



La saliva: una potencial herramienta en la Odontología

Saliva: a potential tool in Dentistry

Barembaum Silvina R ¹, Azcurra Ana I ²

¹ Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Odontología. Cátedra B de Introducción a la Física y Química Biológicas, Departamento de Biología Bucal. Córdoba, Argentina.

² Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Odontología. Cátedra B de Química Biológica. Departamento de Biología Bucal. Córdoba, Argentina.

Abstract

Saliva is a biological fluid of complex composition that facilitates the interactions between host cells, oral microorganisms and immune modulators with the main purpose of maintaining oral health status. Within the salivary components, proteins are fundamental, because they are responsible for the main functions of saliva. Proteomic studies contributed to identify and characterize between 2,000 and 2,600 different proteins and peptides in their composition. Among them, a high proportion is glycoproteins, such as mucins, proteins rich in proline and immunoglobulins, agglutinins, lactoferrin, cystatins and lysozyme. In addition, saliva possesses peptides of potent antimicrobial activity and protection to mineral tissues, such as cathelicidin LL-37, α and β defensins, histatins and statins. In particular, in recent years the selection of biomarkers of oral diseases such as dental caries, periodontal diseases and oral cancer has been focused, considering the simple, economical and non-invasive obtaining of this fluid, which has driven the development of technologies for the detection of biomarkers with high sensitivity and specificity for a wide variety of oral diseases. The study of the components of saliva and its potential biomarkers makes this fluid a powerful tool for diagnosis and detection of diseases, as well as to evaluate the evolution of therapeutic treatments, because it reflects the physiological and pathological state of the body.

KEY WORDS: salivary proteins and peptides, biomarkers, dental caries, periodontal diseases, oral cancer

Resumen

La saliva es un líquido biológico de composición compleja que facilita las interacciones entre las células del huésped, los microorganismos bucales y los moduladores inmunológicos con el principal propósito de mantener el estado de salud bucal. Dentro de los componentes salivales, las proteínas son fundamentales por ser responsables de las principales funciones de la saliva. Los estudios proteómicos contribuyeron a identificar y caracterizar entre 2.000 a 2.600 proteínas y péptidos diferentes en su composición. Entre ellas, una alta proporción son glucoproteínas, como las mucinas, proteínas ricas en prolina e inmunoglobulinas, aglutininas, lactoferrina, cistatinas y lisozima. Además la saliva posee péptidos de potente actividad antimicrobiana y de protección a los tejidos minerales, como la catelicidina LL-37, α y β defensinas, histatinas y estaterinas. En particular, en los últimos años se ha profundizado la selección de biomarcadores de las enfermedades bucales como caries dental, enfermedades periodontales y cáncer bucal, considerando la sencilla, económica y poco invasiva obtención de este fluido, por lo que se ha impulsado el desarrollo de tecnologías para la detección de biomarcadores con alta sensibilidad y especificidad para una gran variedad de enfermedades bucales. El estudio de los componentes de la saliva y sus potenciales biomarcadores convierte a este fluido en una potente herramienta de diagnóstico y detección de enfermedades, como así también para evaluar la evolución de tratamientos terapéuticos, debido a que refleja el estado fisiológico y patológico del cuerpo.

PALABRAS CLAVE: proteínas y péptidos salivales, biomarcadores, caries dental, enfermedades periodontales, cáncer oral

La saliva es un líquido biológico de alta complejidad por su composición y sus diferentes funciones. El concepto de saliva total representa la combinación de componentes derivados de las secreciones de las glándulas salivales, del líquido crevicular, restos de alimentos y de los microorganismos bucales con sus productos metabólicos. Es una mezcla de agua (99%), electrolitos y componentes orgánicos disueltos en ella. La Fig. 1 representa la composición general de la saliva ^{1,2}.

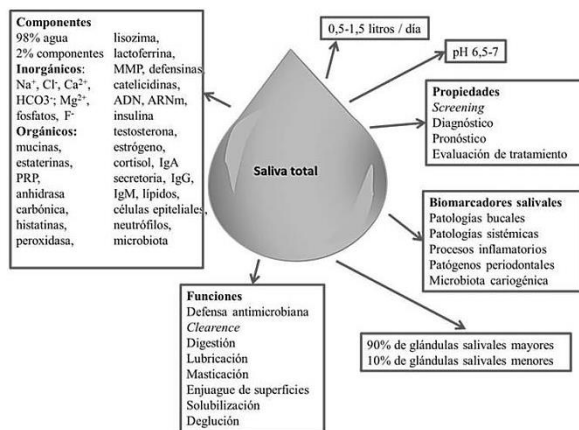


Figura 1: Componentes, propiedades y secreción de la saliva total humana. Adaptado de Rathnayake et al.

Las principales funciones de la saliva son la digestión, de protección, de defensa y de regulación. Sus múltiples funciones se relacionan con su compleja composición como se observa en la Fig. 2 ³.

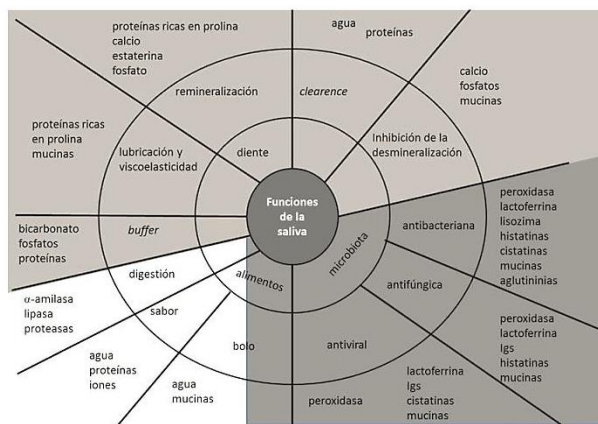


Figura 2: Funciones fisiológicas de la saliva en relación a sus constituyentes. Adaptado de: Uneyama et al. ³

Actualmente la sialometría y la sialoquímica representan una alternativa cada vez más útil para el diagnóstico y/o seguimiento de numerosas enfermedades. En este sentido, los biomarcadores se definen como un parámetro objetivo y mensurable, que sirven como indicador de procesos fisiológicos, del progreso de una patología o del control de la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. La gran cantidad de proteínas, péptidos y de otras moléculas en la saliva pueden ser usados como biomarcadores salivales, lo que convierte a este fluido en una potente herramienta de diagnóstico y detección de enfermedades, como así también permite evaluar la evolución de tratamientos terapéuticos. Los biomarcadores salivales pueden derivar tanto del hospedador como de la microbiota bucal como se muestra en la Fig. 3 ⁴.

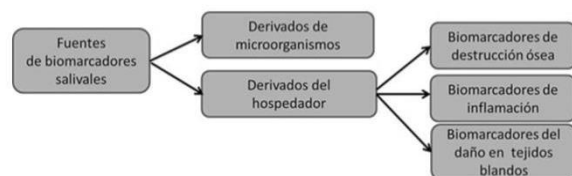


Figura 3: Fuentes de biomarcadores salivales humanos. En: Abdul Rehman et al. ⁴

Los péptidos y proteínas están presentes en baja concentración en la saliva; sin embargo, su presencia es fundamental debido a las múltiples y complejas funciones que presentan. La concentración de proteínas es aproximadamente de 300 mg%; varía dependiendo si se trata de saliva total o de saliva parotídea. En la Fig. 4 se presenta la distribución de las principales proteínas específicas de saliva ⁵.

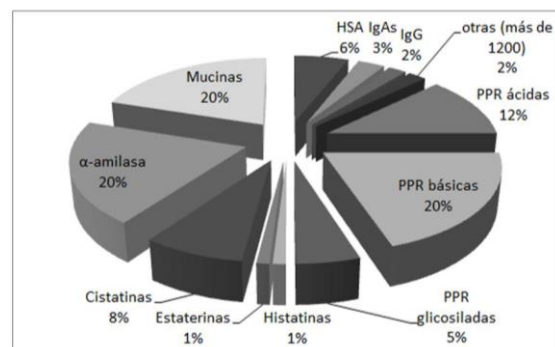


Figura 4: Distribución de las principales proteínas en saliva. Adaptado de: Scarano et al. ⁵

Diversos estudios proteómicos de la saliva han caracterizado entre 2.000 y 2.600 proteínas y péptidos; alrededor de un 26% de estos componentes se encuentran también en la sangre y sólo 130 de las proteínas y/o péptidos forman la película adquirida (PA)⁶⁻⁸. Además, muchas de las proteínas y/o péptidos que se encuentran en la saliva son de origen microbiológico⁹.

El desarrollo de técnicas de mayor sensibilidad y los estudios proteómicos han permitido reconocer nuevos componentes salivales, su rol en el diagnóstico y seguimiento de patologías. Teniendo en cuenta la importancia de la saliva y su participación en la salud bucal y general, el propósito de esta revisión es proporcionar una actualización sobre las principales componentes salivales, sus complejas funciones y su relación con las patologías bucales de mayor prevalencia.

Estrategias de búsqueda

La búsqueda de la información se realizó en diversos motores de búsqueda de libre acceso, como PubMed, ScienceDirect y el Portal regional de la Biblioteca Virtual en Salud (BVS), hasta el 28 de febrero de 2019, sin restricciones de fechas o idioma, utilizando los ítems de búsqueda y palabras clave (“salivary proteins” o “salivary peptides” y “biomarkers”) y (“dental caries” o “periodontal diseases” o “oral cáncer” and “salivary biomarkers”). Los artículos seleccionados cumplían con los siguientes criterios de inclusión: que fueran concernientes a la saliva, sus funciones y su uso como diagnóstico, que fueran tanto artículos originales como de revisión y que estuvieran indexados en las bases de información citadas.

Proteínas salivales

Dentro de estos componentes salivales, las glucoproteínas salivales conforman un amplio grupo con estructuras y funciones diversas. Éstas contribuyen a la formación de la PA y, por ende, determinan el perfil de colonización microbiana y sirven como primera línea de defensa de la cavidad bucal. Entre las glucoproteínas salivales se incluyen: A) las glucoproteínas salivales de mayor concentración (mucinas, proteínas ricas en prolina e inmunoglobulinas), B) las glucoproteínas de

menor concentración (aglutinina, lactoferrina, cistatinas y lisozima) y C) los péptidos antimicrobianos (péptido catelicidina LL-37, α y β defensinas, histatinas y estaterinas)¹⁰.

A) Glucoproteínas de mayor concentración en la saliva

Mucinas

Las mucinas son una familia de proteínas altamente glicosiladas, secretadas por las glándulas exocrinas de todo el organismo. Las de origen salival son sintetizadas por las células de los acinos mucosos de las glándulas submandibulares, labiales y sublinguales. También participan en la producción de mucinas las glándulas salivales menores distribuidas por la mucosa palatina y yugal. En sentido contrario, las glándulas parótidas no participan en la producción de éstas, ya que en ella predominan los acinos serosos. Las mucinas tienen una elevada viscosidad debido a su alto contenido de glúcidos; esta propiedad le otorga un papel principalmente mecánico, emulsionando y facilitando el deslizamiento del bolo alimenticio por el tracto digestivo. Otro papel de las mucinas es el de participar en la composición de la PA, una capa altamente hidratada que protege el epitelio contra enzimas secretadas por los microorganismos y a los elementos dentarios de los daños mecánicos propios de la masticación¹¹.

Las mucinas predominantes en la saliva humana pueden clasificarse según su peso molecular: en alto peso molecular (MG1, PM > 1.000 kDa) y bajo peso molecular (MG2, PM entre 150-200 kDa). A partir de estudios genómicos, en humanos se han identificados 22 genes que codifican para alrededor de 16 tipos de mucinas diferentes. En la saliva se encuentran principalmente las mucinas MUC5AC, MUC5B (antes denominadas MG1) y MUC7 (antes MG2). Éstas podrían participar tanto en la modulación del número y tipo de microorganismos que colonizan la boca como en la composición de la PA. Se proponen dos hipótesis para explicar cómo la MUC5B podría proteger las superficies bucales de la colonización bacteriana; la primera propone que la MUC5B, soluble en saliva, podría unir o aglutinar a bacterias y hongos, lo que permitiría su eliminación en estado planctónico (bacterias libres) por medio del flujo salival. La segunda hipótesis estaría relacionada

con la estructura de las mucinas a través de sus cadenas de glucanos que repelen a las bacterias impidiendo la fijación de las mismas a la superficie dental (Fig. 5)^{12,13}.

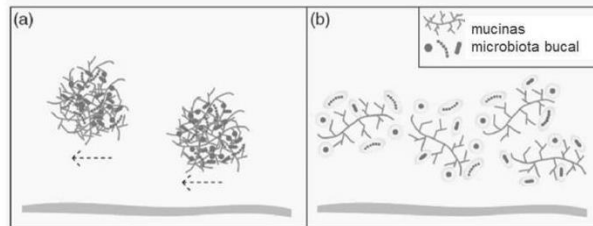


Figura 5: Mecanismos de eliminación de microorganismos por las mucinas a) unión y aglutinación de bacterias y hongos en su estado planctónico y posterior deglución. b) inhibición de la adherencia bacteriana a los tejidos bucales a través de las cadenas de glucanos. En: Frenkel et al.¹²

Proteínas ricas en Prolina (PRP)

Son un grupo heterogéneo de proteínas con un porcentaje alto del aminoácido prolina, sintetizadas por las glándulas parótidas y submandibulares. Se encuentran entre los primeros constituyentes de la PA. Dentro de este grupo de proteínas se distinguen las PRP ácidas, las PRP básicas y las altamente glicosiladas. Las PRP ácidas constituyen de 25-30% de todas las proteínas de la saliva. Poseen un dominio N-terminal de 30 aminoácidos que se adhiere fuertemente al esmalte dentario, lo cual transmite un cambio conformacional que expone un sitio de unión para las bacterias dentro del dominio C-terminal. Así, promueven la formación de la PA y colonización bacteriana durante la formación del *biofilm*, en especial del *Streptococcus mutans*. Sus grupos ácidos se cargan negativamente a pH fisiológico y se unen a iones Ca^{2+} libres manteniendo niveles de sobresaturación, lo que promueve la remineralización del tejido dentario y regula el depósito de fosfato de calcio. Las PRP básicas se han asociado con la resistencia a caries dental en niños, por inactivación de los ácidos bacterianos en el *biofilm* dental. Además, las PRP han sido propuestas como una primera línea de defensa contra la agresión de los taninos que pueden estar presentes en altas concentraciones en los alimentos, como adyuvantes en medicamentos y derivados del procesamiento del algodón. Los taninos pueden producir hepatotoxicidad y otros

trastornos tóxicos. Estudios en ratas han demostrado que el agregado de taninos a la dieta induce la expresión de la familia multigénica de las PRP^{14,15}.

α - amilasa salival

La α -amilasa salival (α AS) es la enzima más abundante en la saliva, producida principalmente por los acinos serosos de la glándula parótida pero también por las glándulas sublinguales, submaxilar y las menores. Es un buen indicador de la función de las glándulas salivales y de la salud general de un individuo¹⁶. El principal sustrato de la α AS son los almidones y los productos finales de la digestión son glucosa, maltosa y dextrinas. Su concentración normalmente aumenta durante el consumo de alimentos ricos en glúcidos y con niveles de estrés alto y ha sido identificada como una de los principales componentes de la PA¹⁷, en la que se dispone aleatoriamente en capas consecutivas; sin embargo, las capas externas de la PA presentan mayor actividad enzimática que las inferiores. Esto es como resultado del acceso limitado del sustrato de la enzima a las capas más profundas de la PA. Luego de la pérdida de las capas externas de la PA, las nuevas capas se exponen y por lo tanto se reactiva la actividad enzimática. La distribución de la α AS en humanos varía considerablemente en diferentes partes de la cavidad bucal, lo que sugiere que la PA en los diferentes sitios de la boca puede contener y exponer diferentes niveles de α AS¹⁸ y los diferentes sustratos alimenticios pueden tener un impacto en la inmovilización y actividad de las enzimas en la PA⁷.

La α AS unida a la PA favorece principalmente la adhesión bacteriana a dicha película, a diferencia de la lisozima, y se la considera como uno de los principales receptores de la adherencia bacteriana a la PA¹⁹. Por lo tanto, ha sido postulado que la abundancia de α AS en la PA es un indicador de la interacción α AS – bacteria, que contribuye al establecimiento del *biofilm* dental, al igual que la lisozima y peroxidasa, juegan un papel multifacético en la fisiología y en el proceso de interacción con los estreptococos orales, en la adhesión a la PA e interbacteriana (coagregación) y en la interacción dentro del *biofilm*, aportando nutrición a la microbiota cariogénica^{20,21}.

La actividad de α AS puede ser inhibida por los taninos de la dieta presentes en el vino tinto, uvas, té, café, espinacas y manzanas; la presencia de Hst en la PA tendría el potencial de proteger la α AS de este efecto inhibitor ²².

Inmunoglobulinas

La saliva contiene una gran variedad de agentes con función antimicrobiana, entre ellos las inmunoglobulinas (Igs). Estas glucoproteínas se encuentran en diferentes concentraciones en la sangre y en la saliva y forman parte de la inmunidad adquirida. Las Igs salivales componen aproximadamente entre el 5-15% de las proteínas salivales totales. La IgA secretoria (IgAs) es la principal inmunoglobulina salival; el resto pertenece a los isotipos IgG y IgM. La IgAs, sintetizada por las glándulas salivales mayores y menores, constituye alrededor del 60% de las Igs de la saliva, juega un papel crítico en la inmunidad de las mucosas ya que son capaces de aglutinar a las bacterias e impedir su adhesión a los diferentes tejidos de la boca. Otros mecanismos de acción de la IgAs son la neutralización de las toxinas y enzimas bacterianas, inhibición del metabolismo bacteriano, reducción de la hidrofobicidad de las bacterias y agregación de las mismas ²³.

B) Glucoproteínas de menor concentración en la saliva

Aglutininas

Las aglutininas salivales son glucoproteínas ácidas de alto peso molecular (340 kDa) secretadas por las glándulas salivales parótidas, submandibulares y sublinguales. Las aglutininas constituyen un agente inmunológico innato, se unen a bacterias, entre ellas a *S. mutans* en su estado planctónico y de esta manera facilitan su eliminación. Estas glucoproteínas poseen sitios específicos de unión tanto a hidroxapatita (HAp), mediante los dominios de aminoácidos con carga negativa, como a bacterias ²⁴. Se ha observado correlación de esta proteína con la adhesión a bacterias pero no con la experiencia de caries ²⁵.

Lactoferrina

La lactoferrina (Lf) es una glucoproteína producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos, de neutrófilos y glándulas salivales. En la leche, y particularmente en el calostro, es donde se encuentra en mayor concentración. Pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, denominadas transferrinas, que poseen una alta afinidad para unir iones férricos (Fe^{+3}). El hierro es un nutriente indispensable para el crecimiento de las bacterias, por lo tanto Lf, al captar estos iones, tiene propiedades bacteriostáticas para algunos microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, compitiendo con las bacterias por dicho nutriente. Posee una potente actividad contra bacterias (Gram positivas como *S. mutans*), hongos, parásitos y virus. Lf tiene la capacidad de unir y matar bacterias a través de interacciones directas a través de la región N-terminal fuertemente básica de la glucoproteína, que consta de 47 aminoácidos ²⁶. Además, Lf y otros péptidos catiónicos son capaces de neutralizar la interacción entre lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y células de defensa del huésped. Esta interacción puede alterar la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y liberar los LPS. Debido a su actividad antimicrobiana, se considera que la Lf salival desempeña un papel importante en la susceptibilidad a la caries ²⁷.

Cistatinas

Corresponden a una familia heterogénea de fosfoproteínas, sintetizadas en las glándulas submandibulares y parótidas, con un sitio activo evolutivamente conservado con una abundante cantidad del aminoácido azufrado cisteína. Las cistatinas poseen acción antimicrobiana e inmunomoduladora. Se unen a la HAp del esmalte y juegan un rol especial en la formación de la PA y la remineralización del esmalte ^{8,28}. Abarcan un grupo de cinco proteínas diferentes de origen salival (S, S1, S2, SA, SN). Son esenciales porque protegen los tejidos de la proteólisis inadecuada; pero la expresión elevada de cistatinas está asociada con la tumorigénesis. En particular, una subclase de SN está involucrada en la invasión tumoral y la metástasis ²⁹.

Lisozima

La lisozima (Lis) es secretada por las glándulas salivales y los neutrófilos. Es un componente abundante en varias secreciones como lágrimas, saliva, leche, líquido crevicular y moco, y también está presente en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos. La Lis también conocida como muraminidasa es una enzima con función bactericida, ya que su acción enzimática daña la pared celular bacteriana por catalizar la hidrólisis del enlace β -1,4 del ácido N-acetilmurámico con residuos de N-acetil-D-glucosamina en el péptidoglicano de la pared de las bacterias y de hongos³⁰.

C) Péptidos salivales

Los péptidos presentes en saliva pueden ser catiónicos, como la catelicidina, histatina y defensinas, también conocidas como CAMPs, o de carácter aniónico, como las estaterinas. Son pequeños péptidos cargados activos contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, virus y parásitos. Los estudios han propuesto diferentes mecanismos de acción: permeabilización / ruptura de la membrana de las células diana por despolarización, pérdida de iones vitales y otros componentes celulares, lisis y muerte celular³¹.

Catelicidina LL-37

Son péptidos antimicrobianos de 18 kDa secretados por las glándulas salivales y los neutrófilos. Su acción se relaciona con su estructura catiónica, al agregar microorganismos y generar canales iónicos y poros que causan daño sobre la membrana plasmática.

A pesar de que algunos estudios han observado una correlación positiva entre niveles elevados de LL-37 y de *S.mutans*, existen reportes contradictorios de la relación de este péptido y la presencia de caries^{32,33}.

Histatinas

Las histatinas (Hst) son una familia de pequeños péptidos (de 7 a 38 aminoácidos) sintetizados en las glándulas parótidas y submandibulares. Esta familia de péptidos tiene función antimicrobiana y

son un importante componente del sistema de defensa innata de la cavidad bucal. Diferentes estudios *in vitro* demuestran que las Hst exhiben propiedades

tanto antibacterianas como antifúngicas ya que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos como *S. mutans* y *Candida albicans*. En la saliva se han identificado al menos 12 Hst diferentes que estructuralmente están relacionadas; estos péptidos son ricos en algunos aminoácidos como arginina, histidina y lisina. Su carga positiva le permite adherirse fuertemente tanto a los cristales de HAp, como a las superficies de los microorganismos y generar poros en las membranas o pared celular que generalmente poseen cargas negativas. Las subclases más comunes son Hst 1, Hst 3 e Hst 5, con 38, 32 y 24 residuos de aminoácidos respectivamente. Estas tres formas representan aproximadamente el 85% de las Hst totales en la saliva. Especialmente la Hst 1 juega un papel en la reducción de la colonización bacteriana sobre las superficies dentales porque tiene la capacidad de incorporarse a la PA y bloquear el sitio de unión de bacterias en las superficies dentales. Se ha descrito que la Hst 5 es la principal proteína antifúngica sintetizada por las glándulas salivales humanas. Es incorporada a las células de *C. albicans* a través de transportadores específicos, causando estrés oxidativo y osmótico que afecta las funciones mitocondriales del hongo. Sin embargo, la acción más importante es inducir la liberación de iones K^+ y de ATP provocando la muerte celular¹³.

Defensinas

Las defensinas son péptidos antimicrobianos de carácter catiónico, de bajo peso molecular (4–5 kDa) con alto contenido de aminoácidos básicos capaces de elevar el pH del *biofilm* cariogénico e impedir el desarrollo de caries. Son expresadas principalmente por células epiteliales y neutrófilos, y secretadas en fluidos biológicos como orina, fluidos bronquiales, secreciones nasales, saliva y fluido gingival. La acción antimicrobiana de las defensinas se sustenta en las interacciones electrostáticas entre estos péptidos catiónicos con la pared celular de bacterias, hongos y virus que presentan cargas negativas, lo que conducen a la formación de poros que generan la fuga de componentes intracelulares y la muerte de los

microorganismos³⁴. Se reconocen dos tipos de defensinas: las α -defensinas y las β -defensina. Los estudios *in vitro* muestran una actividad antimicrobiana inespecífica de ambos tipos³⁵; estudios clínicos en niños de edad temprana mostraron una relación inversa entre experiencia de caries y altos niveles de ambos tipos de defensinas³². Las β -defensinas son eficaces contra un amplio espectro de bacterias, entre ellas bacterias cariogénicas como *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y también contra bacterias periodontales como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*³⁶.

Estaterina

Es un péptido ácido que está involucrado en la homeostasis del calcio, de 43 aminoácidos, no glicosilado, que contiene residuos de fosfoserina en las posiciones 2 y 3, rico en tirosina y prolina. Este péptido tiene el segmento N-terminal cargado negativamente que le permite unirse a la HAp. La estaterina es secretada por las glándulas salivales mayores y menores; al igual que la Hst y las PRP, los niveles de estaterinas son sustancialmente más bajos en la saliva total debido a la degradación proteolítica que sucede en la boca^{37,38}. Es el péptido salival más potente para inhibir la precipitación tanto del calcio como del fosfato y por lo tanto se cree que es un componente esencial en el mantenimiento de estos iones de la saliva en un estado sobresaturado. Esta sobresaturación salival proporciona importantes mecanismos para prevenir las etapas iniciales de caries dental como así también de regular la formación de cálculos dentales, que contribuyen como un factor local en el desarrollo de las enfermedades periodontales. Varios estudios han demostrado que las proteínas salivales específicas, PRP ácidas, Hst, cistatinas y estaterinas tienen una gran afinidad por la unión a HAp y por eso son capaces de inhibir la biomineralización no deseada del esmalte³⁷.

En la cavidad bucal, las proteasas que hay en la saliva escinden a la estaterina, lo que produce una rápida degradación de esta proteína y una pérdida virtual de sus características³⁹. Sin embargo, se han identificado recientemente péptidos que provienen de dicha proteína que forman parte de la PA. Los mismos son el producto de la fragmentación proteolítica de las proteínas

salivales en la cavidad bucal y se ha subestimado su presencia; esto las ha convertido en un foco de atención e investigación, lo que condujo a la hipótesis de que los péptidos salivales dentro de la PA conservan las propiedades moduladoras de las moléculas originales sobre los minerales, que inhiben el crecimiento de cristales de HAp⁶.

A pesar de esta característica común, los mecanismos fisiológicos de cómo estas proteínas salivales evitan la remineralización en la cavidad oral no se conocen por completo. Algunos estudios consideran a la estaterina como la proteína inhibidora de precipitación de fosfato de calcio más potente en la saliva⁴⁰.

Papel de las Proteínas salivales en algunas enfermedades bucales

La saliva es el medio que facilita las interacciones entre los microorganismos bucales, las células del huésped y los moduladores inmunológicos en un constante equilibrio dinámico con el principal propósito de mantener el estado de salud bucal. La hipofunción de las glándulas salivales y la xerostomía como resultado de enfermedades autoinmunes, como es el Síndrome de Sjögren, o como consecuencia de tratamientos médicos o medicamentos, ponen en evidencia el papel protagónico que tiene la saliva en la boca.

La caries y las enfermedades periodontales constituyen las enfermedades bucales de mayor prevalencia, y por su gravedad, el cáncer bucal, por lo que se detallará la relación de algunos componentes salivales con estas patologías.

A) Caries

La saliva colabora de diversas maneras en prevenir la caries, tanto por el lavado mecánico como por su función antimicrobiana, de remineralización y de regulación del pH mediante la acción de sus amortiguadores. Los sistemas amortiguadores restituyen el pH al rango normal tan rápido como sea posible cuando la cavidad bucal se expone a alimentos o bebidas que difieren del pH fisiológico (6,5-7,5). A valores muy bajos de pH (4,0-4,5) las proteínas son el principal agente regulador mientras que en estado de reposo, lo es el fosfato inorgánico. Éstos son provistos por la fosfatasa alcalina por desfosforilación de nucleótidos, proteínas y alcaloides. Las variaciones de los

niveles de esta enzima producen cambios en los niveles salivales de fosfatos, lo que conduce a la iniciación y progresión de caries ⁴¹.

Algunos autores han reportado valores mayores de esta enzima en niños sin lesiones cariosas que en niños con caries activas ^{42, 43}. En la saliva estimulada, el principal sistema regulador es el del ácido carbónico / bicarbonato; la secreción parotídea provee el bicarbonato responsable de restablecer el pH salival.

Las mucinas, junto con la IgAs, ayudan a modular tanto el número como el tipo de microorganismos que colonizan los diferentes tejidos de la cavidad bucal, mediante la adhesión y proliferación de ciertos microorganismos en detrimento de otros. Específicamente, la mucina salival MUC5B disminuye significativamente la unión de *S. mutans* a las superficies dentales e impide la colonización del *biofilm* bucal por esta bacteria, aún en un medio rico en sacarosa, permaneciendo principalmente esta bacteria en estado planctónico. Sin embargo esta mucina no altera el crecimiento de *S. mutans*, por lo que carece de poder bactericida ¹². La adsorción selectiva de las mucinas sobre las superficies dentales, contribuye a la formación de una barrera semipermeable que protege a los tejidos duros del efecto desmineralizante que tienen los diferentes ácidos formados por la microflora bacteriana adyacente. Existen evidencias sobre la relación inversa entre los niveles de mucina en la saliva y la incidencia de caries ^{12,44}.

En un estudio se compararon la actividad de α -amilasa y otros parámetros salivales en niños libres de caries con niños con caries activas y se observó que el pH, la capacidad buffer y el nivel de calcio y fósforo aumentaron con la disminución de la actividad de caries en los niños, mientras que la actividad de α -amilasa se incrementó con el aumento de la actividad de caries ^{45,46}. Esto estaría relacionado con su actividad enzimática específica en la PA y en el *biofilm* cariogénico ^{19,47}. Así mismo, existe controversia respecto a la relación entre la IgAs y la caries dental. De hecho, muchos estudios han reportado niveles significativamente más altos de IgAs en niños con caries de edad temprana (CET) ⁴⁸ y la alta concentración de IgAs en esos niños puede estar asociada con un aumento de la carga antigénica, en especial de *S. mutans*, lo que explicaría la alta producción de anticuerpos. Sin embargo otro informe no reportó correlación

entre la concentración de IgAs y la actividad de caries entre los niños de edades similares ⁴⁹. Otro factor inmunológico, la IgG salival, desempeña un papel protector en la cavidad bucal al inhibir el crecimiento, la adherencia y la producción de ácido de *S. mutans*. De manera similar a la IgAs, diversos estudios mostraron una correlación entre los niveles más altos de IgG salival total y la prevalencia de CET, mientras que el nivel de IgM total fue similar en niños con y sin CET ⁵⁰. El aumento de la producción de anticuerpos está relacionado con la carga antigénica; por lo tanto, no es sorprendente que haya un aumento de las concentraciones de inmunoglobulinas salivales en niños con CET. Debido a la asociación entre CET y el aumento de las concentraciones de IgAs e IgG salival, puede ser útil determinar estas moléculas como biomarcadores de riesgo de caries ¹⁰. Por su parte Lf, debido a su actividad antimicrobiana, también desempeña un papel importante en la susceptibilidad a la caries. Otro componente salival que tiene relación con caries es la aglutinina; como su nombre lo indica tiene la capacidad de actuar como aglutinante de *S. mutans* planctónico y así facilitar su eliminación ⁵¹. Algunos estudios reportaron una correlación positiva entre los niveles salivales de aglutininas y el aumento de *S. mutans* en *biofilm* y la susceptibilidad a la caries dental.

Otro componente salival, la estaterina reduce la colonización bacteriana y fúngica, por agregación de los microorganismos, al reducir la capacidad de adhesión sobre los tejidos duros y blandos bucales. Algunos autores han observado que la estaterina reduce la adhesión de *S. mutans* a HAp ⁵² y también encontraron una fuerte correlación entre los niveles salivales de estaterina y la ausencia de caries ^{8,53}. Dentro de las PRP, las PRP básicas se han asociado con la resistencia a caries dental en niños, por inactivación de los ácidos bacterianos en el *biofilm* dental ⁵⁴. Con relación a la familia de las Hst, un estudio *in vitro* mostró que la Hst 1 reduce la adhesión de *S. mutans* a las superficies de HAp mediante la inhibición de la adsorción de glucoproteínas de alto peso molecular salival ⁵². Por otra parte, un estudio en niños pequeños no encontró asociación significativa entre la concentración de Hst 3 salival y la incidencia de caries ³² mientras que otros autores demostraron un aumento significativo de la concentración de Hst 5 en saliva en niños con CET ⁵⁵. Un estudio

longitudinal más reciente encontró que el aumento de Hst en la saliva se correlaciona con una mayor incidencia de CET⁵⁶. Debido a la evidencia disponible, se puede considerar que las Hst salivales constituyen un biomarcador del riesgo de caries en niños pequeños¹⁰.

B) Enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales (EP) se inician y se propagan a través de un desequilibrio de las interacciones entre la microbiota bucal y el sistema inmune del hospedador. El diagnóstico de estas patologías se hace principalmente por indicadores clínicos como la profundidad de bolsa, sangrado de encía, pérdida de hueso alveolar e imágenes radiográficas, acompañado muy rara vez por estudios microbiológicos⁵⁷. En los últimos años se han estudiado posibles marcadores salivales, considerando la ventaja del uso de este fluido respecto al crevicular, por su obtención más sencilla y menos invasiva. Entre las bacterias específicas relacionadas con las EP, el complejo rojo de Socransky⁵⁸ constituido por *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*, han probado ser biomarcadores de estas enfermedades a través de estudios genómicos^{59,60}. Estas bacterias Gram negativas producen LPS, que pueden identificarse tanto en el fluido crevicular como en la saliva. Los LPS son endotoxinas bacterianas y se comportan como un importante factor de virulencia de este tipo de bacterias. Diversos estudios han correlacionado la concentración de LPS salival con la actividad del LPS en suero, y esta correlación aumenta cuando la enfermedad periodontal está presente⁶¹. Este hallazgo apoya la lógica de que un aumento en la abundancia de bacterias Gram negativas bucales aumenta los niveles locales de LPS, de mediadores pro inflamatorios y del riesgo de enfermedades cardiovasculares. La saliva contiene grandes cantidades de LPS y su efecto biológico es 10.000 veces mayor que la del suero. Por lo tanto, el LPS es considerado un biomarcador de la relación entre el microbioma y los trastornos cardiometabólicos⁶¹. Se han propuesto numerosos biomarcadores salivales de las EP, tales como enzimas arginasa, dipeptidil peptidase IV, β -glucuronidasa y mieloperoxidasa, fosfatasa alcalina, proteínas antimicrobianas lactoferrina y calprotectina, citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6,

IL-18, IFN- γ y MIP-1a y proteínas que median la inflamación quemerina, CRP, TLR4, CD14 soluble, RANK-L y procalcitonina. Particularmente, la IL-1 β , MIP-1a (que degrada colágeno tipos I y III) y la arginasa son biomarcadores que se correlacionan con el índice gingival y el de sangrado gingival mientras que el incremento de los biomarcadores la IL-8 y la mieloperoxidasa aumentan los índices de riesgo de pérdida dentaria, profundización de bolsas periodontales y signos de inflamación periodontal^{62,63}. En el progreso de la destrucción de los tejidos periodontales, también pueden identificarse en la saliva metaloproteinasas de la matriz periodontal, como MMP-8 y MMP-9, la enzima LDH y la aspartatoaminotransferasa y el TIMP-2^{4,60,64,65}. Además de estas proteínas, otros metabolitos salivales como el óxido nítrico, la 8-hidroxideoxanosina, el factor de activación plaquetario y metabolitos de los ácidos grasos (neopterina, docosapentaenoato, linoleato, lisolípido, monoacilglicerol y araquidonato) han sido asociados a los procesos inflamatorios⁶⁰. Se ha observado que estos marcadores se encuentran aumentados en los pacientes con enfermedad periodontal respecto a controles sanos, en correlación directa con la carga bacteriana periodontopática, e inclusive se ha reportado su disminución luego de 6 a 12 semanas de terapias profilácticas⁶⁶.

C) Biomarcadores salivales para cáncer bucal

El carcinoma de células escamosas (CCE) está entre los cánceres más comunes en el mundo, correspondiendo a más del 90% de los tumores malignos de los tejidos bucales. En los casos de detección temprana, la supervivencia de más de 5 años es de más del 90% de los casos, mientras que el diagnóstico tardío disminuye el tiempo de supervivencia a menos del 50%⁶⁷. Es por ello que los aumentos en el tiempo de supervivencia están relacionados con la mejora de la detección temprana y la búsqueda de marcadores específicos de esta patología, por lo que son necesarias herramientas no invasivas para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del cáncer bucal⁶⁸⁻⁷⁰. Un importante desafío para los investigadores es encontrar alternativas que permitan observar expresiones alteradas de diversos metabolitos o biomarcadores en cánceres, como el CCE, con

diferentes grados de sensibilidad y especificidad ⁷¹. La batería de biomarcadores se ha ampliado vertiginosamente; entre ellos están las proteínas kininógeno-1, angiotensinógeno, anexina A1, IL-8, α -integrina, porciones variables de las cadenas pesadas y livianas de la IgG, proteína C reactiva, cadena α -1 y α -2 de colágeno, vitronectina y fibronectina ^{69,72}. Otros estudios incluyen biomarcadores salivales para cáncer bucal como nitrosaminas, CD44, CD59, anticuerpos contra p53, antígeno tumoral M2BP, MRP14, profilina, histona H1, moesina, involucrina, catalasa, transferrina, “zinc finger” salival, queratina 36 y cistatina A. De manera similar, las citoquinas dependientes de NF-kB, como las inmunosupresoras IL-4, IL-10, IL-13, and IL-1RA, han sido identificadas como potenciales biomarcadores de lesiones pre neoplásicas y de cáncer bucal de células escamosas ⁷³⁻⁷⁶. Además, los valores anormales en las concentraciones de los aminoácidos alanina y leucina han sido señalados como sugestivos de malignización de procesos en las glándulas parótidas por la alteración en las vías metabólicas de los cuerpos cetónicos y de los aminoácidos glucogénicos ⁷⁷. Otros trabajos han propuesto como marcadores salivales a moléculas, como la colina, la betaína, el ácido pipercolínico y la L-carnitina ^{78,79}. Sin embargo, estos potenciales biomarcadores deben ser validados clínicamente en estudios más extensos antes de que puedan usarse en el futuro como herramienta de diagnóstico ^{79,80}.

Potenciales usos terapéuticos de componentes salivales

A partir del conocimiento de la composición y la función de los péptidos salivales, la industria farmacéutica ha desarrollado péptidos sintéticos para su aplicación que ha permitido optimizar el uso superando varios inconvenientes clínicos, tales como la estabilidad y la citotoxicidad ³⁶. Dado sus propiedades antimicrobianas, las Hst son muy adecuadas para aplicaciones de diversos productos farmacéuticos por su capacidad para inhibir la acumulación de placa y la inflamación gingival en modelos animales. Se han formulado enjuagues bucales y geles que contienen P113, un fragmento ácido de Hst 3 para la prevención de la candidiasis y enfermedad periodontal; los ensayos en etapas preclínicas mostraron seguridad y efectividad ⁸¹. Además se han descrito nuevas moléculas como

los factores “trébol”, secretados por las glándulas salivales y la mucosa bucal, considerados citoprotectores contra el daño celular y la respuesta inmune, por lo que se han empleado en formulaciones tópicas para reducir las molestias bucales asociadas a quimioterapia ⁸².

Otro campo de la biomedicina en la que estos péptidos naturales podrían tener aplicación en el futuro, es la implantología. El derivado de la Hst 5, JH8194, representa un prometedor sustrato de superficie en implantes dentales, para mejorar la oseointegración y disminuir las infecciones, pues al ser inmovilizado sobre una superficie de titanio mostró actividad antimicrobiana y aumentó la diferenciación de osteoblastos ⁸³.

En relación al tratamiento y prevención de la caries dental, un estudio clínico mostró la eficacia de una pasta dental que combina Lf, lactoperoxidasa y Lis, en el que se observó la reducción en el recuento salival de *S. mutans* y *L. acidophilus* en niños con CET ¹⁰. Además, un estudio *in vitro*, demostró que el efecto bactericida de Lf contra *S. mutans* es dependiente de la dosis. Estos estudios demuestran que Lf disminuye la colonización de *S. mutans* y, por lo tanto, podría usarse para la prevención de caries dental.

Conclusiones

La saliva con su alto nivel de complejidad en su composición y diversas funciones convergen en un equilibrio dinámico con el resto de las estructuras necesario para el mantenimiento de la salud bucal. Debido al gran número de componentes locales y sistémicos presentes en la saliva, se convierte en un material biológico rico para el diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades, como de sus posibles tratamientos. Además en la actualidad, la saliva es una herramienta ideal de investigación y en este sentido, será necesario desarrollar tecnologías para la detección de biomarcadores con alta sensibilidad y especificidad, para una gran variedad de enfermedades bucales y sistémicas.

Todos los autores declaran que no existen conflictos potenciales de interés con respecto a la autoría y / o publicación de este artículo.

All authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article

Referencias

1. Rathnayake N, Gieselmann DR, Heikkinen AM, Tervahartiala T, Sorsa T. Salivary Diagnostics-Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics (Basel)* 2017;7(1)pii: E7.
2. Juárez RP, Celía, AC. Rol de la saliva en la homeostasis de la cavidad bucal y como medio de diagnóstico. *Rev Dent Chile* 2015;106(2):15-8.
3. Uneyama H, Kawai M, Sekine-Hayakawa Y, Torii K. Contribution of umami taste substances in human salivation during meal. *J Med Invest* 2009;56 Suppl:197-204.
4. Abdul Rehman S, Khurshid Z, Hussain Niazi F, Naseem M, Al Waddani H, Sahibzada HA, et al. Role of Salivary Biomarkers in Detection of Cardiovascular Diseases (CVD). *Proteomes* 2017; 5(3): 21.
5. 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.
6. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 2012;91(12):1110-8.
7. van der Mei HC, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Knight J, Baig AA, Smit J, et al. Influence of dentifrices and dietary components in saliva on wettability of pellicle-coated enamel in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci* 2002;110:434-8.
8. Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Duarte JA, Domingues PM, Amado FM. Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS. *J Sep Sci* 2008; 31(3): 523-37.
9. Kościelniak D, Jurczak A, Zygmunt A, Krzyściak W. Salivary proteins in health and disease. *Acta Biochim Pol.* 2012;59 (4):451-7.
10. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci* 2017;9(11):e1.
11. Lindén SK, Wickström C, Lindell G, Gilshenan K, Carlstedt I. Four modes of adhesion are used during *Helicobacter pylori* binding to human mucins in the oral and gastric niches. *Helicobacter.* 2008;13(2):81-93.
12. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins in host defense and disease prevention. *J Oral Microbiol.* 2015; 7:29759.
13. Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*-mediated Oral Diseases. *J Dent Res* 2016;95(4):365-71.
14. Carlson DM, Zhou J, Wright PS. Molecular Structure and Transcriptional Regulation of the Salivary Gland Proline Rich Protein Multigene Families. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol Biol* 1991;41:1-22.
15. Mehansho H, Hagerman A, Clements S, Butler L, Rogler J, Carlson DM. Modulation of Proline-Rich Protein Biosynthesis in Rat Parotid Glands by Sorghums with High Tannin Levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:3948-3952 (1983).
16. Nagler RM. Ionizing irradiation and the salivary gland sequelae. *Biomed Rev* 1998;9:121-9.
17. Deimling D, Breschi L, Hoth-Hannig W, Ruggeri A, Hannig C, Nekrashevych Y, et al. Electron microscopic detection of α -amylase in the in situ formed pellicle. *Eur J Oral Sci* 2004;112:503-9.
18. Carlen A, Borjesson AC, Nikdel K, Olsson J. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res*1998;32:447-55.
19. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase pro-motes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J DentRes* 1995;74:1360-6.
20. Hannig C, AttinT, HannigM, HenzeE, BrinkmannK, ZechR. Immobilisation and activity of human α -amylase in the acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 469-78.
21. Nikitkova AE, Haase EM, Scannapieco FA. Taking the starch out of oral biofilm formation: molecular basis and functional significance of salivary α -amylase binding to oral streptococci. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(2):416-23.
22. Kandra L, GyemantG, ZajacZA, BattaG. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(4):1265-71.
23. Brandtzaeg P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol.* 2013;4:222.
24. Bikker FJ, Cukkemane N, Nazmi K, Veerman EC. Identification of the hydroxyapatite-binding domain of salivary agglutinin. *Eur J Oral Sci* 2013;121:7-12.
25. Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Källestål C, Strömberg N. The association of bacterial adhesion with dental caries. *J Dent Res* 2001;80:2005-10.
26. Chapple DS, Hussain R, Joannou CL, Hancock RE, Odell E, Evans RW, et al. Structure and association of human lactoferrin peptides with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(6):2190-8.
27. Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate

- immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem* 2006; 281(3):1636-43.
28. Dickinson DP. Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making—but to what purpose? *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(6):485-508.
 29. Kim JT, Lee SJ, Kang MA, Park JE, Kim B-Y, Yoon D-Y, et al. Cystatin SN neutralizes the inhibitory effect of cystatin C on cathepsin B activity. *Cell Death Dis* 2013;4(12):e974.
 30. Lynge Pedersen AM, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent* 2019;80 Suppl 1:S3-12.
 31. Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res* 2017;96(3):254-60.
 32. Ribeiro TR, Dria KJ, de Carvalho CB, Monteiro AJ, Fonteles MC, de Moraes Carvalho K, Fonteles CS. Salivary peptide profile and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent* 2013;23(3): 225-34.
 33. Colombo NH, Ribas L, Pereira JA, Kreling PF, Kressirer CA, Tanner AC, et al. Antimicrobial peptides in saliva of children with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol* 2016;69:40-6.
 34. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2005; 7(2):119-33.
 35. Yin C, Dang HN, Gazor F, Huang GT. Mouse salivary glands and human β -defensin-2 as a study model for antimicrobial gene therapy: Technical considerations. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:352-60.
 36. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:22-50.
 37. Inzitari R, Cabras T, Rossetti DV, Fanali C, Vitali A, Pellegrini M, Paludetti G, Manni A, Giardina B, Messina I, Castagnola M. Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives. *Proteomics* 2006;6:6370-9.
 38. Helmerhorst EJ, Traboulsi G, Salih E, Oppenheim FG. Mass spectrometric identification of key proteolytic cleavage sites in statherin affecting mineral homeostasis and bacterial binding domains. *J Proteome Res* 2010;9(10):5413-21.
 39. Xiao Y, Karttunen M, Jalkanen J, Mussi MC, Liao Y, Grohe B, et al. Hydroxyapatite Growth Inhibition Effect of Pellicle Statherin Peptides. *J Dent Res* 2015;94(8):1106-12.
 40. 41-Vijayaprasad KE, Ravichandra KS, Vasa AA, Suzan S. Relation of salivary calcium, phosphorus and alkaline phosphatase with the incidence of dental caries in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2010;28(3):156-61.
 41. Kaur A, Kwatra KS, Kamboj P. Evaluation of non-microbial salivary caries activity parameters and salivary biochemical indicators in predicting dental caries. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2012;30(3):212-7.
 42. Cardoso AA, Lopes LM, Rodrigues LP, Teixeira JJ, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M. Influence of salivary parameters in the caries development in orthodontic patients-an observational clinical study. *Int J Paediatr Dent* 2017;27(6):540-50.
 43. Sun X, Huang X, Tan X, Si Y, Wang X, Chen F, et al. Salivary peptidome profiling for diagnosis of severe early childhood caries. *J Transl Med* 2016;14(1):240.
 44. Singh S, Sharma A, Sood PB, Sood A, Zaidi I, Sinha A. Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study. *J Oral Biol Craniofac Res* 2015;5(2):59-64.
 45. Fiehn NE, Oram V, Moe D. Streptococci and activities of sucrases and alpha-amylases in supragingival dental plaque and saliva in three caries activity groups. *Acta Odontol Scand* 1986;44(1):1-9.
 46. Borghi GN, Rodrigues LP, Lopes LM, Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M. Relationship among α amylase and carbonic anhydrase VI in saliva, visible biofilm, and early childhood caries: a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 2017;27(3):174-82.
 47. Omar OM, Khattab NM, Rashed LA. Glucosyltransferase B, immunoglobulin A, and caries experience among a group of Egyptian preschool children. *J Dent Child (Chic)* 2012;79(2):63-8.
 48. Shifa S, Muthu MS, Amaral D, Rathna Prabhu V. Quantitative assessment of IgA levels in the unstimulated whole saliva of caries-free and caries-active children. *J Indian Soc Pedodont Prev Dent* 2008;26(4):158-61.
 49. Bagherian A, Jafarzadeh A, Rezaeian M, Ahmadi S, Rezaity MT. Comparison of the salivary immunoglobulin concentration levels between children with early childhood caries and caries-free children. *Iran J Immunol* 2008; 5(4): 217-21.
 50. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábíán G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci* 2012;13(4):4295-320.

51. Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Matsukubo T, Takaesu Y. Statherin and histatin 1 reduce parotid saliva-promoted *Streptococcus mutans* strain MT8148 adhesion to hydroxyapatite surfaces. *Caries Res* 2006;40(5):403-11.
52. Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JR, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, Amado FM. The role of salivary peptides in dental caries. *Biomed Chromatogr* 2005;19(3):214-22.
53. Garcia Triana B, Delfin Soto O, Lavandero Espina AM, Saldana Bernabeu A. Salivary proteins: structure, function and mechanisms of action. *Rev Haban Cienc Méd* 2012;11:450-6.
54. Jurczak A, Kościelniak D, Papież M, Vyhouskaya P, Krzyściak W. A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. *Biol Res* 2015;48:61.
55. Ao S, Sun X, Shi X, Huang X, Chen F, Zheng S. Longitudinal investigation of salivary proteomic profiles in the development of early childhood caries. *J Dent* 2017;61:21-7.
56. -da Silva JC, Muniz FWMG, Oballe HJR, Andrades M, Rösing CK, Cavagni J. The effect of periodontal therapy on oxidative stress biomarkers: A systematic review. *J Clin Periodontol* 2018;45(10):1222-7.
57. 58-Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44.
58. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, Podar M, Leys EJ. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J* 2012;6(6):1176-85.
59. Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011;38:85-105.
60. Pietiäinen M, Liljestränd JM, Kopra E, Pussinen PJ. Mediators between oral dysbiosis and cardiovascular diseases. *Eur J Oral Sci.* 2018;126 Suppl 1:26-36.
61. Gheren LW, Cortelli JR, Rodrigues E, Holzhausen M, Saad WA. Periodontal therapy reduces arginase activity in saliva of patients with chronic periodontitis. *Clin Oral Investig* 2008;12(1):67-72.
62. Nisha KJ, Suresh s, Anilkumar A, Padmanabhan S. MIP-1 α and MCP-1 as salivary biomarkers in periodontal disease. *Saudi Dent J* 2018;30(4):292-8.
63. Gomes AM, Douglas-de-Oliveira DW, Oliveira Costa F. Could the biomarker levels in saliva help distinguish between healthy implants and implants with peri-implant disease? A systematic review. *Arch Oral Biol* 2018;96:216-22.
64. Holmström SB, Lira-Junior R, Zwicker S, Majster M, Gustafsson A, Åkerman S, et al. MMP-12 and S100s in saliva reflect different aspects of periodontal inflammation. *Cytokine* 2019;113:155-61.
65. Äyräväinen L, Heikkinen AM, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Moilanen E, Hämäläinen M, Tervahartiala T, Meurman JH, Leirisalo-Repo M, Sorsa T. Anti-rheumatic medication and salivary MMP-8, a biomarker for periodontal disease. *Oral Dis* 2018;24(8):1562-71.
66. Morelato RA, López de Blanc SA. Oral cancer mortality in the province of Cordoba, Argentine Republic in the period 1975-2000. A comparative study with other populations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(3):E230-5.
67. Zheng J, Sun L, Yuan W, Xu J, Yu X, Wang F, et al. Clinical value of Naa10p and CEA levels in saliva and serum for diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2018;47(9):830-5.
68. Amiri Dash Atan N, Koushki M, Rezaei Tavirani M, Ahmadi NA. Protein-Protein Interaction Network Analysis of Salivary Proteomic Data in Oral Cancer Cases. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(6):1639-45.
69. Chan JYK, Zhen G, Agrawal N. The role of tumor DNA as a diagnostic tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2018. pii: S1044-579X(17)30253-5.
70. Shan J, Sun Z, Yang J, Xu J, Shi W, Wu Y, et al. Discovery and preclinical validation of proteomic biomarkers in saliva for early detection of oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis* 2018 doi: 10.1111/odi.1297. Epub ahead of print.
71. Lohavanichbutr P, Zhang Y, Wang P, Gu H, Nagana Gowda GA, Djukovic D, et al. Salivary metabolite profiling distinguishes patients with oral cavity squamous cell carcinoma from normal controls. *PLoS One* 2018;13(9):e0204249.
72. Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Tang CH, Huang SH, Tsai MH, et al. Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages. *Clin Chim Acta* 2011;412(15-16):1357-65.
73. Al Kawas S, Rahim ZH, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch Oral Biol* 2012;57:1-9.
74. -Bustamante G, Ma B, Yakovlev G, Yershova K, Le C, Jensen J, et al. Presence of the Carcinogen N'-Nitrosornicotine in Saliva of E-cigarette Users. *Chem Res Toxicol* 2018;31(8):731-8.

75. Humberto JSM, Pavanin JV, Rocha MJAD, Motta ACF. Cytokines, cortisol, and nitric oxide as salivary biomarkers in oral lichen planus: a systematic review. *Braz Oral Res* 2018;32:e82.
76. Grimaldi M, Palisi A, Rossi G, Stillitano I, Faiella F, Montoro P, et al. Saliva of patients affected by salivary gland tumour: An NMR metabolomics analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2018;160:436-42.
77. Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K, Sugano A, Nakamura M, Kaneko M, et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Sci Rep* 2016;6:31520.
78. Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta* 2014 1;427:79-85.
79. Hussein AA, Forouzanfar T, Bloemena E, de Visscher J, Brakenhoff RH, Leemans CR, et al. A review of the most promising biomarkers for early diagnosis and prognosis prediction of tongue squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2018;119(6):724-36.
80. Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B. Histatins: salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications. *FEBS J* 2014;281(3):657-72.
81. Meesala D, Penmetsa GS, Dwarakanath CD, Manyam R. Effect of Initial Periodontal Therapy on Salivary Trefoil Factor (TFF3) in otherwise Healthy Patients with Gingivitis and Chronic Periodontitis. *Contemp Clin Dent* 2018;9(Suppl 1):S11-S16.
82. Bretz WA, Rosa OP. Emerging technologies for the prevention of dental caries. Are current methods of prevention sufficient for the high risk patient? *Int Dent J* 2011;61 Suppl 1:29-33.
83. Gudipaneni RK, Kumar RV, GJ, Peddengatagari S, Duddu Y. Short term comparative evaluation of antimicrobial efficacy of tooth paste containing lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase in children with severe early childhood caries: a clinical study. *J Clin Diagn Res* 2014;8(4):ZC18-20.

Corresponding to /Correspondencia a:

Dr. Silvina Ruth Barembaum

Cátedra B de Introducción a la Física y Química

Biológicas. Departamento de Biología Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre sn.

Pabellón Argentina, Ciudad Universitaria. Córdoba. Argentina.

E-mail/Correo electrónico: silvina.barembaum@unc.edu.ar