C, Plank KL, Alarcon S, Breslin PA. Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary  $\alpha$ -amylase levels, and the perception of oral starch. *PLoS One.* 2010;5(10):e13352. doi: 10.1371/journal.pone.0013352.
32. Navarro-González I, Ros G, Martínez-García B, Rodríguez-Tadeo A, Periago MJ. Adherencia a la dieta mediterránea y su relación con la calidad del desayuno en estudiantes de la Universidad de Murcia. *Nutr Hosp.* 2016;33(4):390. doi: 10.20960/nh.390.
33. Clow A, Hucklebridge F, Stalder T, Evans P, Thorn L. The cortisol awakening response: more than a measure of HPA axis function. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010;35(1):97-103. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.12.011.
34. Fries E, Dettenborn L, Kirschbaum C. The cortisol awakening response (CAR): Facts and future directions. *International Journal of Psychophysiology.* 2009;72(1):67-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2008.03.014>.
35. Bhalla S, Tandon S, Satyamoorthy K. Salivary proteins and early childhood caries: A gel electrophoretic analysis. *Contemp Clin Dent.* 2010;1(1):17-22. doi: 10.4103/0976-237x.62515.
36. Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics Clin Appl.* 2011;5(11-12):575-9. doi: 10.1002/prca.201100046.
37. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000.* 2016;70(1):11-25. doi: <https://doi.org/10.1111/prd.12116>.

38. Keremi B, Beck A, Fabian TK, Fabian G, Szabo G, Nagy A, et al. Stress and Salivary Glands. *Curr Pharm Des.* 2017;23(27):4057-65. doi: 10.2174/1381612823666170215110648.
39. Neyraud E, Palicki O, Schwartz C, Nicklaus S, Feron G. Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking. *Arch Oral Biol.* 2012;57(5):556-66. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.016.
40. Jennings A, Berendsen AM, de Groot L, Feskens EJM, Brzozowska A, Sicinska E, et al. Mediterranean-Style Diet Improves Systolic Blood Pressure and Arterial Stiffness in Older Adults. *Hypertension.* 2019;73(3):578-86. doi: 10.1161/hypertensionaha.118.12259.
41. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5\_9.

# 10.Anexos

## Anexo N°1: Consentimiento informado para voluntarios de estudio.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

VÁLIDO DESDE: 01/04 / 2021

HASTA: 01/04 / 2024

**Título del Proyecto:** Efecto modulador de proteínas de la dieta y de ácidos grasos insaturados sobre las características de la saliva y la biopelícula dental, relacionadas con la caries dental.

**Financiado por:** Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID)-Concurso FONDECYT Regular 1210188

**Patrocinante:** Departamento de Rehabilitación Buco Maxilofacial, Universidad de Talca

#### **Estimado Sr. (Sra.):**

El propósito de este documento es entregarle toda la información necesaria para que Ud. pueda **DECIDIR LIBREMENTE SI DESEA PARTICIPAR en la INVESTIGACIÓN** que se le ha explicado verbalmente, y que a continuación se describe en forma resumida. Recuerde que debe firmar 2 copias, una es para usted y la otra para el equipo investigador.

#### **DESCRIPCION DEL ESTUDIO Y OBJETIVO(S)**

Este proyecto propone un concepto novedoso para comprender la caries y su patogenia. Recientemente, se ha enfatizado el papel fundamental de los azúcares en la caries, con ideas modernas sobre la patogénesis, basadas en tecnologías recientes. Sin embargo, la caries dental sigue siendo la enfermedad crónica no transmisible más prevalente del ser humano. De hecho, la definición actual apunta hacia una disbiosis ecológica (desequilibrio ecológico) provocada por los microorganismos locales, que, bajo desequilibrios ecológicos, principalmente por azúcares, se vuelven patógenos.

La caries dental es modulada por múltiples factores, entre ellos se encuentra la saliva. Esta secreción está constituida por agua, una porción orgánica (proteínas) y otra inorgánica (electrolitos). Dicha secreción es regulada por los ciclos circadianos. Los ritmos circadianos son considerados los relojes corporales pues regulan los procesos metabólicos del organismo.

Pese a todo lo que se sabe de la secreción de la saliva, la influencia del ritmo circadiano sobre esta, y la acción de las proteínas en el medio oral, como su acción anticaries o la mantención del medio oral, aún hay un importante vacío de información e investigación que permitan comprender y establecer una relación frente al ritmo circadiano y su influencia en las características proteicas de la saliva durante periodos diurnos y nocturnos. Existen escasos

estudios que evalúen las características de la saliva en respuesta los ritmos circadianos. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es determinar si los ritmos circadianos pueden influenciar las concentraciones de los componentes orgánicos e inorgánicos de la saliva durante el día y la noche.

## **BENEFICIOS**

Si participa en esta investigación, recibirá información sobre el estado de su salud bucal de parte de los investigadores. Su colaboración en este proyecto también nos permitirá conocer las características de la saliva de la boca en personas que no tienen signos de la enfermedad, lo cual permitirá entender mejor la caries dental y posibles mecanismos preventivos.

## **PROCEDIMIENTOS**

El estudio se llevará a cabo en 11 voluntarios, entre 18 y 35 años. En esta investigación necesitamos su colaboración inicialmente para definir si cumple o no con los requisitos para ser incluido/a. Para esto, deberá contestar una breve encuesta sobre su estado de salud general y consumo de medicamentos. En la siguiente etapa se le realizará un examen bucal completo con el fin de determinar si tiene o no lesiones de caries activas y si es que se encuentra en salud gingival. Si durante este proceso se diagnostica algún problema de salud oral distinto, se orientará y derivará al centro odontológico de su preferencia. Luego de esto le pediremos si puede donar 25 ml de saliva en 6 momentos del día, el cual se repetirá en 3 ocasiones distintas. Esta saliva debe ser donada en ayunas (8 horas), y con higiene dental sin uso de pasta 1 hora previa a la recolección. También, debe contestar un cuestionario en relación a cómo ha sido su dieta en las últimas 24 horas.

Para recolectar la cantidad de saliva requerida se entregará a su disposición el material pertinente para la recolección, la cual se llevará a cabo en 45 minutos aproximadamente donde deberá estar sentado, relajado, sin realizar movimientos de la boca y poner su saliva dentro de un tubo el cual está etiquetado con fecha y hora de recolección y un código ID, su nombre no será necesario. Es importante destacar que el depósito de saliva será realizado en su respectivo domicilio. Las muestras de estudio serán retiradas al día siguiente por los participantes del proyecto para ser trasladadas al laboratorio de Cariología de la Universidad donde serán procesadas. Su saliva se almacenará durante 5 años desde la fecha de su recolección, solo en caso de que se necesite repetir algunos análisis de laboratorio. Su saliva no será utilizada en otros proyectos o investigaciones. Los exámenes iniciales y el contacto directo durante el seguimiento serán realizados por colaboradores del proyecto no docentes, con quienes no existe una relación de dependencia.

Todos los procedimientos se realizarán siguiendo estrictamente los protocolos en uso para la atención odontológicas del Centro de Clínicas Odontológicas, en relación con la protección contra COVID-19.

## **RIESGOS Y MOLESTIAS**

No se predicen malestares físicos ni psicológicos para Ud. por participar en esta investigación. Sin embargo, debe tener la disponibilidad horaria para la sesión de examen bucal y para la recolección de saliva. Si se detecta alguna otra condición oral durante su examen, se le orientará en el tratamiento y se derivará donde corresponda. De constatarse molestias u otra complicación, ellas serán analizadas en primera instancia por el equipo investigador del proyecto en el Centro de Clínicas Odontológicas y si procede recibirá la atención requerida.

Cualquier hallazgo adicional que surja será comunicado personalmente, ya que estará en permanente contacto con el equipo investigador.

## **COSTOS**

Este proyecto no involucra gastos para Ud. Solo debe invertir tiempo en su examen bucal, encuesta de dieta y recolección de saliva.

## **COMPENSACIONES**

Como un incentivo usted recibirá elementos de higiene bucal para su uso personal. Usted no tendrá ningún beneficio ni repercusión o perjuicio, ya sea, acepte, rechace o revoque su participación en el estudio o debido a cualquiera sea su desempeño durante el estudio.

## **CONFIDENCIALIDAD**

Las muestras de saliva recolectada se almacenarán congeladas en el laboratorio de Cariología de la Universidad de Talca a cargo del equipo de investigación. Cada tubo estará rotulado con el código del participante, se almacenarán por un periodo de 5 años, solo en caso de que se requiera repetir algún análisis. No serán utilizadas para otras investigaciones.

Toda la información obtenida de los análisis de las muestras salivales será traspasada a una base de datos anonimizada, para su posterior análisis. Solo los investigadores tendrán acceso a esa información por medio de archivos protegidos por código de acceso y utilizando computadores también resguardados con clave de acceso. Los consentimientos y encuestas serán almacenadas en un gabinete resguardado bajo llave en la oficina del investigador responsable. Estos documentos serán resguardados por un periodo de 5 años posterior a la última publicación científica emanada de este estudio. El investigador responsable será el custodio de los documentos y los mantendrá en estricta reserva y guardados de manera segura. En caso de que los resultados sean publicados en revistas u otros medios científicos, sus datos personales no serán revelados.

## **DESTINO DEL MATERIAL OBTENIDO**

La información obtenida de este proyecto se espera utilizar en trabajos de investigación de postgrado (magister o doctorado) a la vez obtener publicaciones científicas en revistas de la disciplina, presentación en conferencias y seminarios nacionales e internacionales. Recuerde

que toda la información se mantendrá confidencial y custodiada por el investigador responsable y su identidad nunca será revelada.

### **MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Las muestras de saliva serán almacenadas congeladas por 5 años desde la fecha de recolección. No se pretende utilizar en ninguna otra investigación y se eliminarán con los protocolos de desechos biológicos y retirados por una empresa externa para su destrucción. En las muestras de saliva se analizará lo siguiente: péptidos antimicrobianos, composición química, análisis de proteínas, composición lipídica y se utilizará en un modelo de caries experimental en el laboratorio.

### **COMUNICACIÓN DE RESULTADOS**

El resultado del examen bucal y flujo salival se le informará de inmediato y personalmente. Si a ud le interesa conocer los análisis de sus muestras salivales, puede escribir un correo electrónico al Investigador Responsable Dr. Rodrigo Giacaman ([giacaman@utalca.cl](mailto:giacaman@utalca.cl)). Él también puede compartir con Ud. los artículos científicos derivados de esta investigación en caso de que le interese. Adicionalmente, se realizarán charlas de divulgación científica destinadas a comunicar los hallazgos encontrados al público general y especializados, a las cuales se invitará a los participantes.

### **COMUNICACIÓN CON EL INVESTIGADOR Y CEC**

Si tiene más preguntas se puede contactar con el investigador responsable al correo electrónico [giacaman@utalca.cl](mailto:giacaman@utalca.cl), o al siguiente número de teléfono (56-71) 2414650 o en la siguiente dirección de lunes a viernes, entre las 9.00 y las 18.00 h, Centro de Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca, Avenida Lircay S/N. Si en algún momento tiene preocupaciones sobre la forma en cómo se está realizando el estudio, puede contactarse con el Comité Ético Científico (CEC) de la Universidad de Talca al correo electrónico [cec@utalca.cl](mailto:cec@utalca.cl), o al teléfono 71 2203065, o en la siguiente dirección Avenida Lircay S/N, Campus Lircay, Talca.

Estimado/a participante, recuerde que **la decisión** de colaborar **es absolutamente suya**. **Puede aceptar** o **rechazar** participar en la investigación, e **incluso arrepentirse** de su primera decisión en el momento que usted estime conveniente para lo cual puede contactarse con el Dr. Rodrigo Giacaman en el Centro de Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca de lunes a viernes de 9:00 a 18:00 h para firmar la **hoja de revocación**.

**Desde ya muchas gracias, le saluda cordialmente**

Prof. Dr. Rodrigo Giacaman Sarah  
Investigador Responsable



## DECLARACIONES

1. He recibido una explicación satisfactoria sobre el propósito de la investigación la cual consiste en comprender la Caries y su patogenia, así como de los beneficios sociales o comunitarios que se esperan de este estudio como entender los mecanismos de protección de ciertos nutrientes y de la saliva en el desarrollo de la caries dental.
2. He sido informado/a sobre las eventuales molestias, incomodidades y riesgos de mi participación en la investigación.
3. He sido también informado/a que los procedimientos que se realicen no implican un costo que yo deba asumir, es decir, mi participación en el procedimiento no involucra un costo económico alguno para mí, a excepción de mi compromiso y tiempo destinado a los procedimientos.
4. Estoy en pleno conocimiento de que la información obtenida será manejada de manera absolutamente confidencial, esto significa que sólo el equipo investigador tendrá acceso a mis datos y nadie más. En caso de que la información obtenida del estudio sea publicada ésta se mantendrá anónima, ello significa que no aparecerá ningún dato con el que puedan identificarme en libros, revistas y otros medios de publicidad derivadas de la investigación ya descrita.
5. Sé que la **DECISIÓN** de participar en esta investigación, es **ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA**. Si no deseo participar en ella, o una vez iniciada la investigación no deseo seguir colaborando, puedo hacerlo sin tener que dar ninguna explicación. Para esto último solo debo presentarme en el Centro de Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca, con el Dr. Rodrigo Giacaman para firmar la hoja de revocación.
6. Adicionalmente, el investigador responsable, Dr. Rodrigo Giacaman ([giacaman@utalca.cl](mailto:giacaman@utalca.cl)), al siguiente número de teléfono (56-71) 2414650 y en la siguiente dirección de lunes a viernes, entre las 9.00 y las 18.00 h, Centro de Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca, Avenida Lircay S/N) ha manifestado su voluntad de aclarar cualquier duda que me surja, antes, durante y después de mi participación en la actividad.
7. Si deseo realizar mis consultas personalmente, el domicilio para estos efectos es el mismo indicado en el punto anterior.
8. También puedo contactarme con el **Comité Ético Científico** de la Universidad de Talca ([cec@utalca.cl](mailto:cec@utalca.cl), Teléfono 71-2-203065. Lunes a jueves: de 10:00-12:00 y de 15:00-17:00).

## ACEPTACIÓN

He leído el documento, las declaraciones contienen una explicación satisfactoria sobre mi participación en la investigación y sobre la necesidad de hacer constar mi consentimiento, para lo cual firmo libre y voluntariamente, recibiendo en el acto copia de este documento ya firmado.

Yo, \_\_\_\_\_, Cédula de Identidad o Pasaporte N° \_\_\_\_\_ de nacionalidad \_\_\_\_\_, mayor de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, **ACEPTO** participar en la investigación titulada: *"Efecto modulador de proteínas de la dieta y de ácidos grasos insaturados sobre las características de la saliva y de la biopelícula dental, relacionadas con caries dental"*, y **AUTORIZO** al señor Dr. Rodrigo Giacaman Sarah investigador responsable del proyecto, y/o a quienes éste designe como sus colaboradores directos y cuya identidad consta al pie del presente documento, para realizar el(los) procedimiento(s) requerido(s) por el proyecto de investigación descrito.

Fecha: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_\_ Hora: \_\_\_: \_\_\_

Firma de la persona que consiente: \_\_\_\_\_

Investigador/a responsable: \_\_\_\_\_

Nombre

Firma

Co-investigador/a 1 : \_\_\_\_\_

Nombre

Firma

Co-investigador/a 2 : \_\_\_\_\_

Nombre

Firma

## RECHAZO

He leído el documento y las declaraciones contienen una explicación satisfactoria sobre la investigación. Sin embargo, rechazo otorgar mi consentimiento, para cual firmo libre y voluntariamente el siguiente documento, recibiendo en el acto copia de éste ya firmado.

Yo, \_\_\_\_\_, Cédula de Identidad o Pasaporte N° \_\_\_\_\_ de nacionalidad \_\_\_\_\_, mayor de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, **RECHAZO** participar en la investigación titulada: *“Efecto modulador de proteínas de la dieta y de ácidos grasos insaturados sobre las características de la saliva y de la biopelícula dental, relacionadas con caries dental”* y **NO AUTORIZO** al señor Dr. Rodrigo Giacaman Sarah investigador responsable del proyecto, y/o a quienes éste designe como sus colaboradores directos y cuya identidad consta al pie del presente documento, para realizar el(los) procedimiento(s) requerido(s) por el proyecto de investigación descrito.

Fecha: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_\_ Hora: \_\_\_: \_\_\_

Firma de la persona que consiente: \_\_\_\_\_

Investigador/a responsable: \_\_\_\_\_

Nombre

Firma

Co-investigador/a 1 : \_\_\_\_\_

Nombre

Firma

Co-investigador/a 2 : \_\_\_\_\_

Nombre

Firma

## REVOCACIÓN

Mediante la presente revoco lo anteriormente firmado, para lo cual firmo este nuevo documento libre y voluntariamente, recibiendo en el acto copia de este documento ya firmado.

Yo, \_\_\_\_\_, Cédula de Identidad o Pasaporte N° \_\_\_\_\_ de nacionalidad \_\_\_\_\_, mayor de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, **REVOCO** lo anteriormente firmado.

Fecha: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_\_ Hora: \_\_\_: \_\_\_

Firma de la persona que consiente: \_\_\_\_\_

Investigador/a responsable: \_\_\_\_\_  
Nombre Firma

Co-investigador/a 1 : \_\_\_\_\_  
Nombre Firma

Co-investigador/a 2 : \_\_\_\_\_  
Nombre Firma

**Anexo N°2: Protocolo de toma de muestra de flujo salival no estimulado**

# **Protocolo Toma de Muestra Flujo Salival**

## **NO ESTIMULADO**

### **INDICACIONES GENERALES AL PACIENTE**

1. Las 72 horas previas al día de recolección se debe seguir una alimentación en base a dieta mediterránea.
2. Durante estas 72 horas debe efectuar el cepillado con la pasta dental provista por el equipo investigador.
3. **La toma de muestra de saliva debe ser con un ayuno de al menos 8 horas**
4. No haber comido al menos 1 hora antes de cada recolección, de ser necesario, solo haber bebido agua, no más de 200 cc (1 taza).
5. **Día de recolección de saliva:** El cepillado de dientes debe haber sido realizado luego de la última comida realizada la noche anterior. En la mañana puede cepillarse 1 hora antes de la recolección **sin pasta dental**.
6. Cada voluntario debe cepillarse 1 hora previo a cada una de las tomas de muestras de saliva del día sin la utilización de pasta dental.
7. No consumir alcohol ni fumar al menos 48 horas previas al día de recolección.
8. Durante el estudio se recomienda tomar al menos 2 litros de agua al día.
9. Los días de recolección de saliva se debe seguir las dietas estrictas (Minutas anexadas).
10. Los horarios de la recolección serán en 6 tiempos distintos (7AM/ 11AM/ 15PM/ 19PM/ 23PM/ 3AM)
11. Se debe disponer de al menos 45 minutos para realizar la recolección de saliva. El tiempo puede variar según su flujo salival (aumentar o disminuir).
12. **Se debe lograr como mínimo 25 mL de saliva SIN considerar la espuma generada.**

**Nota:** las instrucciones deben ser dadas al paciente de forma clara y precisa, verificando que las haya entendido correctamente.

- **Materiales a utilizar**
  - ✓ Cronómetro (puede utilizar el cronómetro de su celular).
  - ✓ Tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 mL graduados limpios, los cuales deben ir marcados con la codificación asignada a cada voluntario.
  - ✓ Bolsa plástica con cierre hermético (tipo Ziploc).
  - ✓ Kit Colorimétrico para medición de pH.
  - ✓ Alimentos necesarios para dieta mediterránea.
  - ✓ Tabla de registro.
  - ✓ Pasta Dental de 1100-1500 ppm de flúor.

## ■ Recolección de flujo salival **No estimulado**

- Posterior a la entrega de los tubos para la recolección de saliva, los participantes deberán mantenerlos refrigerados (no congelados) y sacarlos a medida que se vayan utilizando ya que contendrán inhibidor de proteasas.
- Antes de comenzar el voluntario debe estar tranquilo y relajado, sentado con su espalda recta con la cabeza ligeramente inclinada hacia adelante para que pueda ser recolectada la saliva de forma pasiva.
- Durante la recolección, el voluntario debe mantener los ojos abiertos.
- El tiempo de recolección será de **45 minutos aproximadamente**. El volumen de saliva a recolectar debe ser de al menos 25 mL, cantidad marcada en los tubos de recolección, si no alcanza los 25 mL, debe continuar hasta lograr el volumen necesario.
- Durante la recolección, TODA la saliva producida en los 45 minutos se debe depositar en el tubo de manera PASIVA, directamente poniendo labios en contacto con la boca del tubo. NO debe ingerir su propia saliva.
- **NO DEBE hablar, ni realizar movimientos mandibulares durante la recolección,** para no estimular las glándulas salivales.
- Al momento de verificar el volumen de saliva se debe excluir la espuma formada.
- Una vez completado la cantidad de mL solicitados (25 mL), se debe introducir una tira reactiva colorimétrica dentro del tubo, sumergiendo todos los recuadros de colores, dejando un extremo libre para sostener la tira de forma adecuada, por 5 segundos. Luego debe retirar la tira y esperar 10 segundos para determinar el valor del pH. Esto último se lleva a cabo comparando el coloreado de la tira con el patrón de colores incluido en el kit.
- **Registrar pH de la muestra y tiempo de recolección en la tabla de registros.**
- El voluntario debe almacenar INMEDIATAMENTE el tubo en el freezer (área de congelación, a -20°C) dentro de bolsa plástica de cierre hermético.
- Al día siguiente de la recolección de saliva, una persona perteneciente al equipo de trabajo retirará los tubos para trasladarlos dentro de una unidad refrigerante al laboratorio para su posterior análisis.

### Anexo N°3: Protocolo de dieta

1. Evaluación del estado nutricional
2. Según estado nutricional, realizar cálculo de requerimientos de macro y micronutrientes según grupo etario, con formula Mifflin St Jeor de Gasto Energético en Reposo (GER) modificada con factor de actividad física, del método FAO/OMS/UNU

GER Hombre:  $10 (\text{Peso}) + 6.25 (\text{Talla}) - 5 (\text{Edad}) + 5$

GER Mujer:  $10 (\text{Peso}) + 6.25 (\text{Talla}) - 5 (\text{Edad}) - 161$

ACTIVIDAD	HOMBRES	MUJERES	ACTIVIDAD FÍSICA
<b>Sedentaria</b>	1,2	1,2	Sin actividad
<b>Liviana</b>	1,55	1,56	3 horas semanales
<b>Moderada</b>	1,8	1,64	6 horas semanales
<b>Intensa</b>	2,1	1,82	4 a 5 horas diarias

3. Distribución de la molécula calórica según recomendaciones OMS

Con valor calórico total

Macronutriente	Recomendación
Proteína	0,8-1 g/kg peso/día
Lípidos	Menor al 30%
Carbohidratos	Por diferencia
Micronutrientes	Según recomendaciones grupo etario

Distribución de la Molécula Calórica

Tiempo de comida	Distribución de la molécula calórica
Desayuno	20-25%
Almuerzo	25-30 %
Once	15 – 20%
Cena	20 – 25%
Colación (según habito)	5-10 %

4. Aplicar Encuesta recordatorio 24 horas ER24H
5. Según hábitos alimentarios, tiempos de comida, actividad física y requerimientos nutricionales, se prescribirá una dieta normo calórica adecuada para el grupo etario al que pertenece.
6. Se entregará información referente a la ley de etiquetado nutricional, para autorregulación de consumo de alimentos procesados.

### Propuesta minuta ejemplo

Para un adulto sano con peso promedio 65k, talla promedio 1,71 metros y edad promedio 26,5 años

Según fórmula Mifflin st Jeor

$$10 * 65 + 6,25 * 171 - 5 * 26,5 + 5 = 650 + 1068,75 - 132 + 5 = 1592 \text{ kcal} * \text{f. actividad liviana (1,5)} = 2390 \text{ cal}$$

Macronutriente	Recomendación		%
Proteína	0,8-1 g/kg peso/día	65 g	10.9%
Lípidos	Menor al 30%	80 g	30%
Carbohidratos	Por diferencia	353g	59.1%
Micronutrientes	Según recomendaciones grupo etario		

#### Distribución de la Molécula Calórica

Tiempo de comida	Distribución de la molécula calórica	Calorías	Proteínas	Lípidos	CHO
Desayuno	25 %	598	16,25	20	88,3
Almuerzo	25 %	598	16,25	20	88,3
Once	20 %	382	13	16	70,6
Cena	20 %	382	13	16	70,6
Colación (según habito)	5%	120	3,3	4	17,7
Colación (según habito)	5 %	120	3,3	4	17,7



## Minuta de dieta para el día de la recolección:



	ALIMENTO O INGREDIENTES	MEDIDA CASERA	GR/CC APROX	CALORIAS	PROTEINAS	LIPIDOS	CHO
DESAYUNO	Leche semidescremada	1 Taza	200cc	90	6	3.6	9
	Pan marraqueta integral	1 Unidad (2 dientes)	100g	280	6	2	60
	Huevo Cocido	1 Unidad	50g	80	6	5	2
	Aceite de oliva	1 ctda	6ml	54	0	6	0
	Plátano+ kiwi / frutilla frambuesa	1 taza	150g	100	0	0	25
	Total Tiempo de comida				604	18	16.6
ALMUERZO	Ensalada 2 colores (apio/pepino/repollo/lechuga/espinaca/zapallo Italiano/betarraga/zanahoria)	2 Taza	200g	100	0	0	25
	Aceite de oliva	1 1/2 ctda	9ml	81	0	9	0
	Carne de pollo al horno	1 trozo(palma)	60g	100	13.4	5	0
	Fideos cocidos	3/4 Taza	150g	190	4	1	40
	Crema de leche	2 cdas	20g	50	0	5.3	1
	Fruta (durazno/naranja/manzana)	1 Unidad	150g	90	0	0	22.5
	Total Tiempo de comida				611	17.4	20.3
ONCE	Té sin azúcar	1 Taza	200cc	0	0	0	0
	Pan marraqueta integral	1 Unidad (2 dientes)	100g	280	6	2	60
	Pasta de pollo/morrón	2 cdas	25g	40	3	2.5	1
	Tomate	1/2 Unidad	60g	20	0	0	5
	Aceite de oliva	1ctda	6ml	54	0	6	0
Total Tiempo de comida				394	9	10.5	66

# PROTOCOLO DE DIETA

VOLUNTARIOS ESTUDIO "RITMO  
CIRCADIANO" 2021



	ALIMENTO O INGREDIENTES	MEDIDA CASERA	GR/CC APROX	CALORIAS	PROTEINAS	LIPIDOS	CHO
CENA	Ensalada 2 colores (betarraga/zanahoria/tomate/coliflor)	2 Taza	200g	100	0	0	25
	Aceite de oliva	1 ctda	6ml	54	0	6	0
	Pescado al jugo (salmón/jurel)	1 Trozo (palma)	60g	130	13.4	8.3	0
	Fruta (1 plátano)	1 Unidad	150g	150	1	2	35
	Total Tiempo de comida				434	14.4	16.3
COLACIÓN	Yogurt sin azúcar descremado	1 Unidad	125g	85	5	0	6
	Pasas	20 Unidades	25g	74	0.5	0	18
	Avena (nueces/almendras/avellanas/maní)	15 Unidades 1/4 de taza	25g	175	5	15	5
	Total Tiempo de comida				334	10.5	15
<b>Totales/ Día</b>				<b>2377</b>	<b>69.3</b>	<b>78.7</b>	<b>339.5</b>

## **Anexo N°4: Precipitación de proteínas con Acido tricloroacético (TCA)**

### **Materiales necesarios:**

- TCA
- Acetona pura

### **Procedimiento:**

- Agregar inhibidor de proteasa al tubo y centrifugar a 3000g por 15 minutos
- Pipetear 1,0 mL de muestra a precipitar en Eppendorf
- Añadir 100 uL de TCA al 100% (4°C) y vortear
- Dejar las muestras a -20°C por 15 minutos
- Centrifugar a 10.000 g por 15 minutos
- Rápida y cuidadosamente aspirar el sobrenadante sin romper el pellet
- Añadir 500 uL de acetona pura fría y centrifugar a 10.000 g por 15 minutos. Se debe repetir este proceso 3 veces
- Dejar secar el pellet por 10 minutos
- Re suspender las muestras en 300 uL de PBS enriquecido con SDS al 1%

### Curva de Calibración Albúmina

1. El STD de BSA de 2mg/mL (ya viene listo en ampollas de 1 mL en el kit).
2. Prepare solución de trabajo, mezclando en relación 50:1  
Ejemplo en relación 50 mL RxA + 1 mL Rx
3. Para preparar el WR es necesario cuanto ocupar, para esto se ocupa la siguiente formula:  
 $(N^{\circ} \text{ de estandar} + \text{Muestras}) \times (\text{triplicado}) \times (0,2\text{mL})$

**Realice la curva de calibración según la siguiente tabla.**

<b>Tubo</b>	<b>[ ] ug/mL</b>	<b>H2Op (ul)</b>	<b>STD BSA (ul)</b>
<b>A</b>	2000	0	300
<b>B</b>	1500	125	375
<b>C</b>	1000	325	325
<b>D</b>	750	175	175 tubo B
<b>E</b>	500	325	325 tubo C
<b>F</b>	250	325	325 tubo E
<b>G</b>	125	325	325 tubo F
<b>H</b>	25	400	100 tubo G
<b>I</b>	0	400	0

4. Vortear
5. Tomar una alícuota de 25ul
6. WR (ul): 200
7. Mezclar por 30 segundos.
8. Incubar 30 min a 37°C en oscuridad
9. Tomar 100 ul de la muestra y poner en una placa de pocillos
10. Leer en el lector de microplacas (espectrofotómetro NanoQuant) a 562 nm.
11. Posterior a la obtención de los resultados de absorbancia a partir de la concentración conocida de la curva de albumina, se debe calcular en la planilla de Excel la concentración de proteínas de las muestras.

## Anexo N°5: Electroforesis

### 1.- Preparación de geles

#### INDICACIONES GENERALES

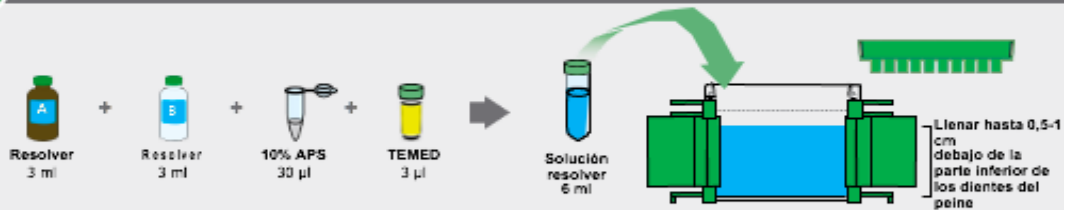
Para la preparación del gel de poliacrilamida al 12%, debe seguir las indicaciones del fabricante:

#### Como moldear sus geles rápidamente

Esta guía rápida ilustra cómo moldear un gel individual con TGX de Bio-Rad™ y TGX Stain-Free™ FastCast™ kits de acrilamida con placas de vidrio Bio-Rad de 1,0 mm.

Para moldear varios geles con estos kits con placas de vidrio Bio-Rad de 1,0 mm, multiplique las cantidades siguientes por el número de geles que desee. Para obtener información sobre el uso de otras configuraciones de fundición, consulte la Tabla 2 en el manual de instrucciones.

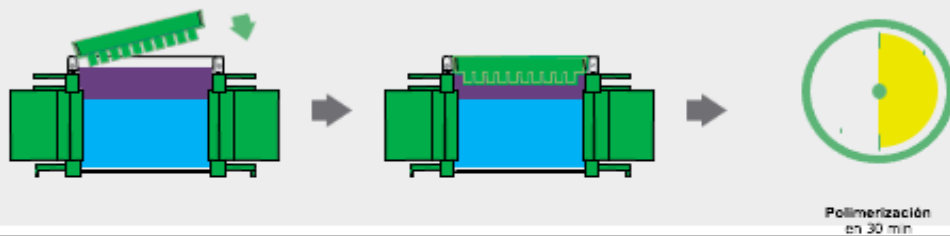
#### 1 Prepare la solución de resolver



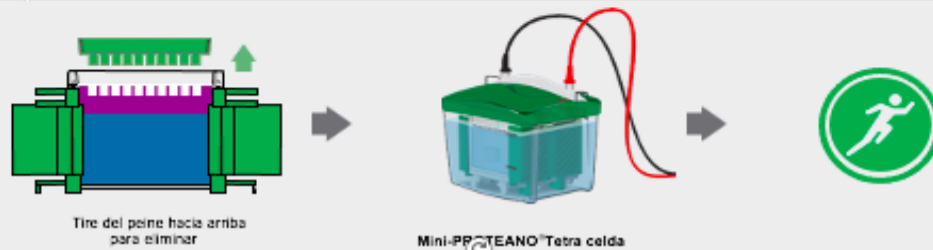
#### 2 Prepare la solución del stacker



#### 3 Inserte el peine y permita la polimerización



#### 4 Ejecutar Gel



## **Preparación de reactivos para electroforesis:**

### 1.- Preparación de Buffer reductor SDS:

Materiales:

- 3.55 ml de agua destilada
- 1.25 ml de TRIS-HCL 0,5 M, pH 6.8
- 2.5 ml de glicerol
- 2.0 ml 10% (peso/volumen) SDS
- 0.2 ml 0,5% (peso volumen) de azul de Bromofenol.
- 9.5 ml de volumen total

Almacenar a temperatura ambiente. Añadir 50 ul de B-mercaptoetanol a 950 ul de muestra buffer antes de su uso. Diluir las muestras al menos 1:2 con la muestra buffer y calentarla a 95 °C por 4 min.

### 2.- Preparación de buffer de corrida 10X, 1 litro, pH 8,3.

Para un litro se debe tener: 30,3 gr de Tris Base

144,0 gr de glicina

10 gr de SDS.

Posterior a esto, lo obtenido se disuelve y se lleva el volumen de 1 litro con agua destilada. No se debe ajustar con ácido o base. Conservar a 4°C. Si se producen precipitaciones calientes a temperatura ambiente antes de usar. Alternativamente se puede usar tampón de ejecución de electroforesis 10x Tris/ Glicina/ SDS en el cubo de 5 litros (catalogo Biorad #161-0772).

Uso: diluir 50 ml de stock 10x con 450 ml de agua desionizada para cada ciclo de electroforesis. Mezclar bien antes de usar

### 3.- Preparación de APS al 10% (Peso/volumen) preparado del día:

100 mg de persulfato de amonio se disuelve en 1ml de agua destilada

3.- Para la realización del cálculo de la preparación de la muestra para realizar la electroforesis se debe realizar:

- a) La cuantificación de la concentración de proteínas
- b) Mediante dicha concentración realizar el cálculo de la cantidad de muestra a utilizar, dependiendo de la cantidad de ug de proteínas que se requiera, utilizando la siguiente formula:  $15 \text{ mg} \times 1000 / \text{concentración de proteínas}$
- c) Calcular la cantidad de buffer de 4x, mediante la siguiente formula:  $\text{muestras a usar} / 3$
- d) Calcular la cantidad de buffer al 2x ( $35 - \text{buffer 4x} - \text{muestras a usar}$ )
- e) Se debe agregar la mitad de agua destilada y la mitad de buffer al 2x para completar la cantidad para buffer 1x a utilizar.
- f) Elevar la temperatura de las muestras a los 95°C
- g) Cargar mediante micropipeta los pocillos del gel con la cantidad de uL de muestra requeridos.

#### 4.- PREPARACION DE BUFFER 2x y 4x:

### Product Information

Catalog # Description

#### Premixed Sample Buffers

161-0737	2x Laemmli Sample Buffer, 30 ml
161-0747	4x Laemmli Sample Buffer, 10 ml
161-0710	2-Mercaptoethanol, 25 ml
161-0738	Native Sample Buffer, 30 ml
161-0739	Tricine Sample Buffer, 30 ml
161-0767	5x Nucleic Acid Sample Buffer, 10 ml
161-0768	TBE-Urea Sample Buffer, 30 ml
161-0763	IEF Sample Buffer, 30 ml
161-0764	Zymogram Sample Buffer, 30 ml

#### Premixed Buffers

161-0732	10x Tris/Glycine/SDS, 1 L
161-0772	10x Tris/Glycine/SDS, 5 L
161-0734	10x Tris/Glycine, 1 L
161-0771	10x Tris/Glycine, 5 L

*Bio-Rad Laboratories, Inc.*

2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547 USA  
510-741-1000

4006028 Rev J

## 2x Laemmli Sample Buffer

Catalog #161-0737

## 4x Laemmli Sample Buffer

Catalog #161-0747

**BIO-RAD**

### Introduction

Bio-Rad's Laemmli sample buffers are based on the method of Laemmli (1970). The use of Laemmli sample buffers ensures optimal band resolution when preparing proteins for SDS-PAGE with Tris-glycine-SDS running buffer.

### Formulations

<b>2x Laemmli sample buffer</b>	65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8 26.3% (w/v) glycerol 2.1% SDS 0.01% bromophenol blue
<b>4x Laemmli sample buffer</b>	277.8 mM Tris-HCl, pH 6.8 44.4% (w/v) glycerol 4.4% LDS 0.02% bromophenol blue
<b>Storage</b>	Room temperature
<b>Shelf life</b>	2 years from date of manufacture

### Instructions for Use

#### 1. Add Reducing Agent

To obtain a final 1x concentration of 355 mM 2-mercaptoethanol

**2x Laemmli sample buffer:** Add 50  $\mu$ l of 2-mercaptoethanol per 950  $\mu$ l.

**4x Laemmli sample buffer:** Add 100  $\mu$ l of 2-mercaptoethanol per 900  $\mu$ l.

Alternatively, add dithiothreitol (DTT or Cleland's reagent) to a final 1x concentration of 50 mM.

**Note:** For best results, do not store sample buffer with 2-mercaptoethanol.

#### 2. Dilute Sample

**2x Laemmli sample buffer:** Dilute 1 part sample with 1 part 2x Laemmli sample buffer.

**4x Laemmli sample buffer:** Dilute 3 parts sample with 1 part 4x Laemmli sample buffer.

More sample buffer can be added if necessary.

### Reference

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227. 680-685.



# TGX™ and TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit and Starter Kit Instruction Manual

TGX and TGX Stain-Free FastCast acrylamide kits are solutions for hand casting gels for SDS-PAGE or PAGE use. The unique formulation enables:

- Ability to cast resolving and stacking gels at the same time and start running your gels in as little as 30 min
- Ability to conduct electrophoretic runs as fast as 20 min (at 300 V) without damage to the handcast gels
- Efficient protein transfers onto blot in as little as 3 min (using the Trans-Blot® Turbo™ blotter)
- 1 year of shelf life at room temperature (22–28°C) for acrylamide solutions and up to 4 weeks at 4°C for cast gels
- Stain-free visualization of proteins in your gel or blot in less than 5 min with TGX Stain-Free kits
- Ability to monitor your electrophoresis and transfer steps without additional staining using TGX Stain-Free kits

**Table 1. Approximate number of gels per kit.**

	Mini Gels (~9 x 7 cm)				Midi Gels (~13 x 9 cm)
	1.0 mm Mini-PROTEAN® Cassettes	0.75 mm Glass Plates	1.0 mm Glass Plates	1.5 mm Glass Plates	1.0 mm Criterion™ Cassettes
Starter Kit	11 gels	19 gels	13 gels	9 gels	6 gels
Kit	55 gels	95 gels	65 gels	45 gels	30 gels

When casting different numbers of gels, prepare the solutions according to Table 2 and follow the instructions.

The starter kits enable mixing the stacker A and B and resolver A and B solutions without calculation and casting at least 10 Mini-PROTEAN gels at one time.

Note: After adding APS and TEMED to the resolver solution mixture, casting should be started immediately and combs inserted within 8–9 min. To ensure sufficient time to insert combs, do not cast more than 10 gels at one time.

**Table 2. Casting preparation volumes.**

	1.0 mm Mini-PROTEAN Empty Cassettes (n = gels)		0.75 mm Bio-Rad Glass Plates (n = gels)		1.0 mm Bio-Rad Glass Plates (n = gels)		1.5 mm Bio-Rad Glass Plates (n = gels)		1.0 mm Criterion Empty Cassettes (n = gels)	
	Stacker	Resolver	Stacker	Resolver	Stacker	Resolver	Stacker	Resolver	Stacker	Resolver
Resolver A	–	3.5 ml x n	–	2 ml x n	–	3 ml x n	–	4 ml x n	–	6 ml x n
Resolver B	–	3.5 ml x n	–	2 ml x n	–	3 ml x n	–	4 ml x n	–	6 ml x n
Stacker A	1 ml x n	–	1 ml x n	–	1 ml x n	–	1.5 ml x n	–	1.5 ml x n	–
Stacker B	1 ml x n	–	1 ml x n	–	1 ml x n	–	1.5 ml x n	–	1.5 ml x n	–
Total Volume	2 ml x n	7 ml x n	2 ml x n	4 ml x n	2 ml x n	6 ml x n	3 ml x n	8 ml x n	3 ml x n	12 ml x n
TEMED	2 µl x n	3.5 µl x n	2 µl x n	2 µl x n	2 µl x n	3 µl x n	3 µl x n	4 µl x n	3 µl x n	6 µl x n
10% APS	10 µl x n	35 µl x n	10 µl x n	20 µl x n	10 µl x n	30 µl x n	15 µl x n	40 µl x n	15 µl x n	60 µl x n

## Instructions

1. Prepare resolving gel acrylamide solution by combining equal volumes of resolver A and B solutions (see Table 2).  
Note: To use all the solutions from the starter kits, pour 40 ml resolver B solution directly into the larger amber bottle containing 40 ml resolver A solution.
2. If using the Mini-PROTEAN plastic cassettes, they should be held vertically for gel casting. Use the single-row AnyGel™ casting stand (catalog #165-4131) to stabilize the cassette during casting. For Bio-Rad handcast glass plates, use the Mini-PROTEAN Tetra cell casting stand (catalog #165-8051 or #165-8052) to stabilize the plates during casting.
3. Add the required volume of TEMED and freshly made 10% APS to the combined resolver solution and mix well. Use an appropriate pipet to steadily dispense the solution into the cassette. Do not let bubbles form or solution mix with air. Fill the cassette to 0.5–1 cm below the bottom of the teeth on the comb. Immediately prepare and pour the stacking solution as directed in the next steps.  
Note: Insert a comb and mark the cassette to ensure the resolving solution is poured to the desired distance below the comb.  
Note: For the combined resolving gel solutions from the starter kits, add 40 µl of TEMED and 400 µl of freshly made 10% APS.
4. Prepare stacking gel acrylamide solution by combining equal volumes of stacker A and B solutions (see Table 2).  
Note: To use all the solutions from the starter kits, pour the 15 ml stacker B solution directly into the larger amber bottle containing 15 ml stacker A solution.
5. Add required volume of TEMED and freshly made 10% APS to the combined stacker solution and mix well. Pipet solution down the middle of the cassette, filling to the top of the short plates. Apply slowly and steadily to prevent mixing with the resolving solution. Align and insert the comb in the cassette carefully to prevent air from being trapped under the comb teeth. Allow the gel to polymerize for 30–45 min before electrophoresis.  
Note: For the combined stacking gel solutions from the starter kit, add 30 µl of TEMED and 150 µl of freshly made 10% APS.



- The cast gels can be covered with a paper towel wetted with deionized water and stored in a zipper sealed plastic bag at 4°C for up to 4 weeks.
- Follow the guideline below for gel electrophoresis, stain-free imaging, and western blot transfer. Refer to the Mini-PROTEAN Precast Gels Instruction Manual and Application Guide (#1658100) for details on running, handling, and other applications of TGX and TGX Stain-Free gels.

Use Laemmli sample buffer (with or without reducing agents such as BME) to prepare samples for loading and 1x Tris/glycine/SDS running buffer to run the TGX gels.

**Table 3. Running conditions for handcast TGX or TGX Stain-Free SDS-PAGE gels in the Mini-PROTEAN Tetra cell.**

	100 V Low voltage	200 V Standard	300 V Rapid
Run time	85–95 min	30–40 min	20–25 min
Lower chamber buffer volume (for 2 gels)	550 ml	550 ml	800 ml
Lower chamber buffer volume (for 4 gels)	800 ml	800 ml	800 ml

**Note:**

- When running only 1–2 gels in the Mini-PROTEAN Tetra cell, do not leave the companion module in the tank
- Do not run different gel types (chemistry) or percentages in the same tank at the same time

**Table 4. Stain-Free gel activation using a Bio-Rad Stain-Free enabled imager.**

	Gels used in Blotting	Good* Sensitivity	Best* Sensitivity
Activation time	1 min	2.5 min	5 min

\* For gels not used in blotting.

**Note:**

- Must activate stain-free compound in gel for stain-free blot imaging
- Stain-free activation protocols can be accessed in Bio-Rad's Image Lab™ software

**Table 5. Transfer conditions for blotting in the Trans-Blot Turbo system.**

Protocol Name	MW, kD	Time, min	2 Mini Gels or 1 Midi Gel	1 Mini Gel
Standard SD	Any	30	Up to 1.0 A; 25 V, constant	
1.5 mm gel	Any	10		
High MW	>150	10	2.5 A constant up to 25 V	1.3 A constant up to 25 V
Low MW	<30	5		
Mixed MW*	5–150	7		
1 Mini TGX*	5–150	3	N/A	2.5 A constant up to 25 V

\* Also accessed via Turbo navigation button.

Precision Plus Protein standards are sold under license from Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, for use only by the buyer of the product. The buyer is not authorized to sell or resell this product or its components.

**Ordering Information**

Catalog #	Description
161-0170	TGX™ FastCast™ Acrylamide Starter Kit, 7.5%
161-0171	TGX FastCast Acrylamide Kit, 7.5%
161-0172	TGX FastCast Acrylamide Starter Kit, 10%
161-0173	TGX FastCast Acrylamide Kit, 10%
161-0174	TGX FastCast Acrylamide Starter Kit, 12%
161-0175	TGX FastCast Acrylamide Kit, 12%
161-0180	TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Starter Kit, 7.5%
161-0181	TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 7.5%
161-0182	TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Starter Kit, 10%
161-0183	TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10%
161-0184	TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Starter Kit, 12%
161-0185	TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12%
161-0700	Ammonium Persulfate (APS), 10 g
161-0800	TEMED, 5 ml

**All cell systems are 4-gel with 2 casting stands, 4 casting frames, 10-well combs, 5 short plates, and 5 spacer plates.**

165-8000	Mini-PROTEAN® Tetra Cell and System, 0.75 mm gel thickness
165-8001	Mini-PROTEAN Tetra Cell and System, 1.0 mm gel thickness
165-8006	Mini-PROTEAN Tetra Cell and System, 1.5 mm gel thickness

**Standards Value Pack (5 Packs)**

161-0393	Precision Plus Protein™ All Blue Standards; 10–250 kD
161-0394	Precision Plus Protein Dual Color Standards; 10–250 kD
161-0395	Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards; 10–250 kD
161-0397	Precision Plus Protein Dual Xtra Standards; 2–250 kD
161-0396	Precision Plus Protein Unstained Standards; 10–250 kD

161-0737	2x Laemmli Sample Buffer, 30 ml
161-0747	4x Laemmli Sample Buffer, 10 ml
161-0772	10x Tris/Glycine/SDS Buffer, 5 L

**Mini-PROTEAN Empty Cassettes and Combs, pkg of 50**

456-0001	Mini-PROTEAN Empty Cassettes, IPG well marks
456-0003	Mini-PROTEAN Empty Cassettes, 10-well marks
456-0005	Mini-PROTEAN Empty Cassettes, 12-well marks
456-0006	Mini-PROTEAN Empty Cassettes, 15-well marks
456-0011	Mini-PROTEAN Combs, IPG well combs
456-0013	Mini-PROTEAN Combs, 10-well combs
456-0015	Mini-PROTEAN Combs, 12-well combs
456-0016	Mini-PROTEAN Combs, 15-well combs

**Criterion Empty Cassettes, pkg of 10 cassettes with combs**

345-9901	Criterion Empty Cassettes, 12+2 well
345-9902	Criterion Empty Cassettes, 18-well
345-9903	Criterion Empty Cassettes, 26-well
345-9904	Criterion Empty Cassettes, Prep+2
345-9906	Criterion Empty Cassettes, IPG+1

\* Please see the accessories tab on [www.bio-rad.com/tetra](http://www.bio-rad.com/tetra) for individual handcast products.



Bio-Rad  
Laboratories, Inc.



Life Science  
Group

Web site [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) USA 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 01 877 89 01 Belgium 09 385 55 11 Brazil 55 11 5044 5699  
Canada 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 420 241 430 532 Denmark 44 52 10 00 Finland 09 804 22 00  
France 01 47 95 69 65 Germany 069 31 884 0 Greece 30 210 9532 220 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 36 1 459 6100 India 91 124 4029300  
Israel 03 963 6050 Italy 39 02 216091 Japan 03 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 0318 540666  
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 23 38 41 30 Poland 48 22 331 99 99 Portugal 351 21 472 7700 Russia 7 495 721 14 04  
Singapore 65 6415 3188 South Africa 27 861 246 723 Spain 34 91 590 5200 Sweden 08 555 12700 Switzerland 026674 55 05  
Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 800 88 22 88 United Kingdom 020 8328 2000