



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE REHABILITACION BUCO-MAXILOFACIAL**

**INFLUENCIA DEL RITMO CIRCADIANO SOBRE EL pH Y CONCENTRACIÓN
DE CALCIO Y FOSFATO INORGANICO EN ADULTOS JOVENES
ESTUDIO CLÍNICO**

*INFLUENCE OF THE CIRCADIAN RATE ON pH AND CALCIUM AND INORGANIC PHOSPHATE
CONCENTRATION IN YOUNG ADULTS. CLINICAL STUDY*

Proyecto financiado por: FONDECYT Regular 1210188

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: JUAN FRANCISCO REYES PARRAGUEZ
MARÍA ELISA VALENZUELA ARAVENA
PROFESOR GUÍA: DR. RODRIGO GIACAMAN SARAH
PROFESOR CO-GUÍA: TM NATALIA GARCIA MARTINES**

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

Nombre del profesor guía
RODRIGO A. GIACAMAN SARAH
ORCID del profesor guía
https://orcid.org/0000-0003-3362-5173
Google Scholar del profesor guía
https://scholar.google.com/citations?user=Oa_CitgAAAAJ&hl=es
Correo electrónico del profesor guía
giacaman@utalca.cl

CERTIFICADOS DE PRESENTACIÓN EN CONGRESOS CEVEO

Dedicado a nuestras familias, amigos y docentes que confiaron y creyeron en nosotros, especialmente al Dr. Rodrigo Giacaman por acompañarnos y guiarnos en esta última etapa de nuestra formación.

AGRADECIMIENTOS

Concluyendo esta etapa, no puedo dejar de agradecer a todas las personas que estuvieron conmigo estos 7 años, entregándome su apoyo incondicional para poder cerrar este ciclo, de verdad me siento realmente afortunada de tenerlos. En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, abuelos, mi hermana y especialmente a mis padres, quienes siempre creyeron en mis capacidades y acompañaron en todo momento; a mi mejor amiga, que siempre me dio ánimos y confió en mí más que nadie; a mis lobitos, quienes se convirtieron en una segunda familia a quienes amo infinitamente, son el regalo más lindo que me dejó la universidad. Finalmente, me gustaría agradecer a nuestro docente y especialmente al equipo del laboratorio, quienes con paciencia nos enseñaron y ayudaron para sacar esta investigación adelante.

Estoy infinitamente agradecida con todos ellos, sin su apoyo este camino hubiera sido aún más difícil.

María Elisa Valenzuela Aravena

¿Soy el mismo de hace siete años? Pareciera recordar mi mochila algo más cargada en el pasado, ¿Dónde quedaron todas esas inseguridades?, las confusiones propias de empezar un nuevo ciclo, ¿Qué pasó? con el miedo al fracaso que tanto aquejó mis primeros años de carrera. Hoy me doy cuenta de que muchos de esos temores no han desaparecido, pero poco a poco se han vuelto más pequeños, casi insignificantes, porque a diferencia de antes ya no me siento solo.

Agradecer al Dr. Rodrigo Giacaman por permitirme ser parte de este proyecto, por la confianza entregada y por fomentar en mí el deseo de aventurarme. A Natalia y Felipe quienes son parte importante y fundamental de todo el trabajo realizado. A mi familia que sin duda son los que me definen como persona, gracias por permitirme soñar, por ser mi pilar y sostén. Agradecer a mi manada que me ha acompañado en todo este proceso, que guiaron mis pasos, y socorrieron a mis obstáculos, amigos que sin los cuales ya me hubiera perdido en el camino hace bastante tiempo. A mi compañera de tesis, no hay mejor persona con la cual hubiera preferido finalizar esta etapa

A todas las personas que hoy en día hacen que la mochila que llevo sea mucho más ligera.

Juan Francisco Reyes Parraguez

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1.1. Palabras clave.....	1
2. ABSTRACT	2
2.1. Keywords.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. OBJETIVOS	5
4.1. Objetivo general.....	5
4.2. Objetivos específicos.....	5
5. MÉTODOS	6
5.1. Diseño general.....	6
5.2. Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de la saliva (Estudio de estabilidad).....	6
5.2.1. Variaciones de pH en intervalos de tiempo reducido.....	7
Inhibidor de proteasas	7
Temperatura y tiempo de almacenamiento:.....	7
5.2.2. Variaciones de pH en tiempos extendidos	8
Temperatura y tiempo de almacenamiento.	8
5.3. Análisis del pH, Ca ²⁺ y PO ₄ ³⁻ durante el ritmo circadiano	9
Sujetos.....	9
Estandarización de la dieta y la higiene oral para controlar su efecto sobre el ritmo circadiano. ..	9
Obtención y manejo de la saliva en los tiempos establecidos del ritmo circadiano.	10
Procesamiento de las muestras de saliva.	11
5.3.1. Análisis de muestras	12
Determinación de los valores de pH de las muestras de saliva no estimulada.	12
Determinación de concentraciones de Ca ⁺² y PO ₄ ³⁻ en muestras de saliva no estimulada.	12
5.4. Análisis estadístico	13
6. RESULTADOS.....	14
6.1. Variabilidad de pH en cortos periodos de tiempo según variable en estudio	14
Medición de la variación de pH salival influenciado por Inhibidor de proteasas	14
Medición de la variación de pH salival influenciado por la temperatura y tiempo	14
Variabilidad de pH a largo plazo de acuerdo a temperatura de almacenamiento	15

6.2.	Influencia del Ritmo Circadiano en las características de la saliva no estimulada.....	16
	Efecto del ritmo circadiano sobre pH Salival.....	16
	Efecto del Ritmo Circadiano sobre la concentración de Ca^{+2}	17
	Efecto del Ritmo Circadiano sobre la concentración de PO_4^{3-}	19
7.	DISCUSIÓN.....	21
8.	REFERENCIAS.....	27
9.	ANEXOS.....	31
	Anexo N°1: Consentimiento informado para voluntarios de estudio.....	31
	Anexo N°2: Protocolo de toma de muestra de flujo salival no estimulado.....	39
	Anexo N°3: Protocolo de dieta.....	41
	Anexo N°4: Protocolo de dieta.....	45

1. RESUMEN

La saliva es un fluido biológico con importantes propiedades protectoras, incluyendo su capacidad amortiguadora del pH y favorecedora de la remineralización. Se ha descrito que los componentes salivales varían durante el día a causa de múltiples factores, incluyendo el ritmo circadiano. Sin embargo y pese a su importancia como regulador de la salud y el metabolismo humano, la evidencia disponible es limitada sobre su influencia en la composición salival. El objetivo del estudio fue determinar si el ritmo circadiano induce variaciones sobre el pH y la concentración de calcio (Ca^{2+}) y fosfato inorgánico (PO_4^{3-}) en saliva no estimulada de adultos jóvenes. Para cumplir los objetivos definidos se realizaron pruebas preliminares para determinar las condiciones adecuadas para mantener la integridad de las muestras, usando el pH salival como variable indicadora. Una vez definidas las condiciones óptimas, se determinó el efecto del ritmo circadiano sobre el pH y en la concentración de Ca^{2+} y PO_4^{3-} en saliva total no estimulada de 11 voluntarios adultos jóvenes en 6 intervalos durante un periodo 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 indicaron que existe una variación estadísticamente significativa en el pH salival causada por el inhibidor de proteasas salivales utilizado para tratar las muestras ($p < 0,05$), en periodos de almacenamiento cortos y largos. En cuanto al efecto del ritmo circadiano no se observaron resultados significativos, ni en el nivel de pH ni sobre la concentración de Ca^{2+} o PO_4^{3-} . Sin embargo, se observaron patrones intrasujetos con niveles constantes, con un aumento o con una disminución de las concentraciones desde la primera muestra de la mañana hasta finalizar el ciclo circadiano. La composición bioquímica de la saliva total no estimulada en cuanto a la concentración de Ca^{2+} y PO_4^{3-} parece no ser afectada mayormente por las variaciones del ritmo circadiano.

1.1. Palabras clave.

Saliva, Saliva no estimulada, Concentración (Química), Ritmo Circadiano, pH, Calcio, Fosfato.

2. ABSTRACT

Saliva is a biological fluid with important protective properties, including its pH buffering capacity and enhancing remineralization. Salivary components have been reported to vary during the day due to multiple factors, including the circadian rhythm. However, despite its importance as a regulator of human health and metabolism, the available evidence is limited on its influence on the salivary composition. The objective of the study was to determine if the circadian rhythm induces variations in the pH and on the concentration of calcium (Ca^{2+}) and inorganic phosphate (PO_4^{3-}) in total unstimulated saliva of young adults. To meet the defined objectives, preliminary tests were carried out to determine the appropriate conditions to maintain the integrity of the samples, using salivary pH as an indicator variable. Once the optimal conditions were defined, the effect of the circadian rhythm on the pH and on the concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} in unstimulated total saliva of 11 young adult volunteers was determined, in 6 intervals, during a period between 7:00 a.m. and 3:00 p.m. the next day. For the statistical analysis, a significance level of 95% ($p < 0.05$) was used. The results of the stability study indicated that there is a statistically significant variation in salivary pH caused by the salivary protease inhibitor used to treat the samples ($p < 0.05$), in short and long storage periods. Regarding the effect of the circadian rhythm, no significant results were observed, neither in the pH level nor on the concentration of Ca^{2+} or PO_4^{3-} . However, intra-subject patterns were observed with constant levels, with an increase or decrease in concentrations from the first sample in the morning until the end of the circadian cycle. The biochemical composition of unstimulated total saliva in terms of Ca^{2+} and PO_4^{3-} concentration seems to be largely unaffected by circadian rhythm variations.

2.1. Keywords

Saliva, Unstimulated Saliva, Concentration (Chemistry), Circadian Rhythm, pH, Calcium, Phosphate.

3. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad crónica multifactorial no transmisible de alta prevalencia (1-3) afectando a un 35% de la población mundial (4), por lo que su investigación es uno de los grandes desafíos de la odontología contemporánea. El desarrollo de esta enfermedad está dado por un desequilibrio en el ecosistema microbiano, gatillado por la exposición frecuente a azúcares de la dieta. Adicionalmente, existen múltiples factores fisiológicos, conductuales, y ambientales que juegan un rol fundamental para mantener la estabilidad del microbioma oral (3, 5, 6). Entre estos, la saliva corresponde a un mediador esencial para mantener la homeostasis de los tejidos duros y mucosos de la boca (2).

La saliva es un fluido biológico que se origina principalmente en las glándulas salivales mayores que producen el 90% del volumen total, mientras que las glándulas salivales menores y el fluido crevicular contribuyen con el volumen restante (7). Está compuesta por un 99,5% de agua, 0,3% de proteínas y un 0,2% de sustancias orgánicas e inorgánicas, como inmunoglobulinas, enzimas, iones, productos nitrogenados y una amplia cantidad de otros componentes (8-10).

El aumento del pH salival y una adecuada capacidad amortiguadora se han relacionado con una menor incidencia de enfermedad de caries, ya que la saliva con sus diferentes sistemas tampón protegen a la cavidad oral neutralizando los ácidos producidos, evitando así la desmineralización del esmalte (1, 6, 11). Asimismo, se ha descrito que la saliva potencia la remineralización del esmalte dental mediante la presencia de iones calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{-3}) en su composición (1), manteniendo la saliva sobresaturada con respecto a la hidroxiapatita, promoviendo un entorno reparador y protector aumentando la resistencia de las superficies dentales expuestas a un ataque cariogénico. Estos mecanismos en su conjunto disminuyen la probabilidad del predominio de la desmineralización y a su vez favorecen la remineralización del esmalte y de las superficies radiculares (2).

En adultos sanos, el volumen salival diario varía entre 500 - 1500 mL, con un flujo aproximado de 0,5 mL/min (10, 12). Sin embargo, se ha descrito que los componentes salivales también pueden variar durante el día a causa de múltiples factores, como la dieta, higiene, flujo salival y ritmo circadiano (13). El sistema circadiano se define como un reloj corporal que regula los procesos homeostáticos del organismo, respondiendo a estímulos

ambientales variados, siendo el más importante la luz (14-16). Este consta de 2 partes, un reloj central que reside en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo anterior, y los relojes periféricos que se encuentran en varios tejidos del cuerpo desempeñando un papel integral y único en cada uno de ellos (17, 18). La señal de luz es captada por células fotosensibles de la retina, que transducen la luz entrante y transmiten información al SCN a través del tracto retino hipotalámico (16), donde se producen señales circadianas coordinadas, cruciales en muchos procesos biológicos, como el ciclo sueño-vigilia, la secreción hormonal, y la regulación de la temperatura corporal (17, 19). Estudios recientes han informado que las glándulas salivales, así como otros órganos humanos, contienen un reloj circadiano. Zheng et al. (14) confirmaron que el reloj circadiano de las glándulas salivales es periférico, encargado de regular el tipo, cantidad y contenido de saliva, así como la secreción de fluidos. Por otra parte, Bel'skaya (20) estudió la cronofisiología de la composición mineral de la saliva, concluyendo que la dinámica de las concentraciones de Ca^{2+} y PO_4^{-3} durante 24 horas se caracterizaba por variaciones pronunciadas con un aumento durante las mañanas y disminución por las tardes. No obstante, la investigación en el área de la cronobiología salival y en particular, de iones relacionados con los procesos de mineralización son escasos y requieren mayor investigación.

La saliva tiene un importante rol en la salud, ya que puede actuar como indicador de trastornos locales, sistémicos e infecciosos, lo que la hace atractiva para diagnóstico y terapias (2, 9). La saliva no estimulada podría ser más adecuada que la estimulada para estudios clínicos ya que depende del flujo salival basal diario en ausencia de estímulos exógenos, además es una muestra que posee un proceso de recolección simple, seguro e indoloro (21). Pese a lo ampliamente estudiada, existe un vacío de investigación en cuanto a la asociación de componentes salivales y ritmo circadiano, aun cuando existen estudios que sostienen esta relación, estos son escasos y poco significativos. Asimismo, tampoco existe evidencia de que las variaciones en la composición salival sean producto del reloj circadiano y no por otros factores. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar si el ritmo circadiano genera variaciones en el pH y en la concentración de Ca^{2+} y PO_4^{-3} de saliva total no estimulada en adultos jóvenes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar si el ritmo circadiano induce variaciones en el pH y en la concentración de Ca^{2+} y PO_4^{-3} de saliva total no estimulada de adultos jóvenes.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar condiciones óptimas de almacenamiento de la saliva total no estimulada, basadas en las fluctuaciones del pH.
2. Establecer si el ritmo circadiano genera variaciones en el pH de la saliva no estimulada en adultos jóvenes.
3. Analizar las variaciones ocurridas durante el ritmo circadiano en las concentraciones de Ca^{2+} salival, de adultos jóvenes
4. Relacionar el ritmo circadiano con las variaciones de la concentración de PO_4^{-3} salival de adultos jóvenes.

5. MÉTODOS

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 del 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.

Para evitar interferencias sobre las variables a estudiar, se realizó la estandarización de las técnicas. Las variables identificadas 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 voluntarios para ser partícipes de la investigación, con el fin de determinar la influencia del ritmo circadiano sobre el pH salival y la concentración de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} .

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 en base a temperatura y tiempo. 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. 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 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 tiempo de almacenamiento: Las muestras con/sin la presencia del inhibidor fueron subdivididas para ser 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 lapsos de 1 hora (9:00-10:00-11:00-12:00-13:00-14:00 hrs) (Fig.1).

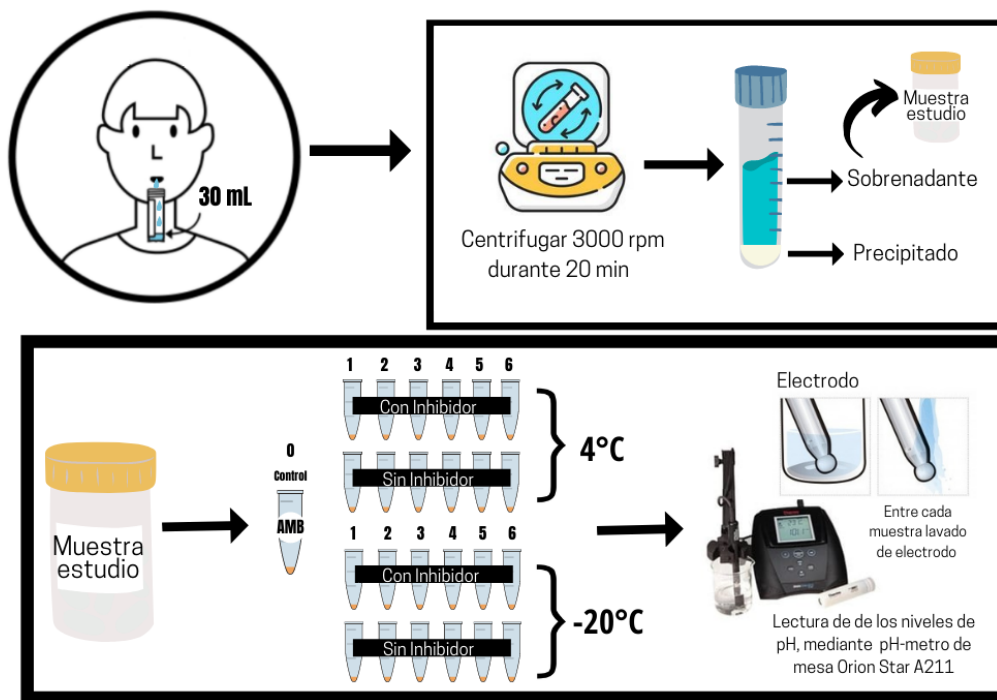


Figura 1. Diseño general de almacenamiento de muestras en tiempo reducido. Una vez obtenidas las muestras de saliva, se centrifugaron y el sobrenadante fue dividido en alícuotas con Inhibidor y sin Inhibidor, para la determinación de pH. Las muestras fueron medidas cada una hora en un periodo de 6 horas a 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.

5.2.2. Variaciones de pH en tiempos extendidos

Con el fin de evaluar el efecto del almacenamiento en tiempos 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, comparando el comportamiento de estas de acuerdo con el control inicial de cada uno. Para ello, los voluntarios debieron depositar saliva no estimulada, para ser almacenadas a diferentes temperaturas y periodos de tiempo, con el fin de realizar la comparativa de sus pH respectivamente.

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 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 (25°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).

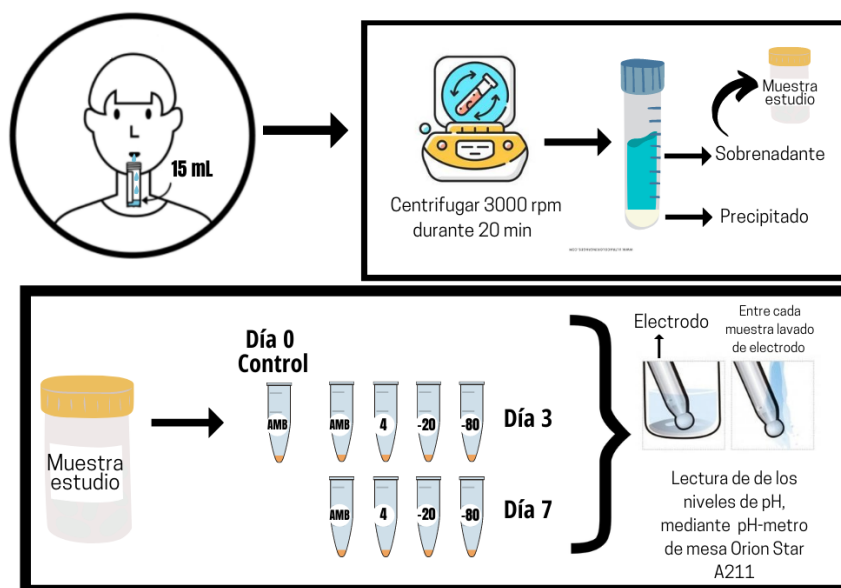


Figura 2. Diseño general de almacenamiento de muestras en tiempos extendidos. Una vez obtenidas las muestras de saliva, se centrifugaron y el sobrenadante fue utilizado para medir el pH, a los 0, 3 y 7 días a temperatura ambiente, 4°C, -20°C y -80°C.

5.3. Análisis del pH, Ca²⁺ y PO₄³⁻ durante el ritmo circadiano

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, 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 (22). 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 interindividual no alterará los resultados de los análisis.

A los participantes se les sugirió seguir las pautas de alimentación durante los 3 días previos a la toma de muestra. Sin embargo, 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 otorgó con 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 para continuar de manera correcta lo propuesto. 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 y 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. Posterior a esto, cada voluntario almacenó inmediatamente el tubo en el freezer a -20°C , 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 48hrs y trasladadas en una unidad refrigerante. Estas fueron centrifugados a 3000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. De la muestra total, se extrajo 1 mL para alicuotarlo en un tubo Eppendorf de 1,5 mL destinado para la medición de pH. La saliva restante fue filtrada con filtros de jeringa con tamaño de poro de 0,22 μm y posteriormente alicuotada en tubos Eppendorf de 2 mL con 400 μL para el análisis de concentración de Ca^{+2} y PO_4^{3-} (**Fig.3**). El excedente de muestra fue congelado a temperatura de -20°C por motivos de conservación para futuras investigaciones.

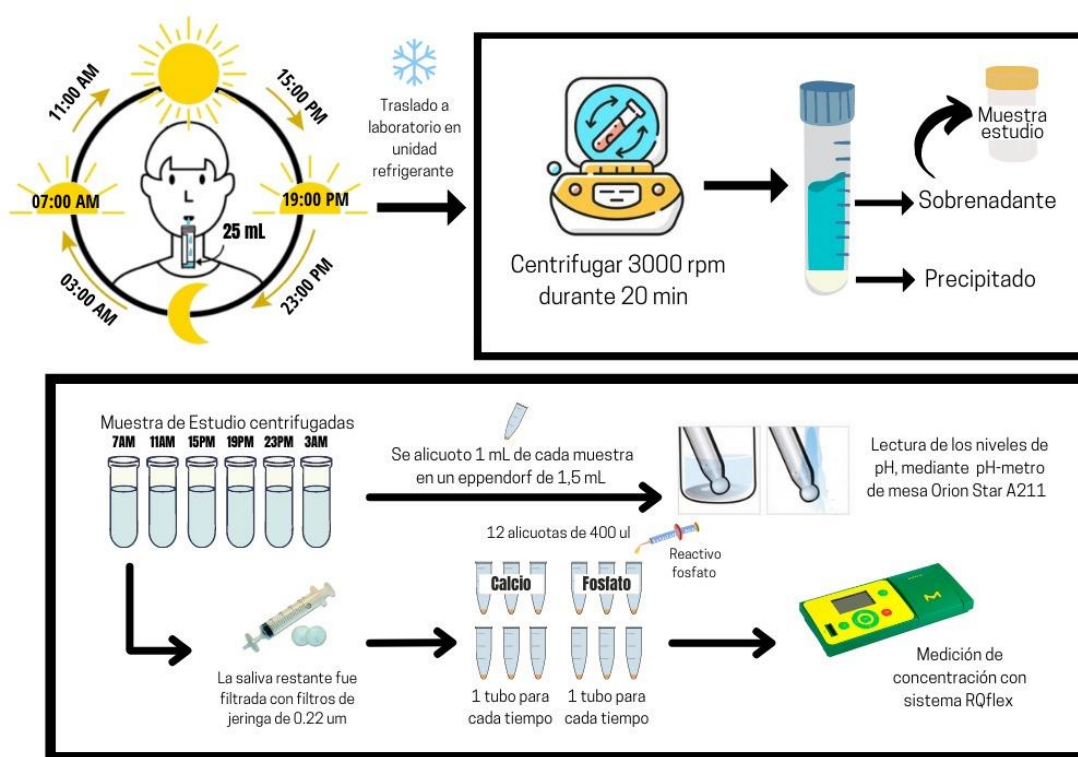


Figura 3. Diseño general de estudio de efecto de ritmo circadiano. Una vez obtenidas las muestras de saliva por el voluntario, fueron refrigeradas a -20°C , hasta su traslado. En el laboratorio se centrifugaron y el sobrenadante fue extraído 1 mL para medir el pH. La saliva restante fue filtrada y utilizada para medir las concentraciones de Ca^{+2} y PO_4^{3-} mediante el sistema RQflex.

5.3.1. Análisis de muestras

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, realizando su medición en triplicado de forma sucesiva y en intervalos de 10 minutos, con el fin de obtener un parámetro de comparación en los resultados.

Al igual que en el proceso de estandarización, el instrumento utilizado para su medición es un pHmetro (Orion Star A211, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), el cual permitió obtener datos con respecto a los niveles de pH de la muestra en estudio

Determinación de concentraciones de Ca^{+2} y PO_4^{3-} en muestras de saliva no estimulada.

Para la determinación de concentraciones de Ca^{+2} y PO_4^{3-} se utilizó el equipo reflectómetro (Reflectoquant® RQflex® 20, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Las tiras de ensayo Reflectoquant® que se utilizaron para Ca^{+2} tenían un rango de 5-125 mg/L y las tiras de PO_4^{3-} un rango de 5 a 120 mg / L. La exactitud de Ca^{+2} se confirmó mediante una solución control preparada con 50 mg/L de Calcio cloruro dihidrato, mientras que para PO_4^{3-} se confirmó mediante el uso de solución comercial patrón Certipur®, 1000 mg/l de PO_4^{3-} . La medición se llevó a cabo basándose en lo descrito por Rosier et al (23). El protocolo para el uso de RQflex® 20 en detalle esta descrito en el (ANEXO 5).

Para Ca^{+2} , se sumergió la tira reactiva en la muestra, se dejó reaccionar 2 segundos y se eliminaron los excesos apoyando la zona posterior de la tira reactiva sobre un papel absorbente. Luego para su medición, se insertó la tira en el equipo antes de transcurrido el tiempo total de reacción (15 segundos).

Para la medición de PO_4^{3-} , a las muestras de 400 uL se añadieron 30.8 μL de reactivo PO_4^{-1} . Una vez mezclado se sumergió la tira reactiva, se dejó reaccionar por 2 segundos y se eliminaron los excesos en papel absorbente. Para su medición, se insertó la tira en el equipo antes de transcurrido el tiempo total de reacción (90 segundos) (**Fig.3**)

5.4. Análisis estadístico

Para determinar la normalidad de la distribución de los datos se utilizó el test de Kolmogorov Smirnov ($p > 0.05$). Los análisis paramétricos se realizaron con ANOVA. Las diferencias originadas se consideraron con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$). Todos los análisis se realizaron utilizando el software SPSS.

6. RESULTADOS

6.1. Variabilidad de pH en cortos periodos de tiempo según variable en estudio

Medición de la variación de pH salival influenciado por Inhibidor de proteasas

El inhibidor de proteasas utilizado PMSF, 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.

Medición de la variación de pH salival influenciado por la 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).

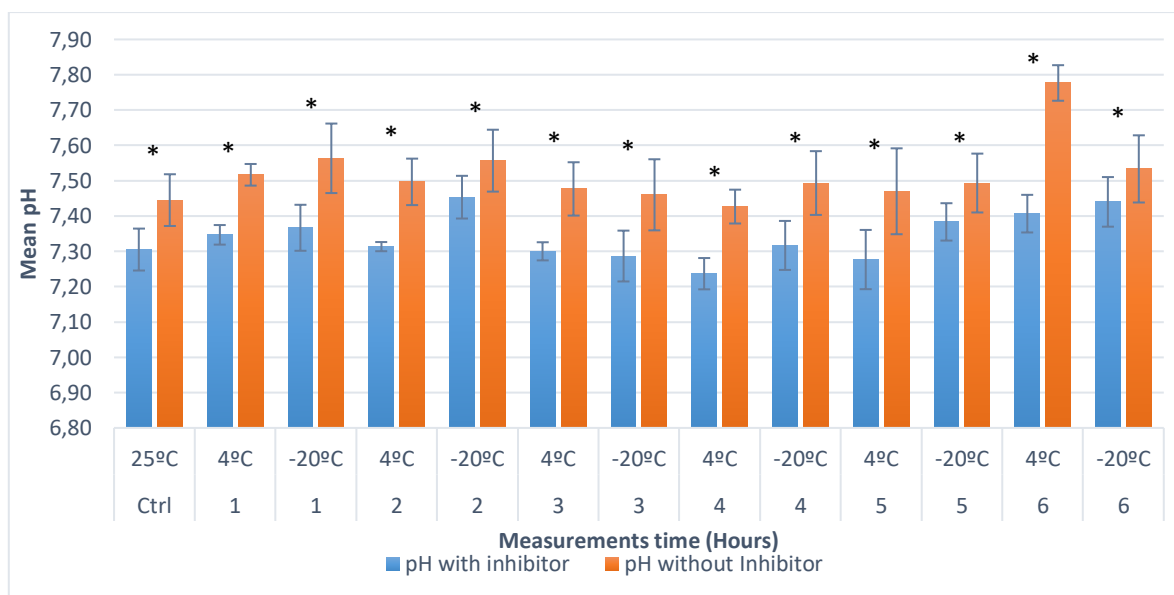


Fig. 4: Promedio valores de pH salival en los voluntarios, con y sin inhibidor a diferentes temperaturas de almacenamiento. El gráfico muestra la diferencia en promedios de los valores de pH salival de los voluntarios (n=11) con y sin inhibidor de proteasas PMSF a temperaturas de 25°C, 4°C, -20°C, durante periodos de almacenamiento establecidos de 6 horas. La medición de cada muestra se realizó en triplicado. La barra de error representa el error estándar de cada condición experimental. Valor $p = 0,990$. El asterisco (*) indica aquellos resultados que presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variabilidad de pH a largo plazo de acuerdo a temperatura de almacenamiento

Al almacenar las muestras con PMSF por un periodo de 3 y 7 días a 25°C, 4°C, -20°C y -80°C, se puede observar que el promedio del pH varía según días de almacenamiento y temperaturas, no se mantiene constante. En comparación con la temperatura de 25°C, en el día 3 el pH (7,68) tiende a aumentar levemente en comparación día 0 (toma de muestra) sin embargo esta no fue estadísticamente significativa ($p=0,990$), manteniéndose estable. Por otro lado, al evaluar las muestras almacenadas hasta el día 7, existió una diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$) con respecto al control del día 0, lo que se evidencia en los cambios de pH existentes, acidificándose con respecto al control. Esto sugiere que las variaciones se deben al tiempo de almacenamiento, pero no a la temperatura.

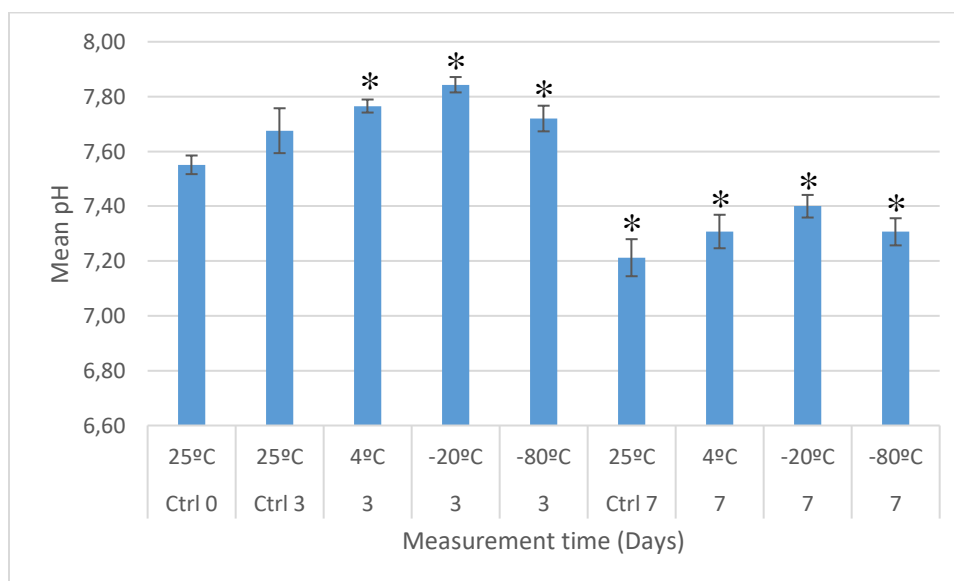


Fig. 5: Promedio valores de pH salival en los voluntarios, sometidas a diferentes tiempos y Temperaturas de almacenamiento. El grafico muestra la diferencia en promedios de los valores de pH salival de los voluntarios ($n=11$) a temperaturas de 25°C, 4°C, -20°C Y -80°C, durante periodos de almacenamiento establecidos (Día 0, 3 y 7). La medición de cada muestra se realizó en triplicado. La barra de error representa el error estándar de cada condición experimental. El asterisco (*) indica aquellos resultados que presentaron diferencias significativas ($p<0.05$)

6.2. Influencia del Ritmo Circadiano en las características de la saliva no estimulada

Efecto del ritmo circadiano sobre 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, 11am, 3 pm, 7pm, 11 pm y 3 am), se obtuvieron los valores promedio (Fig.6). Se puede observar que en general los valores de pH se mantuvieron estables, presentando leves fluctuaciones. Se evidenció un aumento de pH con un peak a las 19:00 horas (pH:7,53). Mientras que los valores mínimos se obtuvieron a los extremos de la curva 07.00 (pH:7,41) y 03.00 AM (pH:7,40). Sin embargo, las variaciones encontradas en los 6 tiempos no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

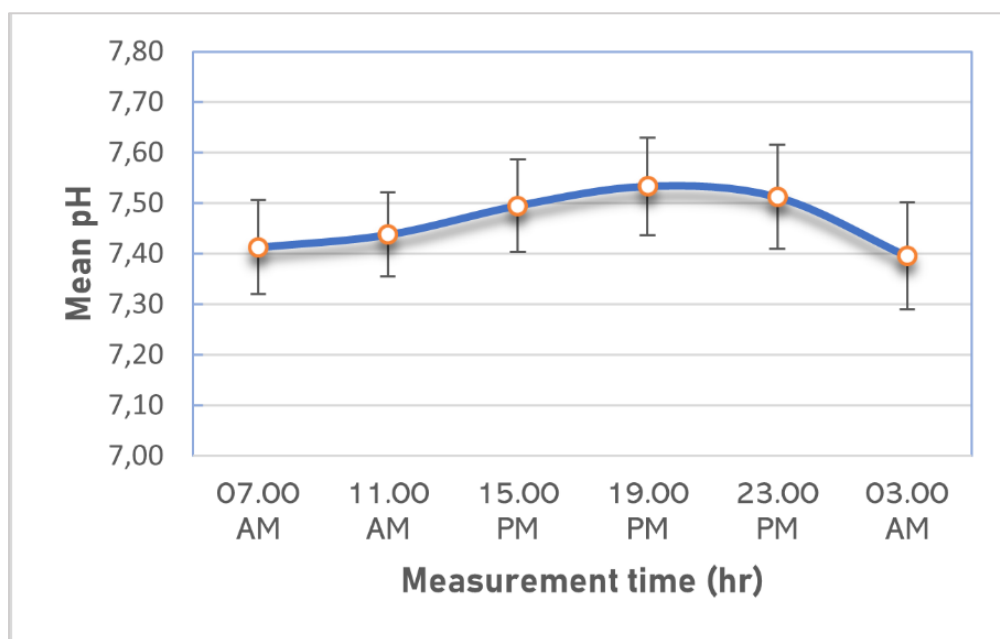


Fig. 6 Promedio de pH salival de voluntarios adultos jóvenes entre las 7:00 y 3:00 AM. En la figura se evidencian las variaciones del promedio de pH obtenido desde las muestras salivales de los voluntarios (n=11) recolectadas en diferentes horarios 7:00 AM, 11:00 AM, 15:00 PM, 19:00 PM, 23:00 PM y 3:00 AM a lo largo de un día. La determinación de cada muestra se realizó en triplicado. Las barras de error representan el error estándar de cada condición experimental. El asterisco (*) indica aquellos resultados que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

Efecto del Ritmo Circadiano sobre la concentración de Ca^{+2}

Los promedios en la concentración de Ca^{+2} de los voluntarios presentaron variaciones durante los tiempos de recolección salival. Los valores fluctuaron entre $29 \pm 4,8$ y $34 \pm 6,8$ mg/L, cuyas diferencias no son estadísticamente significativas ($p= 0,2$). Sin embargo, existe la tendencia a un aumento de la concentración a las 7:00 AM (34 mg/L) y 3:00AM (32 mg/L), registrándose su valor más bajo a las 15:00 PM (29 mg/L).

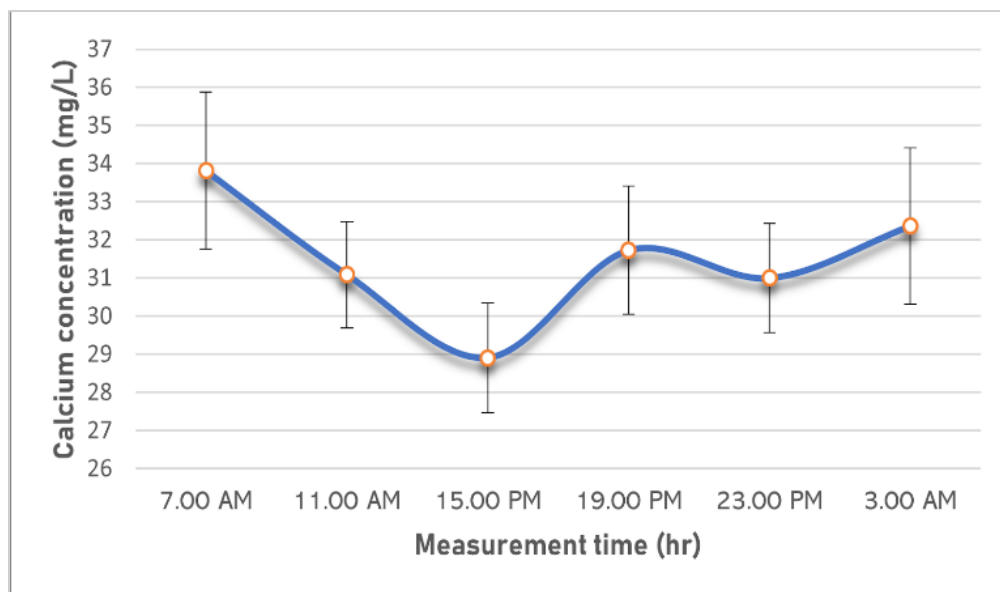


Fig. 7 Promedio de concentraciones Ca^{+2} salival de voluntarios adultos jóvenes entre las 7.00 y 3.00 AM El gráfico indica promedio de las variaciones de concentraciones de Ca^{+2} de los voluntarios ($n=11$) obtenidos en distintos tiempos (7:00 AM, 11:00 AM, 15:00 PM, 19:00 PM, 23:00 PM y 3:00 AM) a lo largo de un día. Las barras de error representan el error estándar de cada condición experimental. El asterisco (*) indica aquellos resultados que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la Fig.8 se pueden observar las tendencias en las concentraciones de Ca^{2+} de cada voluntario participante a lo largo del tiempo de recolección, observando una alta variabilidad entre ellos. La Fig.8.A incluye a aquellos voluntarios que mantuvieron su concentración de Ca^{2+} constante, tanto en el inicio como al término de la recolección salival, la Fig.8.B incluye a aquellos voluntarios cuya concentración disminuyó a lo largo del día y la Fig.8.C incluye a aquellos voluntarios cuya concentración de Ca^{2+} salival aumentó levemente.

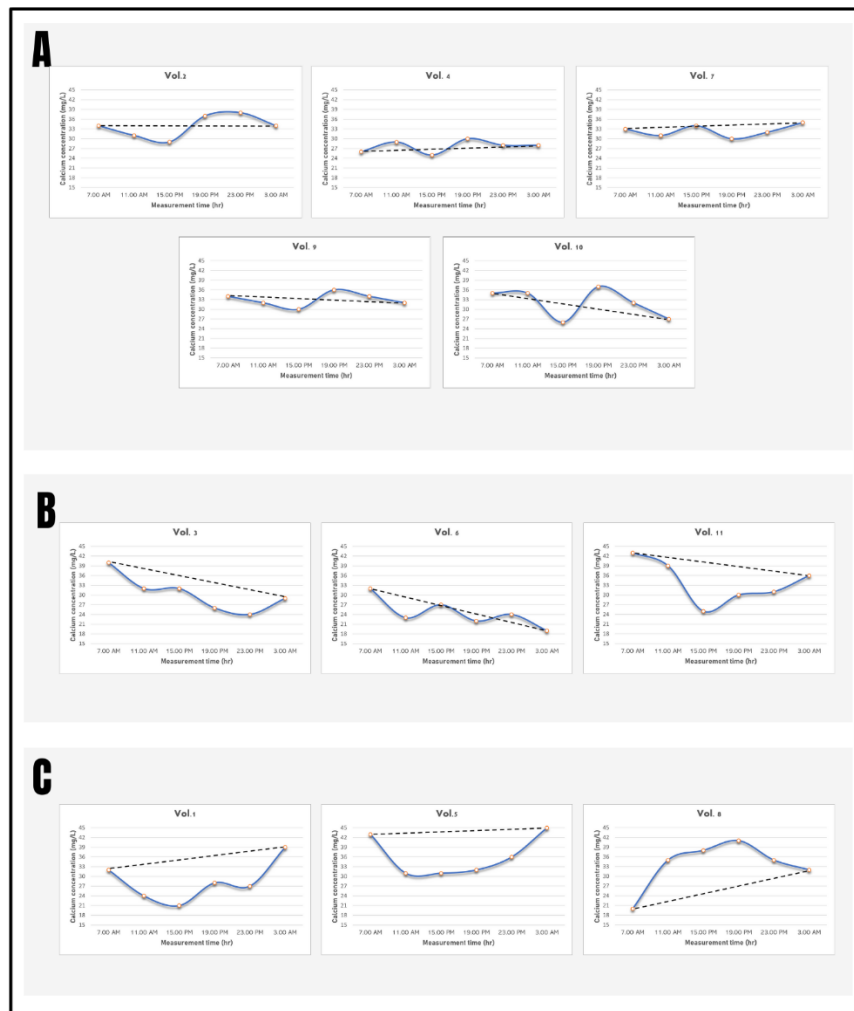


Fig. 8 Concentraciones de Ca^{2+} individuales por cada voluntario registrado entre las 7:00 y 3:00 AM. Fluctuaciones de las concentraciones individuales de Ca^{2+} de cada voluntario ($n=10$) en distintas horas del día (7:00 AM, 11:00 AM, 15:00 PM, 19:00 PM, 23:00 PM y 3:00 AM). Se excluyo de este análisis al voluntario 6, para evitar sesgos debido a que no ejecuto las indicaciones durante el estudio. El asterisco (*) indica aquellos resultados que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

Efecto del Ritmo Circadiano sobre la concentración de PO_4^{3-}

De igual forma, los promedios de concentración de PO_4^{3-} registrado en los 11 voluntarios manifestaron variaciones de pequeña magnitud durante los 6 tiempos de recolección salival. Con valores que fluctuaron a niveles más altos entre $85 \pm 8,6$ - $93 \pm 8,3$ mg/L, los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,2$). También existe una tendencia de un aumento de concentración en las horas de madrugada a las 7:00 AM (93 mg/L) y 3:00AM (92 mg/L) mientras que su menor concentración se registra a las 23:00 PM (83 mg/L).

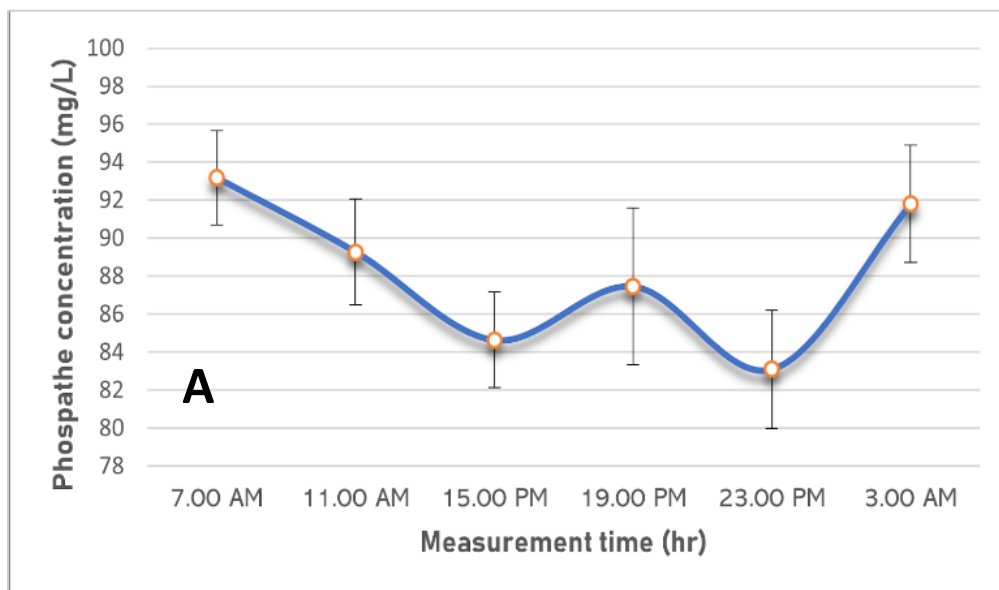


Fig. 9 Promedio de concentraciones PO_4^{3-} salival de voluntarios adultos jóvenes entre las 7.00 y 3.00 AM El gráfico indica promedio de las variaciones de concentraciones de PO_4^{3-} de los voluntarios ($n=11$) obtenidos en distintos tiempos (7:00 AM, 11:00 AM, 15:00 PM, 19:00 PM, 23:00 PM y 3:00 AM) a lo largo de un día . Las barras de error representan el error estándar de cada condición experimental. El asterisco (*) indica aquellos resultados que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la (Fig.10) se presentan los valores de las concentraciones de PO_4^{3-} de los 11 voluntarios de forma individual, observando que no existe un patrón definido entre ellos. El panel A muestra a aquellos voluntarios que mantuvieron sus niveles de concentración tanto al inicio como al término de la recolección salival; el panel B, aquellos voluntarios que disminuyeron su concentración a lo largo del día y panel C a los voluntarios que aumentaron su concentración de PO_4^{3-} salival al final del periodo estudio.

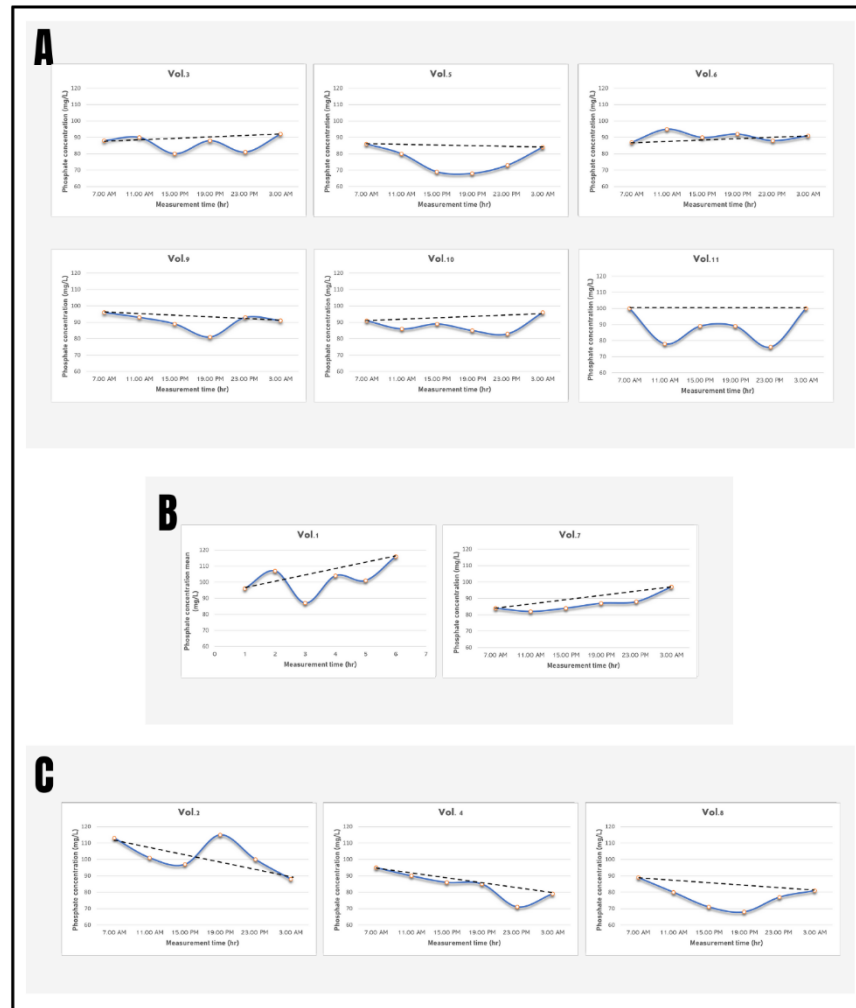


Fig. 10 Concentraciones de PO_4^{3-} individuales por cada voluntario registrado entre las 7.00 y 3.00 AM. Fluctuaciones de las concentraciones individuales de PO_4^{3-} de cada voluntarios (n=10) en distintas horas del día (7:00 AM, 11:00 AM, 15:00 PM, 19:00 PM, 23:00 PM y 3:00 AM). Se excluyo de este análisis al voluntario 6, para evitar sesgos debido a que no ejecuto las indicaciones durante el estudio. El asterisco (*) indica aquellos resultados que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

7. DISCUSIÓN

Se ha descrito que los componentes salivales varían durante el día a causa de múltiples factores, incluyendo el ritmo circadiano, sin embargo, aún no se ha podido establecer una asociación concreta (2). De acuerdo con los datos obtenidos en las pruebas de estandarización, los niveles de pH salival en presencia de inhibidor de proteasas (PMSF) en un periodo de 6 horas disminuyeron en comparación con la muestra sin dicho reactivo. Asimismo, en un tiempo de almacenamiento de 3 días las muestras de saliva con inhibidor presentaron un aumento de los niveles de pH, mientras que a los 7 días se observó una disminución del pH, ambas significativas. En relación con el efecto del ritmo circadiano, se observó que, en pH, concentración de calcio y fosfato una alta variabilidad en los valores individuales, sin una tendencia uniforme en todos los voluntarios.

La leve disminución del pH entre las muestras con y sin inhibidor de proteasas, se debe a que el PMSF se encuentra en una solución cuyo pH final es ácido, inhibiendo de esta manera la proteólisis y acidificando las muestras salivales (12). Según lo descrito por James et al. (24) la inactivación del PMSF aumenta sobre un pH 7.5 y a temperatura ambiental, inactivándose casi por completo en 1 hora a 25°C o en 22 horas a 4°C. Debido a las que las muestras de la investigación se mantuvieron a 4°C y -20°C, se puede inferir que el responsable de la disminución del pH a lo largo de las horas es el PMSF coincidiendo con lo descrito por James et al.

Al almacenar las muestras por 3 y 7 días, se observaron variaciones estadísticamente significativas en los valores de pH en comparación al control (muestra salival recién recolectada). Los datos obtenidos señalaron que al día 3 los valores de pH aumentaron, mientras que al día 7 se produjo un descenso respecto al control. Bardow et al. (25) señaló que esta variación en los valores de pH puede ser provocada por la difusión del CO₂ desde la muestra, producto del gradiente generado a raíz de la diferencia de presiones entre la saliva y la atmósfera. A partir de esto, se puede deducir que, el aumento de pH en el día 3 de almacenamiento fue provocado porque las muestras durante el proceso de análisis estuvieron expuestas a la atmósfera por tiempos prolongados, lo que pudo alterar los parámetros analizados. Por el contrario, al día 7 de almacenamiento las muestras disminuyeron su pH

con respecto al control. Esto puede ser causado por la actividad del PMSF, asimismo, también pudieron ser influenciadas por el microbiota bacteriana presente en las muestras, ya que estas al metabolizar sustratos como los azúcares generan ácido el cual es liberado al medio en el que se encuentran(5).

Con respecto a la influencia del ritmo circadiano en el pH salival, los resultados indicaron que estos se mantuvieron relativamente estables, variando entre 7 -7.6 durante el tiempo analizado. Esto se debe a la capacidad tamponante de la saliva, la cual está regulada por 3 sistemas: el bicarbonato, fosfato y proteínas (8), los cuales minimizan los cambios de pH producidos en la cavidad oral. Según lo descrito en la literatura, el bicarbonato corresponde al principal sistema buffer de la saliva actuando entre pH 5 - 7, encontrándose a mayor concentración en saliva estimulada; El sistema tampón fosfato en cambio, se encuentra en mayor proporción en saliva no estimulada, actuando a pH 7 – 7.26 (25). El sistema de proteínas, por el contrario, actúa solo a pH ácidos (pH 4-5), por lo que se puede deducir que en las muestras recolectadas están actuando principalmente el sistema de fosfato y en complemento el bicarbonato.

Los resultados obtenidos en el análisis del ritmo circadiano en las concentraciones promedio de Ca^{2+} y PO_4^{3-} salival no registraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se puede deducir que estos iones se mantienen de forma constante en la cavidad oral (26). No obstante, al analizar las concentraciones intravoluntarios se evidenciaron leves fluctuaciones durante el periodo estudiado, que manifestaron tendencias a aumentar la concentración en ambos analitos durante la mañana-noche y disminuir durante el día. Este suceso se ha descrito en diversas publicaciones, que han informado que existen variaciones intraindividuales en la composición inorgánica salival (27-29).

Una posible causa de la leve variación en las concentraciones de Ca^{2+} pueden estar dada por los componentes proteicos de la saliva, ya que la mayor parte del Ca^{2+} secretado está unido a la proteína estaterina, y en una menor proporción a las PRP ácidas o cistatinas (11), disminuyendo de esta forma el porcentaje de iones de Ca^{2+} libres en esta secreción. Además, estas proteínas presentan funciones específicas mantenimiento de la homeostasis en el entorno oral generando variaciones en la disponibilidad de estos electrolitos a lo largo del día, conforme a los requerimientos y necesidades de cada individuo(30). Los resultados

obtenidos en esta investigación son similares a los presentados en el estudio de Dawes et. al (27). Sin embargo, existe una investigación realizada por Fergusn et. al (31), que declara que el ritmo circadiano afecta significativamente la concentración de Ca^{+2} . Este estudio utilizó saliva obtenida exclusivamente de la glándula submandibular, a diferencia de nuestra investigación que se realizó en una muestra de saliva total no estimulada. (32)

El PO_4^{3-} es un elemento importante en el organismo ya que además sus funciones en la cavidad oral, participa en varios procesos del organismo como en el desarrollo esquelético y mineralización ósea, actúa en la señalización celular, además de los mecanismos de transferencia de energía (33). Por lo que se encuentra en constante actividad. Las concentraciones de PO_4^{3-} en el estudio, mostraron una leve tendencia a elevarse en las horas de madrugada disminuyendo durante la tarde-noche. Esto se debe probablemente a que la concentración de PO_4^{3-} tiende a aumentar cuando disminuye el flujo salival (34, 35) lo que explicaría el ascenso durante la madrugada, teniendo en cuenta que la secreción es baja durante el sueño y más alta en el periodo de vigilia (36), verificando que el flujo de saliva sin estimular está sujeta a una variación circadiana (28, 37). Al contrario de Ca^{+2} las concentraciones de PO_4^{3-} presentaron fluctuaciones opuestas a lo descrito en la literatura. Dawes y Fergusn (27, 38) reportaron altas PO_4^{3-} en los horarios diurnos y bajas concentraciones en los extremos de la curva, cuyas discrepancias podrían ser originadas por la técnica y horario de recolección salival, el tipo de saliva recolectada y la metodología analítica utilizada en las diferentes investigaciones.

La dieta corresponde a una importante fuente de fósforo corporal (33), que a diferencia del calcio que se limita a unos pocos alimentos, el fósforo es posible encontrarlo en la mayoría de los alimentos, principalmente en productos lácteos y alimentos ricos en proteínas (39), los cuales son característicos de la dieta mediterránea indicada a los voluntarios, por lo que puede ser una de las causas de que el PO_4^{3-} durante la tarde se mantuviera constante en la cavidad oral. Asimismo, Ikuta et al. (40) describió en su estudio que el PO_4^{3-} se mantiene constante en el organismo siguiendo un ciclo de reutilización. Una alta ingesta de PO_4^{3-} en la dieta se reduce en una mayor concentración de este a nivel intestinal, donde ocurre su absorción, pasando al plasma sanguíneo. Desde este punto, una parte del PO_4^{3-} es eliminado por secreción urinaria y heces, mientras que el otro porcentaje es trasladado por la circulación

hacia las glándulas salivales por donde es secretado, a través de la proteína NPT2b del conducto salival (41), a la cavidad oral para iniciar nuevamente el ciclo.

Se debe considerar que los electrolitos salivales y el pH pueden ser más sensibles a los cambios fisiológicos en las superficies de los dientes que otros componentes de la cavidad oral (26). El efecto del pH y la capacidad amortiguadora de la saliva promueven la modificación de la biodisponibilidad de los electrolitos de calcio y fosfato ya que las fluctuaciones en el pH cambian el producto de actividad iónica en la composición bioquímica de la saliva (42). Los iones presentes en la saliva son esenciales para promover la remineralización, a un pH normal ya que calcio y fosfato se encuentran sobresaturados por lo que no se producirá la desmineralización. Sin embargo, los ácidos de origen bacteriano o provenientes de alimentos y bebidas tienden a cambiar el equilibrio hacia la pérdida de minerales, concordando con los resultados obtenidos por de Sousa et al. que indica que luego de un enjuague con sacarosa al 20%, las concentraciones de calcio y fosfato se vieron alteradas. Estableciendo una probable relación entre la variabilidad de las concentraciones de estos iones y los horarios de alimentación de los voluntarios.

Dentro de la investigación, la homogeneidad y el reducido número de participantes es una de las principales limitantes. Por otra parte, en el estudio se analizaron solo las muestras de un día (24 horas), lo cual no es suficiente para mostrar tendencias reproducibles en el tiempo en cuanto a las variables estudiadas ya que hay diversos factores que pudieron influir en los voluntarios como hormonas, estrés o alteraciones del sueño, sesgando los resultados (26). En consecuencia, un único análisis salival puede ser poco fiable por lo que para obtener resultados confiables es necesario tomar un mayor número de muestras y repetir el estudio por al menos 3 días como mínimo en las mismas condiciones.

Otra de las limitaciones 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 para debe ser calculada conforme a las necesidades calóricas respectivas de cada individuo, realizando una evaluación nutricional previa.

En cuanto a las limitaciones técnicas, la principal dificultad que se presentó fue el no poseer un método de referencia primario (gold estándar) para medir y comparar la sensibilidad y especificidad del sistema analítico utilizado.

Por otra parte, la saliva es un líquido viscoso, debido a la presencia de mucopolisacáridos y mucoproteínas dentro de su composición, dificulta las mediciones analíticas ya que presenta una matriz diferente a las indicadas por el fabricante (suero y sustancias líquidas). Esta situación puede disminuir la precisión de las mediciones analíticas (26), por lo que para poder analizar las muestras de estudio se debió realizar un centrifugado y filtrado de la saliva para eliminar los componentes que pueden interferir con la precisión de las determinaciones.

A partir de esto podemos destacar otra limitación durante el procesamiento de la muestra, la cual corresponde al filtrado. Este fue realizado de forma manual con filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 μm . Para la cantidad de muestras procesadas, es un método lento y tedioso para el operador, además de perder una gran cantidad de muestra en el proceso. Para futuros análisis se debería implementar un sistema de filtrado al vacío para optimizar el procesamiento muestral.

Como conclusión, la saliva corresponde a una secreción biológica de variada composición de simple recolección a diferencia de otras muestras. La composición bioquímica salival se mantiene estable en función del tiempo debido a los múltiples procesos metabólicos del organismo, sin embargo, esta puede variar al momento de almacenaje, mostrándose estable en refrigeración solo hasta los 3 días. Por otra parte, la correlación de los componentes salivales con el ritmo circadiano aun es una incógnita, sin embargo el potencial de los componentes inorgánicos salivales, como biomarcadores en el diagnóstico de varias enfermedades orales y sistémicas es altamente reconocido en el ámbito investigativo (26), su estudio a futuro permitirá comprender mejor la susceptibilidad y el manejo de la enfermedad de caries de forma individual enfermedades orales y sistémicas, además de entregarnos herramientas para utilizar en el diagnóstico de patologías y el análisis del estado de salud general (26). Ya que esta secreción puede actuar como un espejo que refleja los estados de salud del cuerpo (43). Es de vital importancia validar la aplicabilidad de herramientas y técnicas para un correcto análisis de esta secreción. También es necesario evaluar los métodos adecuados de almacenamiento de las muestras de saliva para los distintos

analitos objeto de estudio. Y promover el interés de continuar realizando investigaciones que contribuyan al reconocimiento de estos compuestos biomarcadores como material diagnóstico, abordados desde distintas perspectivas y variables, y así generar parámetros de comparación para aplicaciones futuras.

8. REFERENCIAS

1. Hegde MN, Attavar SH, Shetty N, Hegde ND, Hegde NN. Saliva as a biomarker for dental caries: A systematic review. *J Conserv Dent.* 2019;22(1):2-6. doi: 10.4103/jcd.Jcd_531_18.
2. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CY. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontol* 2000. 2016;70(1):128-41. doi: 10.1111/prd.12100.
3. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7-14. doi: 10.1159/000503309.
4. 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.
5. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008;42(6):409-18. doi: 10.1159/000159604.
6. Dawes C, Pedersen AM, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Arch Oral Biol.* 2015;60(6):863-74. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.03.004.
7. Nunes LA, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: ^[1]_{SEP}a systematic review. *Biochem Med (Zagreb).* 2015;25(2):177-92. doi: 10.11613/bm.2015.018.
8. Kubala E, Strzelecka P, Grzegocka M, Lietz-Kijak D, Gronwald H, Skomro P, et al. A Review of Selected Studies That Determine the Physical and Chemical Properties of Saliva in the Field of Dental Treatment. *Biomed Res Int.* 2018;2018:6572381. doi: 10.1155/2018/6572381.
9. Roblegg E, Coughran A, Sirjani D. Saliva: An all-rounder of our body. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;142:133-41. doi: 10.1016/j.ejpb.2019.06.016.
10. 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.
11. Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2013;4:267-76. doi: 10.1146/annurev-food-030212-182700.

12. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*. 2007;383(1-2):30-40. doi: 10.1016/j.cca.2007.04.011.
13. Liu J, Duan Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol*. 2012;48(7):569-77. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.01.021.
14. 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.
15. Zimmet P, Alberti K, Stern N, Bilu C, El-Osta A, Einat H, et al. The Circadian Syndrome: is the Metabolic Syndrome and much more! *J Intern Med*. 2019;286(2):181-91. doi: 10.1111/joim.12924.
16. Pickel L, Sung HK. Feeding Rhythms and the Circadian Regulation of Metabolism. *Front Nutr*. 2020;7:39. doi: 10.3389/fnut.2020.00039.
17. Serin Y, Acar Tek N. Effect of Circadian Rhythm on Metabolic Processes and the Regulation of Energy Balance. *Ann Nutr Metab*. 2019;74(4):322-30. doi: 10.1159/000500071.
18. Fu M, Yang X. The sweet tooth of the circadian clock. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(4):871-84. doi: 10.1042/bst20160183.
19. Riede SJ, van der Vinne V, Hut RA. The flexible clock: predictive and reactive homeostasis, energy balance and the circadian regulation of sleep-wake timing. *J Exp Biol*. 2017;220(Pt 5):738-49. doi: 10.1242/jeb.130757.
20. Bel'skaya LV, Kosenok VK, Sarf EA. Chronophysiological features of the normal mineral composition of human saliva. *Arch Oral Biol*. 2017;82:286-92. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.024.
21. Chojnowska S, Baran T, Wilińska I, Sienicka P, Cabaj-Wiater I, Knaś M. Human saliva as a diagnostic material. *Adv Med Sci*. 2018;63(1):185-91. doi: 10.1016/j.advms.2017.11.002.
22. 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.

23. Rosier BT, Buetas, E., Moya-Gonzalvez, E.M. et al. . Nitrate as a potential prebiotic for the oral microbiome. *Scientific Reports* 2020;10, 12895. doi: 10.1038/s41598-020-69931-x.
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. Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂. *Arch Oral Biol.* 2000;45(1):1-12. doi: 10.1016/s0003-9969(99)00119-3.
26. Ngamchuea K, Chaisiwamongkhon K, Batchelor-McAuley C, Compton RG. Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers - a tutorial review. *Analyst.* 2017;143(1):81-99. doi: 10.1039/c7an01571b.
27. Dawes C. Circadian rhythms in the flow rate and composition of unstimulated and stimulated human submandibular saliva. *J Physiol.* 1975;244(2):535-48. doi: 10.1113/jphysiol.1975.sp010811.
28. Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol.* 1972;220(3):529-45. doi: 10.1113/jphysiol.1972.sp009721.
29. Rockenbach MI, Marinho SA, Veeck EB, Lindemann L, Shinkai RS. Salivary flow rate, pH, and concentrations of calcium, phosphate, and sIgA in Brazilian pregnant and non-pregnant women. *Head Face Med.* 2006;2:44. doi: 10.1186/1746-160x-2-44.
30. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res.* 2000;14:40-7. doi: 10.1177/08959374000140010601.
31. Ferguson DB, Fort A. Circadian variations in human resting submandibular saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol.* 1974;19(1):47-55. doi: 10.1016/0003-9969(74)90224-6.
32. Milligan CW, Lindstrom F. Colorimetric determination of calcium using reagents of the glyoxal bis(2-hydroxyanil) class. *Anal Chem.* 1972;44(11):1822-9. doi: 10.1021/ac60319a019.
33. Takeda E, Yamamoto H, Nashiki K, Sato T, Arai H, Taketani Y. Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus. *J Cell Mol Med.* 2004;8(2):191-200. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00274.x.
34. Lagerlöf F, Oliveby A. Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):229-38. doi: 10.1177/08959374940080021601.

35. Vuletic L, Peros K, Spalj S, Rogic D, Alajbeg I. Time-related Changes in pH, Buffering Capacity and Phosphate and Urea Concentration of Stimulated Saliva. *Oral Health Prev Dent.* 2014;12(1):45-53. doi: 10.3290/j.ohpd.a31221.
36. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):11-25. doi: 10.1111/prd.12116.
37. 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. *Sci Rep.* 2017;7(1):8802. doi: 10.1038/s41598-017-09438-0.
38. Ferguson DB, Fort A, Elliott AL, Potts AJ. Circadian rhythms in human parotid saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol.* 1973;18(9):1155-73. doi: 10.1016/0003-9969(73)90089-7.
39. Calvo MS, Uribarri J. Contributions to total phosphorus intake: all sources considered. *Semin Dial.* 2013;26(1):54-61. doi: 10.1111/sdi.12042.
40. Ikuta K, Segawa H, Hanazaki A, Fujii T, Kaneko I, Shiozaki Y, et al. Systemic network for dietary inorganic phosphate adaptation among three organs. *Pflugers Arch.* 2019;471(1):123-36. doi: 10.1007/s00424-018-2242-9.
41. Homann V, Rosin-Steiner S, Stratmann T, Arnold WH, Gaengler P, Kinne RK. Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption. *Arch Oral Biol.* 2005;50(9):759-68. doi: 10.1016/j.archoralbio.2005.01.009.
42. de Sousa ET, Lima-Holanda AT, Nobre-Dos-Santos M. Changes in the salivary electrolytic dynamic after sucrose exposure in children with Early Childhood Caries. *Sci Rep.* 2020;10(1):4146. doi: 10.1038/s41598-020-61128-6.
43. Mandel ID. Salivary diagnosis: promises, promises. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;694:1-10. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb18336.x.

9. 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 esta 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 procesados. 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 realizado 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). 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, 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, 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), 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, 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
Sedentaria	1,2	1,2	Sin actividad
Liviana	1,55	1,56	3 horas semanales
Moderada	1,8	1,64	6 horas semanales
Intensa	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	88.5
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	1 ctda	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	60
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	29
	Totales/ Día			2377	69.3	78.7	339.5

Anexo N°4: Protocolo de dieta

“Protocolo uso de RQflex® para análisis de muestras de saliva”

Corresponde a un método analítico, que consta de tiras reactivas Reflectoquant®, en combinación con un reflectómetro RQflex® para la medición cuantitativa de diferentes sustancias con resultados en minutos, que se basa en la intensidad de la luz reflejada por dos almohadillas reactivas presentes en tiras, que cambian la intensidad del color en función de la concentración de una sustancia específica.

Posee una amplia gama de análisis por lo que es usado para mediciones en diversas áreas como de agricultura, alimentación y estudios del agua

A continuación, se encuentra el protocolo para la cuantificación de concentración de calcio y fosfato inorgánico en saliva con el sistema analítico Reflectoquant®.

Test de Calcio (5 - 125 mg/L)

1. Descripción del método

Los iones de calcio forman con purpura de ftaleína un colorante violeta que se determina reflectométricamente.

El intervalo de medida corresponde 5 – 125 mg/L de Calcio. En el kit de medición viene una caja con 50 tiras de ensayo y una tira de código de barras.

2. Materiales a utilizar

- ✓ Elementos de protección personal
- ✓ Micropipetas
- ✓ Tubos tipo eppendorf 2 mL
- ✓ Muestra de saliva (Volumen mínimo 1mL)

3. Preparación de muestra de saliva

- a. La muestra de saliva debe ser centrifugada a temperatura ambiente a 3000 rpm por 20 minutos. Posterior a esto, se debe separar el sobrenadante del precipitado total generado, y eliminar este último. La muestra resultante debe ser filtrada con filtros

de jeringa de 0,22 um. Una vez filtrada, la solución restante es la que se ocupará para el análisis de concentración de calcio.

- b. El valor del pH debe encontrarse en un intervalo de 5-8. Si esta no se encuentra dentro del intervalo, esta debe ser ajustada con una solución de hidróxido sódico 1 mol/L o con ácido clorhídrico 1 mol/L , de ser necesario

4. Procedimientos

- a. Alicuotar en un tubo tipo eppendorf de 2mL, 400 uL de la muestra de saliva filtrada.
- b. Introducir en el equipo el código de barras que viene en el envase del kit de medición de calcio, y ajustar el equipo para la medición.
- c. Apretar el botón START e introducir de manera simultánea la tira de ensayo en el tubo, de manera de que la muestra cubra ambas almohadillas de reacción por 2 segundos.
- d. Retirar la tira del tubo, y eliminar cuidadosamente los excesos sobre un papel absorbente.
- e. Se debe introducir la tira en el adaptador con las zonas de reacción en dirección a la pantalla antes de transcurrir los 15 segundos de reacción.
- f. Después de transcurrido el tiempo de reacción, leer en la pantalla el valor de la medición de Calcio en mg/L.
- g. Si el valor de la medición es superior al del intervalo de medida (> 125 mg/L), debe repetirse la medición con NUEVAS muestras diluidas hasta obtener un valor inferior. El resultado del análisis debe considerarse en función a la dilución:

Resultado del análisis = valor de la medición x factor de dilución

5. Control del procedimiento

Para la comprobación de las turas de ensayo, del dispositivo de medición y de la manipulación se debe preparar una solución patrón con contenido de calcio de 1000 mg/L. Para ello se debe disolver 3,67 gramos de dihidrato de cloruro de calcio en agua destilada, y aforar hasta 1000 mL. Debe mezclar bien la solución.

Posterior a esto se debe diluir la solución patrón con agua destilada hasta 100 mg/L, 50 mg/L y 10 mg/L de calcio y analizar la concentración de las soluciones en el equipo como ya se ha descrito.

6. Consideraciones

- a. Debe cerrar inmediatamente la caja tras la toma de la tira de ensayo
- b. Limpiar el adaptador de tiras con agua destilada o etanol entre las mediciones para no alterar los resultados.
- c. Las tiras de ensayo deben ser almacenadas entre 2 -8°C.

Test de fosfato inorgánico (5-120 mg/L)

7. Descripción del método

Los iones de fosfato forman con molibdato ácido molibdo- fosfórico que se reduce a un colorante azul de fosfo- molibdeno que se determina reflectométricamente.

El intervalo de medida corresponde 5 – 120 mg/L de fosfato. En el kit de medición viene una caja con 50 tiras de ensayo y una tira de código de barras.

8. Materiales a utilizar

- ✓ Elementos de protección personal
- ✓ Micropipetas
- ✓ Tubos tipo eppendorf 2 mL
- ✓ Muestra de saliva (Volumen mínimo 1mL)
- ✓ Reactivo PO4-1

9. Preparación de muestra de saliva

- a. La muestra de saliva debe ser centrifugada a temperatura ambiente a 3000 rpm por 20 minutos. Posterior a esto, se debe separar el sobrenadante del precipitado total generado, y eliminar este último. La muestra resultante debe ser filtrada con filtros de jeringa de 0,22 μ m. Una vez filtrada, la solución restante es la que se ocupará para el análisis de concentración de calcio.
- b. El valor del pH debe encontrarse en un intervalo de 5-8. Si esta no se encuentra dentro del intervalo, esta debe ser ajustada con una solución de hidróxido sódico 1 mol/L o con ácido clorhídrico 1 mol/L , de ser necesario

10. Procedimientos

- a. Alicuotar en un tubo tipo eppendorf de 2mL, 400 uL de la muestra de saliva filtrada.
- b. Añadir 31 ul de reactivo PO4-1 y agitar hasta obtener una solución homogénea
- c. Introducir en el equipo el código de barras que viene en el envase del kit de medición de fosfato, y ajustar el equipo para la medición.
- d. Apretar el botón START e introducir de manera simultánea la tira de ensayo en el tubo, de manera de que la muestra cubra ambas almohadillas de reacción por 2 segundos.
- e. Retirar la tira del tubo, y eliminar cuidadosamente los excesos sobre un papel absorbente.
- f. Se debe introducir la tira en el adaptador con las zonas de reacción en dirección a la pantalla antes de transcurrir los 90 segundos de reacción.
- g. Después de transcurrido el tiempo de reacción, leer en la pantalla el valor de la medición de Calcio en mg/L.

- h. Si el valor de la medición es superior al del intervalo de medida (> 120 mg/L), debe repetirse la medición con NUEVAS muestras diluidas hasta obtener un valor inferior. El resultado del análisis debe considerarse en función a la dilución:

Resultado del análisis = valor de la medición x factor de dilución

11. Control del procedimiento

Para la comprobación de las turas de ensayo, del dispositivo de medición y de la manipulación se debe utilizar la solución estándar de fosfato de 1000mg/ml

Posterior a esto se debe diluir la solución patrón con agua destilada hasta 100 mg/L, 50 mg/L y 10 mg/L de fosfato y analizar la concentración de las soluciones en el equipo como ya se ha descrito.

12. Consideraciones

- a. Debe cerrar inmediatamente la caja tras la toma de la tira de ensayo
- b. Limpiar el adaptador de tiras con agua destilada o etanol entre las mediciones para no alterar los resultados.
- c. Las tiras de ensayo deben ser almacenadas entre 2 -8°C.