

SALIVA-LA NUEVA PRUEBA DIAGNOSTICA Y DE DISCERNIMIENTO PARA ENFERMEDADES



Francisco L. Bermúdez, DMD, PhD
Profesor Ciencias Quirúrgicas
Escuela de Medicina Dental
Universidad de Puerto Rico
Rio Piedras, PR

Saliva como fluido diagnóstico

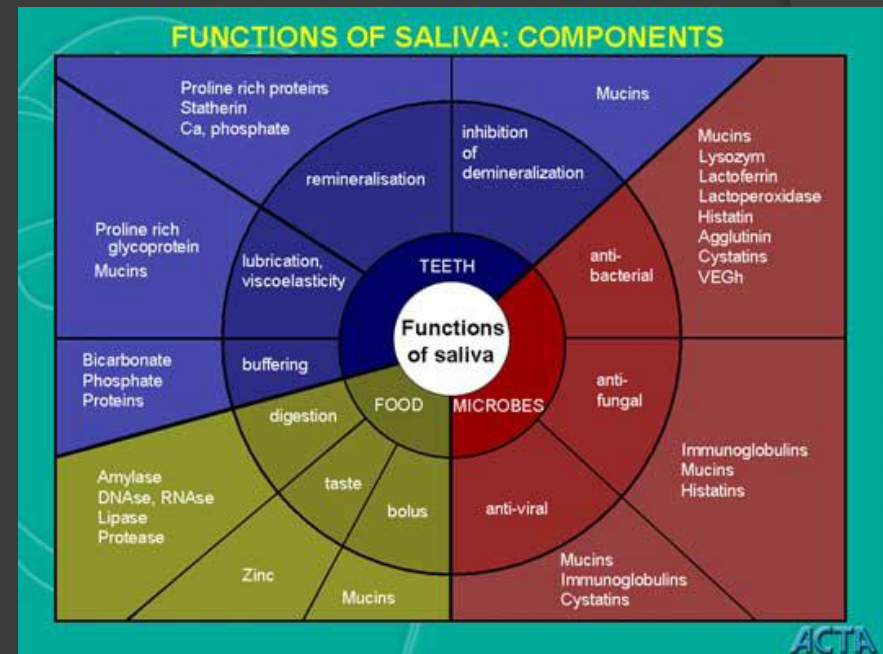


Objetivos

- Repaso de la función salivar
- Trasfondo histórico del estudio de la saliva
- Tecnología para el diagnóstico salivar
- Identificación de enfermedades a través de la saliva
- Inclusión de pruebas diagnósticas en la práctica dental
- Rol del dentista como miembro del equipo médico

Función de las secreciones salivares

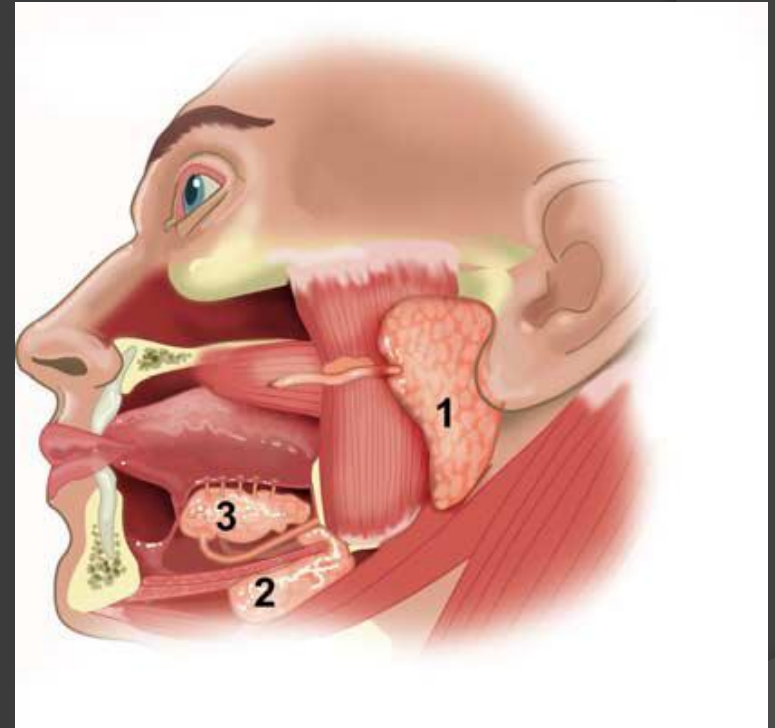
- Físico-mecánica: lavado de la cavidad oral
- Recubrimiento de tejidos: hidratación y formación de barrera de permeabilidad
- Modulación de la flora oral
- Regulación equilibrio de Ca/PO_4
- Anti-acido y neutralización de materiales dañinos
- Digestión: formación del bolo de comida y deglución



Nieuw Amerogen, et al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1098: 1-6 (2007)

Glándulas salivares

- ◉ **Glándulas salivares mayores (en pares)**
 - Parótida- saliva serosa, rica en amilasa, ducto de Stensen en cachete
 - Submandibular-saliva mixta serosa y mucosa, rica en mucinas, ducto de Wharton piso de boca
 - Sublingual- saliva mucosa, rica en mucinas, ductos en piso de boca
- ◉ **Glándulas salivares menores**
 - En múltiples áreas bajo la mucosa oral, saliva mucosa, produce el porcentaje mayor de proteínas en saliva



Nieuw Amerogen, et al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1098: 1-6 (2007)

Unidad secretoria salivar

○ Unidad salivar

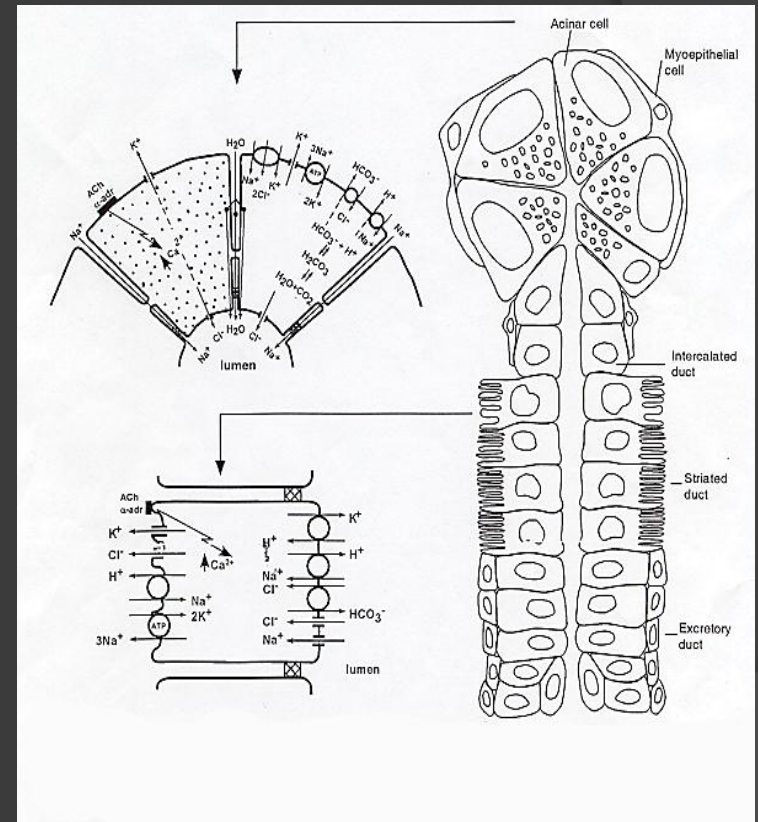
- Acino
- Células mioepiteliales
- Ducto intercalado
- Ducto estriado
- Ducto excretorio

○ Acino-produce saliva

- Seroso- parótida
- Mucoso-SLG, glándulas menores
- Mixto-SMG

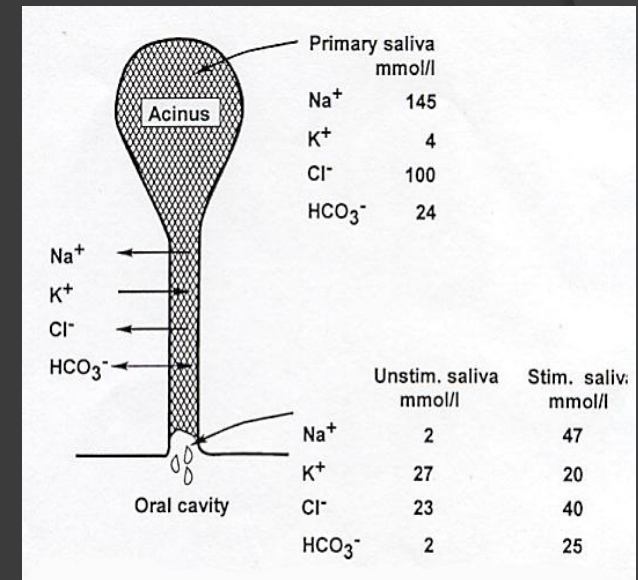
○ Células ductales-modifican la saliva

- Intercalado-cuboidal, secreta HCO_3^- , absorbe Cl^-
- Estriado-cuboidal, dobleces en membrana basal, absorbe Na^+ , secreta K^+ , hipotonicidad
- Excretorio-no modificaciones



Producción de saliva

- **Secreción primaria**
 - Producida por los acinos
 - Composición y osmolalidad similar al plasma
- **Secreción ductal**
 - Activamente se secretan y se absorben iones para producir saliva hipotónica
 - Depende del flujo salivar
 - **No estimulado-baja [HCO₃]**
 - **Estimulado-alta [HCO₃]**
 - pH 6.8-7.3



Flujo salivar

- Volumen promedio de saliva en 24 h es 1-1.5 litros
- Flujo salivar basal(no estimulado)
 - 0.2 ml/min
 - **SMG 69%**
 - **Parótida 26%**
 - **SLG 5%**
- Flujo salivar estimulado
 - 1.0-1.7 ml/min
 - **Parótida 69%**
 - **SMG 26%**
 - **SLG 5%**
- Aunque la SLG y las menores producen un 10% de la saliva, producen la mayoría de las proteínas, especialmente mucosas, crítico para la protección de los tejidos orales

Condiciones asociadas con hiposalivación

- **Medicamentos**
 - Antidepresivos, diuréticos, antihipertensivos, antieméticos, narcóticos, polifarmacia
- **Tratamiento de radiación a cabeza y cuello**
- **Enfermedades autoinmunes**
 - Síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, sarcoidosis
- **Deficiencias inmunes severas (SIDA)**
- **Menopausia**
- **Disturbios de alimentación**
 - bulimia, anorexia, malnutrición, deshidratación
- **Diabetes (tipo I no controlada)**
- **Depresión**
- **Calculo salivar e infecciones**

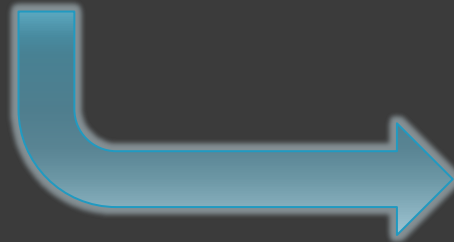
Trasfondo histórico

- ◉ Saliva se ha considerado como un indicador de bienestar por mas de 2000 años.
 - La medicina china tradicional creía que el espesor, olor y el sabor de la saliva podían reflejar síntomas de condiciones sistémicas.
- ◉ En las culturas occidentales se ha ignorado la saliva por la connotación negativa que esta representa.



Trasfondo histórico

- ◉ Culturas en África ven la saliva con significado espiritual.
- ◉ En otras, la saliva o el acto de escupir se utiliza para espantar el mal y dar buena suerte (en bodas y bautizos).



Trasfondo histórico

- Para finales del siglo XIX se empezó a analizar las propiedades de la saliva y su composición.
 - e.g. Actividad digestiva de amilasa
- Durante el siglo XX se observó que ciertos componentes de la saliva estaban asociados con ciertas condiciones.
 - Niveles de tiocianato podían diferenciar entre fumadores y no fumadores (Maliszewski and Bass, 1955).
 - Niveles de nitratos en la saliva comparaban con los niveles en la sangre, los nitratos eran convertidos por bacterias orales a nitritos y estos a su vez a nitroaminas en el estómago las cuales estaban asociadas con carcinoma del tracto digestivo. Altos niveles de nitratos en la saliva podían estar relacionados a esta condición (Tannenbaum S., *et al.*, 1974).

Trasfondo histórico

- ◉ Los primeros esfuerzos de correlacionar la saliva con condiciones fisiológicas se concentraron en evaluar los componentes inorgánicos de esta.
 - Toxicidad de digitalis se podía monitorear por las concentraciones de Ca y K en saliva (Swanson M., *et al.*, 1973).
 - Aparte de esto, los componentes inorgánicos ofrecieron poco valor diagnóstico.
- ◉ Los componentes orgánicos de la saliva empezaron a despertar el interés de los investigadores cuando realizaron que algunas sustancias se podían detectar fácilmente en la saliva y hasta en niveles mas altos que en sangre.
 - Moléculas liposolubles
 - Hormonas
 - Drogas
 - Infección de microorganismos (virus de herpes, VIH)

Trasfondo histórico

⦿ Avances tecnológicos

- Reacción en cadena de polimerasa
- Micromatrices ADN y proteínas (microarrays)
- Espectrometría de masa
- Finalización del genoma humano

⦿ Estos nos han permitido:

- Mejorar la escala de detección.
- Aumentar la producción analizando múltiples componentes a la vez.
- Crear la base de datos para poder comparar diferencias entre estados normales y anormales y así poder establecer los criterios de diagnóstico.

Pruebas diagnósticas comunes

- ⊙ **Laboratorios de sangre**
 - Química-glucosa, electrolitos
 - Hematología: glóbulos blancos, rojos, plaquetas
 - Nivel de drogas-metabolitos
 - Nivel de hormonas
- ⊙ **Laboratorios de orina**
 - Proteínas, glucosa, metabolitos de drogas
- ⊙ **Líquido cefalorraquídeo**
 - Glucosa, proteínas, bacterias, células cancerosas
- ⊙ **Prueba fecal**
 - Sangre oculta, pruebas microbiológicas (parásitos), toxinas de *C. difficile*

Saliva como fluido diagnóstico

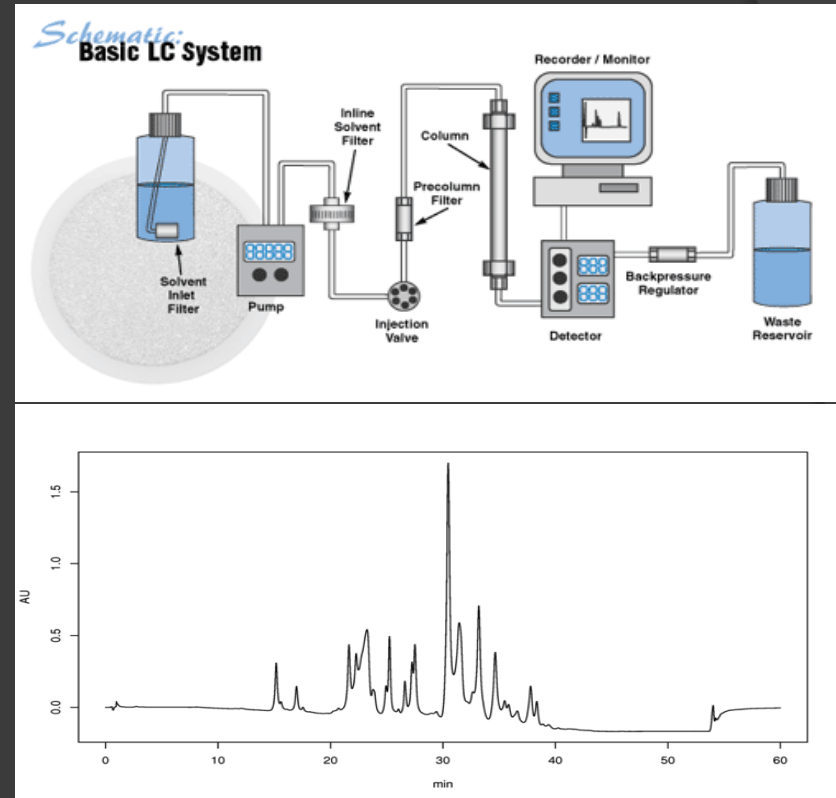
● Ventajas

- Fácil de recolectar, no invasivo, menos ansiedad
 - **e.g. niños y envejecientes**
- No requiere personal adiestrado
- Fácil manejo y almacenaje (no se coagula)
- Menos riesgos para el personal de salud
- No invade privacidad
 - **Se puede observar mientras se colecta la muestra**

Tecnología de análisis de saliva

● Cromatografía

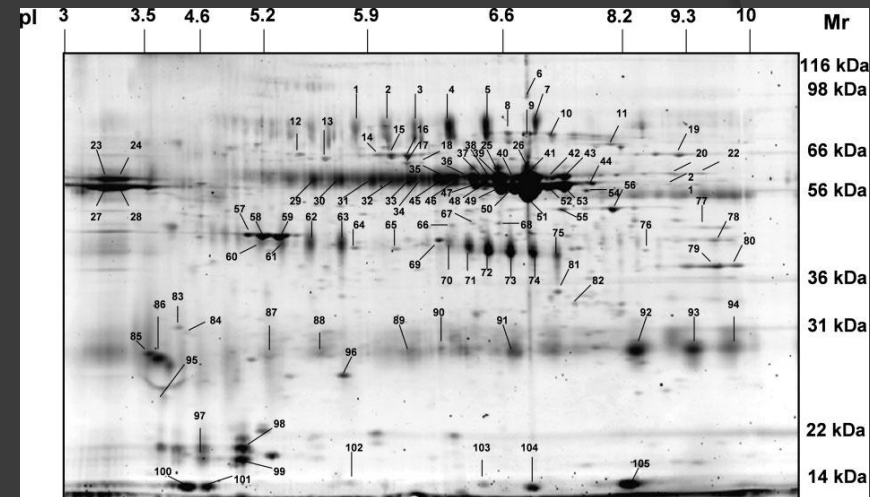
- Técnica para separar los componentes de una mezcla de proteínas.
- Cromatografía líquida (CL) con separación en base a carga eléctrica o tamaño.
- Colector recoge las fracciones separadas por la columna de cromatografía manteniendo separadas las proteínas.
- Las muestras pueden pasar directamente a un espectrómetro de masa para detección e identificación.



Tecnología de análisis de saliva

Electroforesis de gelatina bidimensional

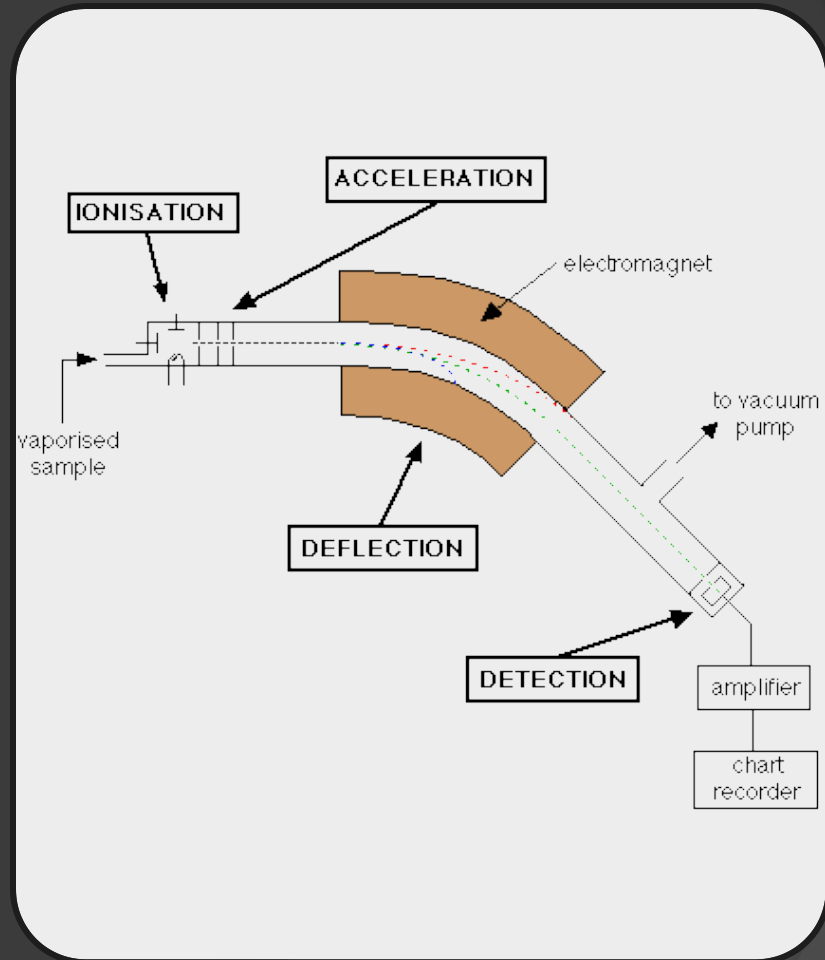
- Utiliza gelatina de acrilamida para separar proteínas primero en una dirección luego se rota el gel 90° y se corre en otra dirección
- Primera separación puede ser usando pI o masa nativa de la proteína.
- Segunda dirección se separa en base a la masa de la proteína desnaturalizada (SDS-PAGE).
- Se comparan las gelatinas entre dos condiciones diferentes para ver diferencias entre las proteínas presentes.
- La saliva aventaja a la sangre en esta técnica por tener un contenido proteínico menos complejo.



Tecnología de análisis de saliva

● Espectrometría de masa

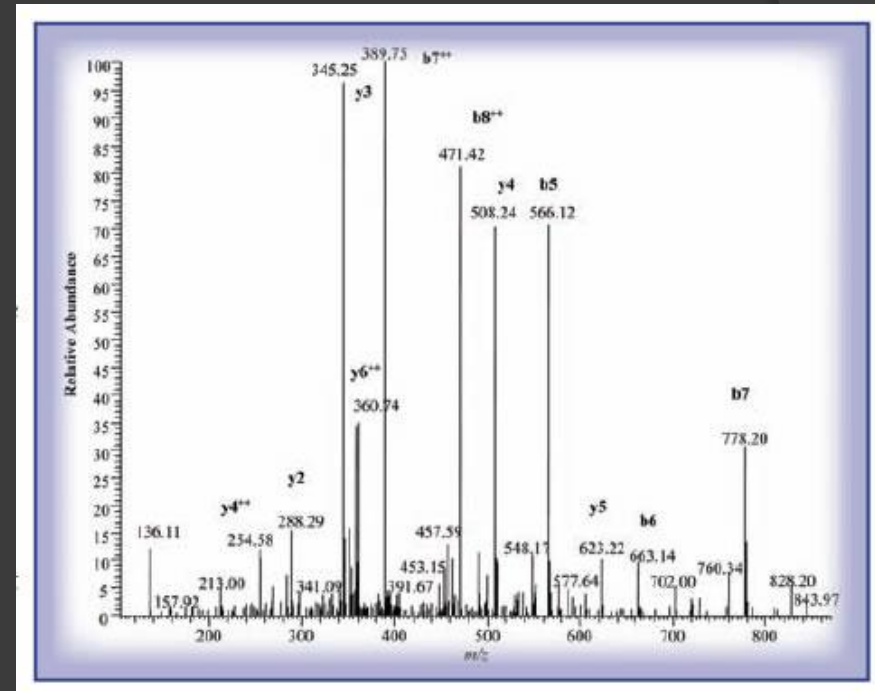
- Técnica analítica para determinar razón de masa-carga de una partícula cargada (pos.)
- Ayuda a determinar la masa de una partícula, composición de una muestra, estructura química de una molécula.
- Métodos de ionización varían si la muestra es líquida (de la CL) o sólida (gelatina de electroforesis)



Tecnología de análisis de saliva

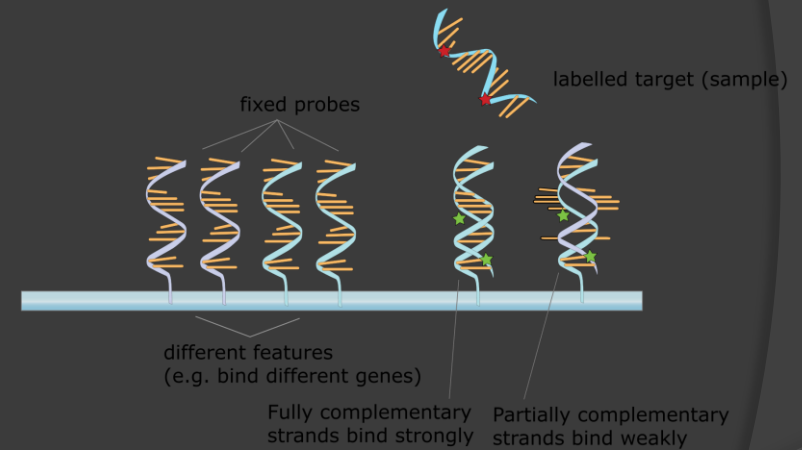
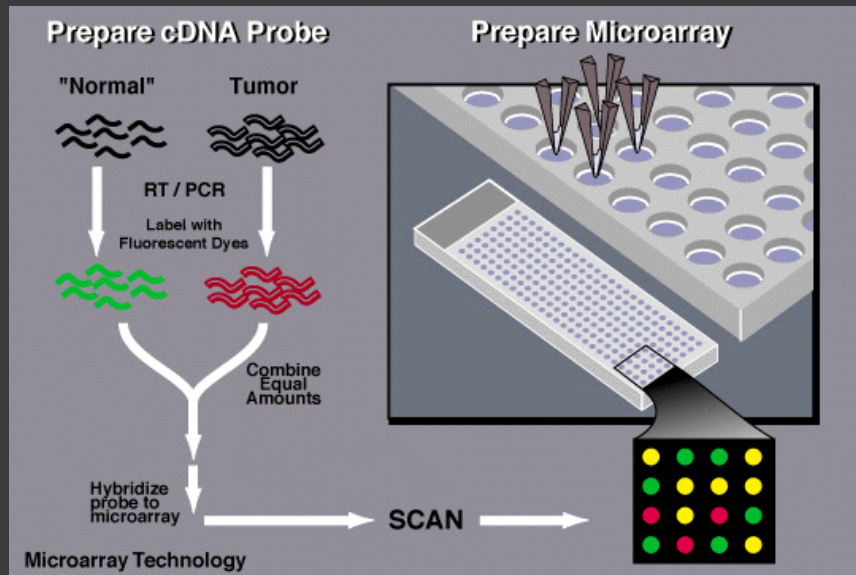
○ Espectrometría de masa

- Resultado-espectro de masa expresado en masa/carga (m/z).
- Comparando el espectro de una muestra con una base de datos de partículas conocidas puedes inferir que partícula esta en la muestra (las proteínas se digieren y se reconocen por el espectro de masa característico de los péptidos generados).
- Se puede utilizar para secuenciar el péptido si el espectro de masa no identifica la partícula.
- Esto esta atado a que conociendo la secuencia del genoma humano, sabemos que secuencia de amino ácidos debe tener una proteína.



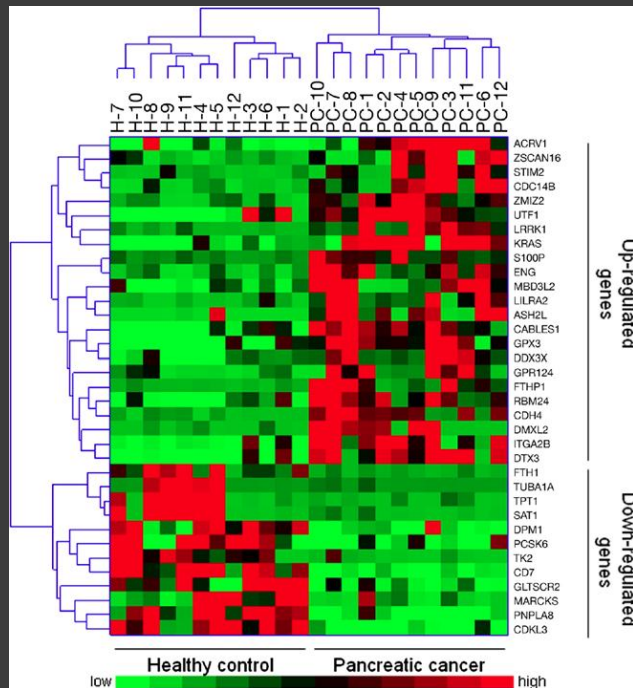
Tecnología de análisis de saliva

○ Micromatrices



Tecnología de análisis de saliva

● Micromatrices

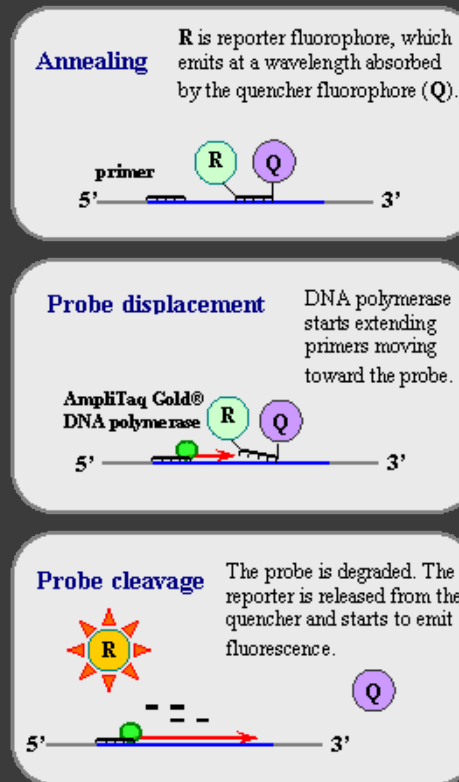


Tecnología de análisis de saliva

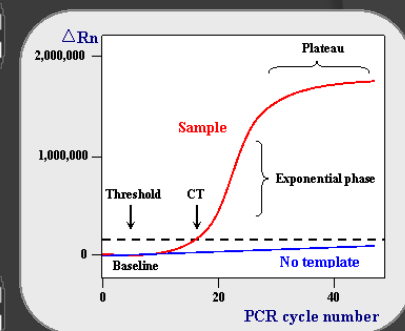
○ Reacción en cadena de polimerasa

- En tiempo real conocido como RT PCR o qPCR
 - Se utiliza para cuantificar expresión de un gene
- Transcriptasa reversa PCR (RT/PCR)
 - Genera ADNc de los ARNm para hibridación en las micromatrices

TaqMan® Applied Biosystems



Model of real time quantitative PCR plot



Proteoma y transcriptoma salivar

◉ Proteoma

- Todas las proteínas expresadas por un genoma, célula, tejido u organismo.
- Todas las proteínas que encontramos en la saliva
- Puede ser por glándula individual o recolección de la saliva completa

◉ Transcriptoma

- Conjunto de todas las moléculas de ARN, incluyendo ARNm, ARNr, ARNt y ARN no codificante producidos por una célula o población de células.
- Todos los ARN presentes en saliva

Proteoma salivar

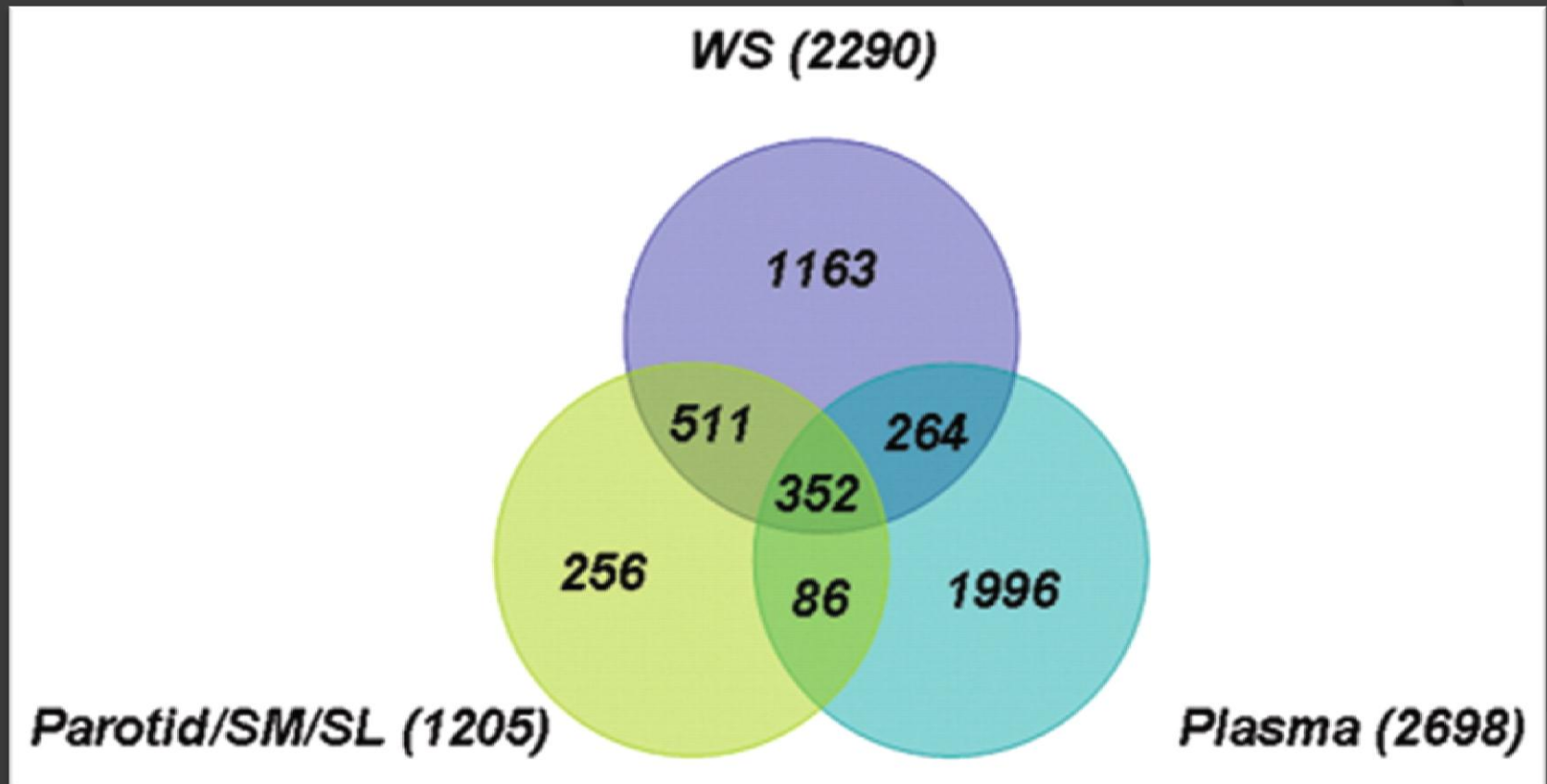


Figure 1. Venn diagram showing the overlapping protein identifications among plasma, whole saliva, and parotid/SM/SL.

Loo J et al. J DENT RES 2010;89:1016-1023

Proteoma salivar

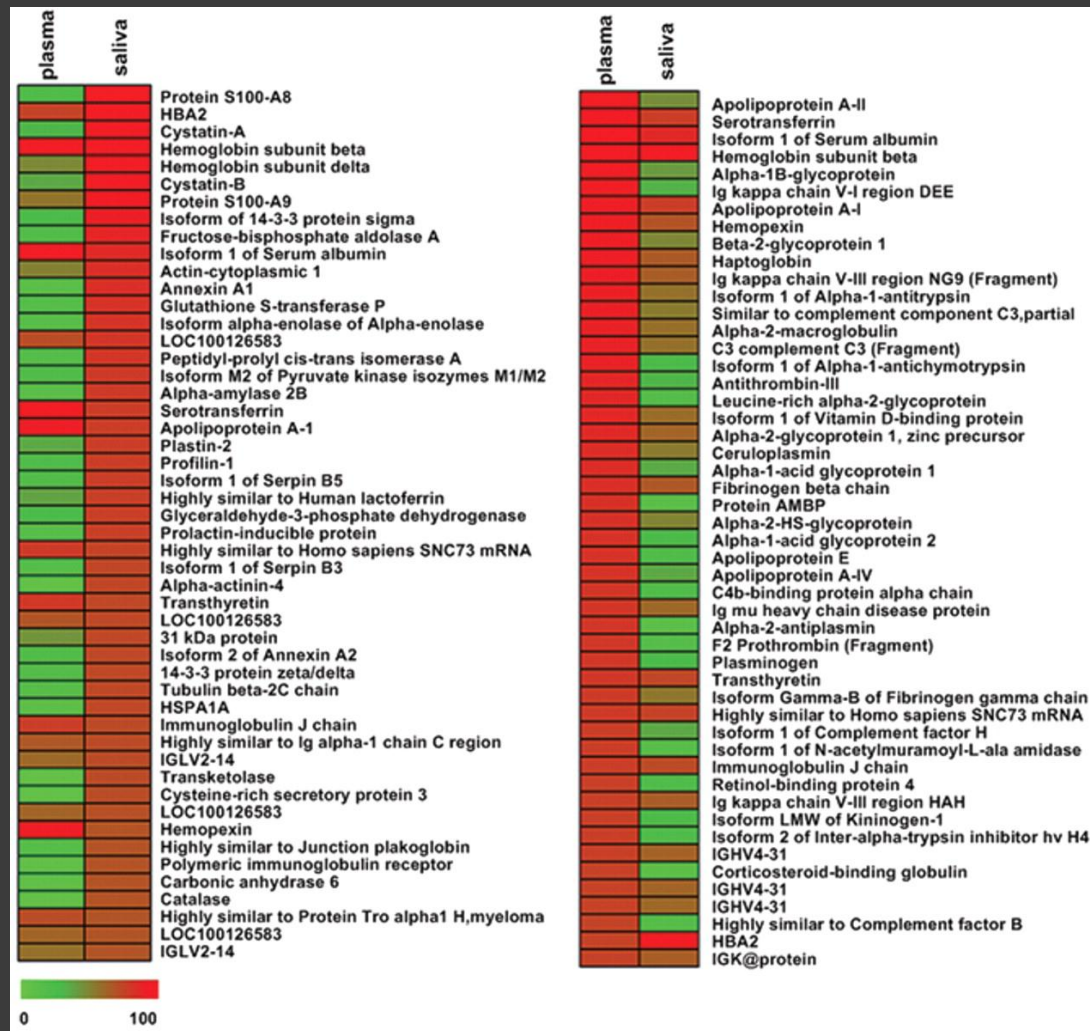


Figure 2. Array views of the human salivary and plasma proteomes.

Transcriptoma salivar

● Transcriptoma

- RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. Li Y., *et al.* J Dent Res. 2004a
- Comprobaron la presencia de miles de ARNm en saliva de pacientes.
- Aunque hay miles de fragmentos de ARN, representan sobre 850 genes individuales.
- 185 ARNm fueron identificados presentes en común en 10 pacientes saludables.

Depositario de data del proteoma y transcriptoma salivar

Salivaomics Knowledge Base
Saliva Ontology

SDxMart

Welcome to SKB

Salivaomics Knowledge Base (SKB) is the only web-based data management system dedicated to the salivary omics studies and contains valuable information to explore the biology, diagnostic potentials, pharmacoproteomics and pharmacogenomics of human saliva.

A Roadmap for Salivaomics Tools
This website will showcase our salivaomics tools including genomic, transcriptomic, metabolomic and proteomic profiling of human saliva that can identify disease specific human salivary biomarkers such as mRNAs, microRNAs, proteins and metabolites along with the most cutting-edge biosensor technology enabled saliva-based point-of-care handheld equipment.

Proteome

Transcriptome

microRNA

Metabolome

Microbe

Saliva Diagnostic Atlas

POCTRN

Point of Care Technology

[Data Sharing Requests](#)

The Wond Lab At the UCLA School of Dentistry, Dental Research Institute

SPKB Salivary Proteome Knowledge Base
Supported by NIDCR

[Home](#) [DB Schemas](#) [Participating Groups](#) [Search Proteins](#) [Wiki](#) [Tools](#) [Log Off](#)

Biomarcadores de proteoma y transcriptoma salivar

○ Biomarcador

- Sustancia que se utiliza como indicador de un estado biológico
 - **Procesos normales**
 - **Procesos patológicos**
 - **Respuesta a terapia**

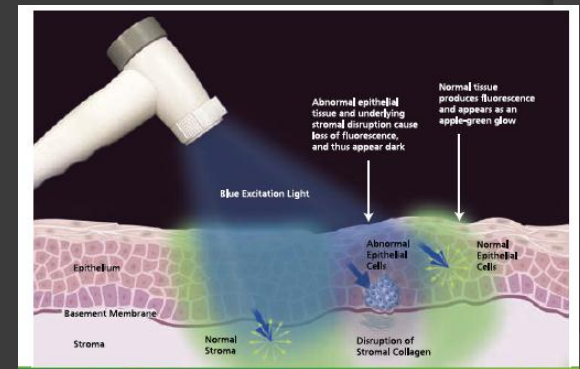
○ Identificación de biomarcadores

- Se utiliza toda la tecnología presentada para caracterizar el proteoma y transcriptoma salivar
- Comparar el proteoma y/o transcriptoma de individuos normales y no normales
- Proteínas y/o ARN que se expresen diferencialmente pudieran representar biomarcadores de la condición

Epidemiología de cáncer oral

- Alrededor de 35000 casos nuevos por año en EE.UU, con aproximadamente cerca de 8000 muertes al año
- Alrededor de 25% de los casos anuales mueren de la condición
- Cáncer oral es tan común como la leucemia y reclama mas vidas que el melanoma o cáncer cervical
- 95% de los casos son en pacientes mayores de 40 años aunque la incidencia en jóvenes adultos esta aumentando
- La sobrevivencia de cáncer oral a 5 años se ha mantenido alrededor del 60% principalmente porque el diagnóstico continua siendo en etapas tardías.

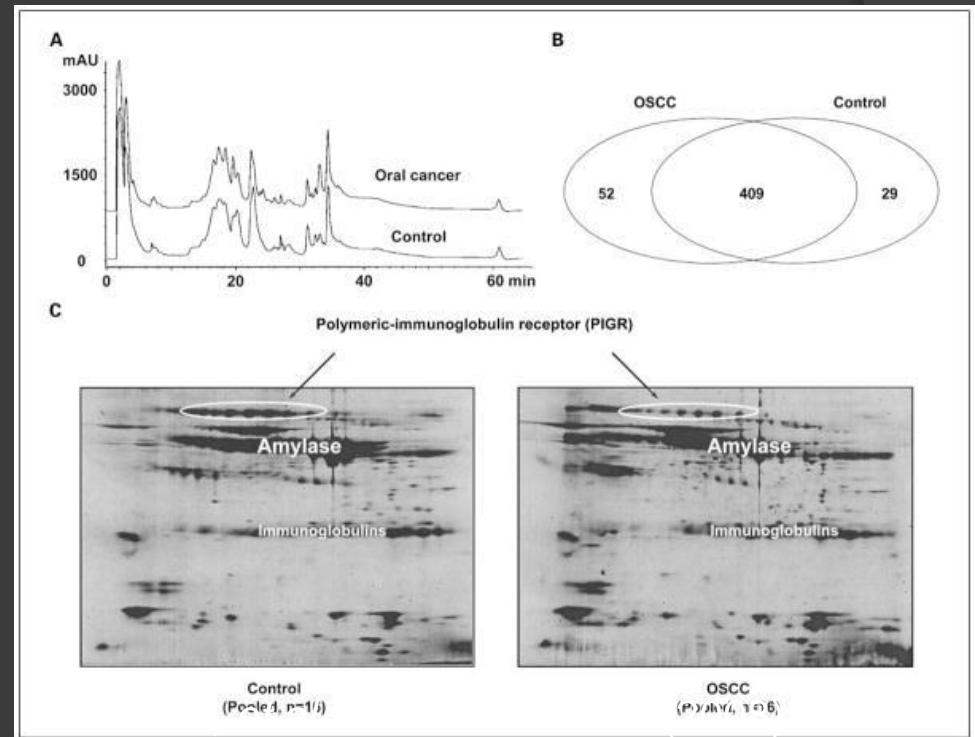
Tecnología de detección temprana de cáncer oral



Biomarcadores salivares de cáncer oral

○ Proteoma

- Saliva no estimulada de pacientes controles y con carcinoma escamoso oral analizada por MS
- 409 proteínas en común.
- 52 proteínas expresadas en saliva de carcinoma oral.
- 29 proteínas expresadas en saliva de controles.
- Algunas proteínas comunes estaban sobrepresadas o subexpresadas.



Hu S., et al. Clin Cancer Res (2008)

Biomarcadores salivares de cáncer oral

○ Proteoma

- 5 proteínas sobrepresadas en saliva de pacientes con carcinoma oral fueron validadas como posibles biomarcadores de cáncer oral en conjunto presentaban sensibilidad de 90% y especificidad de 83% (AUC-0.93)

| Protein | Fold change (mean level) | P | Validation method |
|---|--------------------------|-----------|-------------------|
| M2BP | 1.99 | 0.006 | ELISA |
| Profilin | 1.93 | 0.0003 | Immunoblotting |
| CD59 | 2.45 | 0.00001 | Immunoblotting |
| MRP14 | 2.15 | 0.000002 | Immunoblotting |
| Catalase | 2.07 | 0.0000005 | Immunoblotting |
| Histone H1 | 1.10 | 0.92 | ELISA |
| S100A12 | 1.01 | 0.82 | ELISA |
| Ras-related protein Rab-7 | 1.12 | 0.61 | Immunoblotting |
| Moesin | 1.19 | 0.32 | Immunoblotting |
| Involucrin | 1.67 | 0.11 | ELISA |
| S100P | 1.24 | 0.05 | ELISA |
| Hematopoietic lineage cell-specific protein | 1.43 | 0.002 | Immunoblotting |

Hu S., et al. Clin Cancer Res (2008)

Biomarcadores salivares de cáncer oral

○ Proteoma

- Otras proteínas identificadas en estudios de saliva como posibles biomarcadores de CCE.

- **Antígeno carcinoembriónico**
- **Defensin-1**
- **TNF- α**
- **IL-1, 6, 8**
- **CD-44**
- **Fibronectina**

- **Citoqueratina 19**
- **Antígeno de polipéptido de tejido**
- **Endotelin-1**
- **Cyfra21-1**
- **Antígeno de cáncer 125**

Biomarcadores salivares de cáncer oral

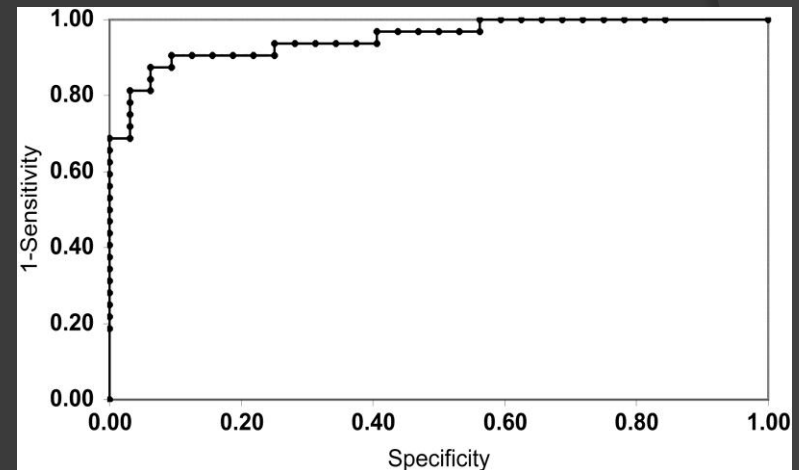
◉ Transcriptoma

- Saliva no estimulada obtenida de grupo control (n=32) y grupo de CCE oral (n=32)
- Usando micromatrices y validación por qPCR se identificaron 7 ARNm elevados en pacientes de CCE como posibles biomarcadores.
 - ◉ ***IL8, IL1B, DUSP1, H3F3A, OAZ1, S100P, SAT1***
 - ◉ ***IL8 es la mas elevada y mas sensitiva prueba individual (ROC 0.85)***

Biomarcadores salivares de cáncer oral

○ Transcriptoma

- Sensitividad y especificidad mejora cuando se combinan los biomarcadores
 - *IL8, IL1B, OAZ1, SAT1*
 - **Sensitividad 91%, especificidad 91%, ROC 0.95**

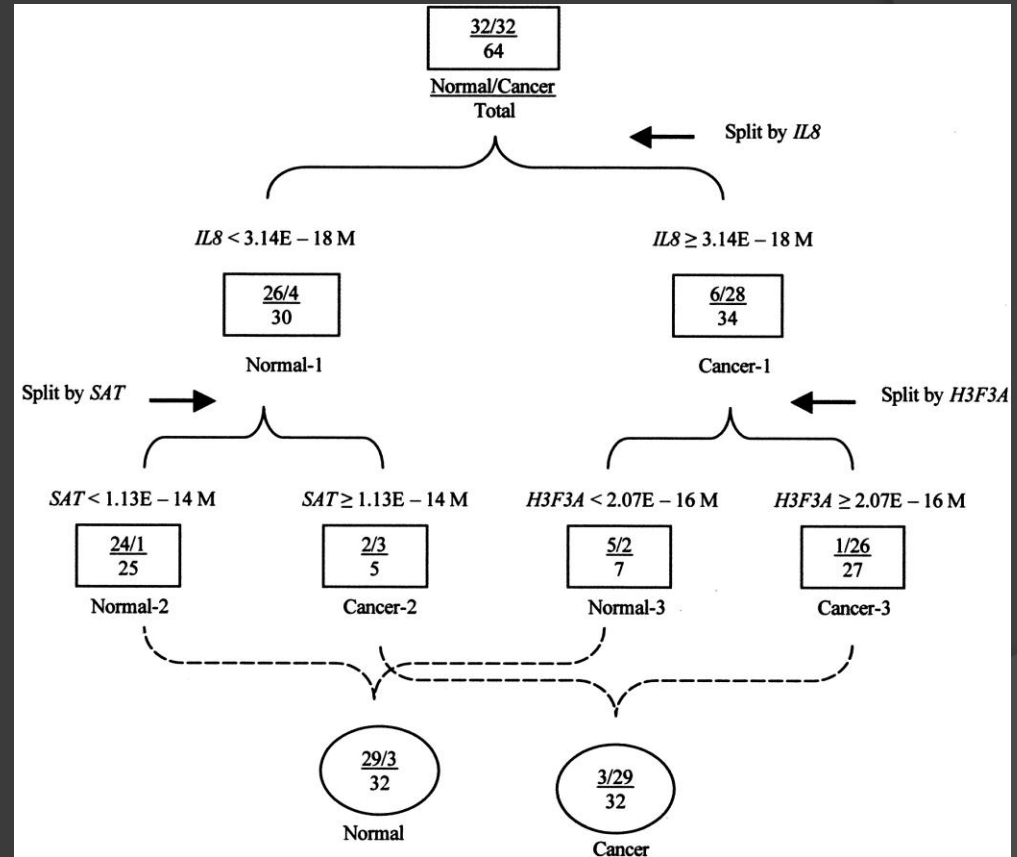


Li Y et al. Clin Cancer Res 2004;10:8442-8450

Biomarcadores salivares de cáncer oral

● Transcriptoma

- Utilizando un modelo de Árbol de Clasificación y Regresión (CART) se obtuvo sensibilidad y especificidad igual al modelo de combinación de biomarcadores (90.6% y 90.6%)



Biomarcadores salivares de cáncer oral

○ Transcriptoma

- Validación de biomarcadores en un cohorte de pacientes con y sin CCE oral en Serbia.
(Brinkmann O., et al., Oral Oncology 47, 2011)
 - **Biomarcadores de proteoma elevados en la saliva de pacientes con CCE oral.**
 - IL8, IL1B, M2BP
 - **Biomarcadores de transcriptoma elevados en la saliva de pacientes con CCE oral.**
 - *IL8, IL1B, SAT1, S100P*
 - **Combinación de IL1B, SAT1 y DUSP1 resultó en la sensibilidad y especificidad mas alta (89% y 78%, AUC 0.86).**
 - **Tendencia de los biomarcadores a ser mas sensitivos en los estados avanzados del cáncer (estadios III y IV).**

Biomarcadores salivares de cáncer oral

- ◉ **Limitaciones de biomarcadores de cáncer oral**
 - Condición es multifactorial por lo tanto probablemente no exista un biomarcador específico (complejidad del sistema dificulta el poder validar los biomarcadores).
 - Múltiples condiciones afectan la producción de la saliva y los tejidos orales por lo tanto confunden el sistema (e.g. distinguir si la elevación de IL8 es secundario a un proceso inflamatorio).
 - Los estudios hasta ahora se basan en grupos de pacientes con o sin la condición (llevar el análisis a condiciones premalignas o estadio I).

Biomarcadores salivares de enfermedad periodontal

◉ Método tradicional de diagnóstico

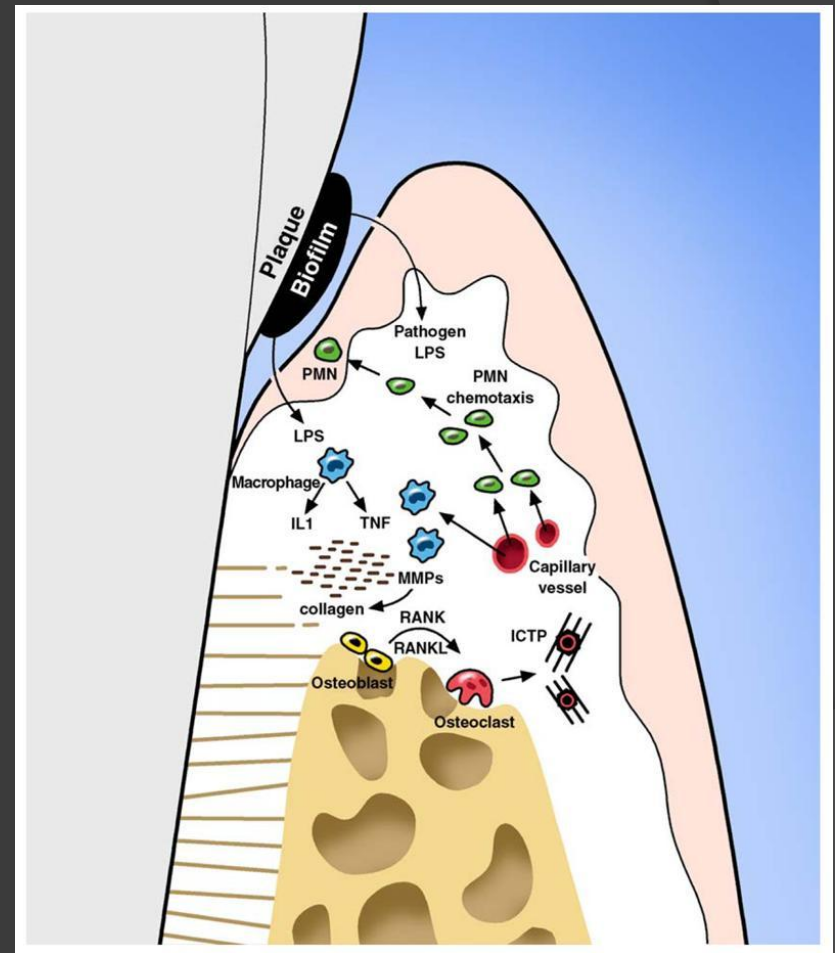
- Profundidad de bolsillo
- Sangrado al sondeo
- Nivel de adherencia clínico
- Índice de placa dental
- Índice gingival
- Radiografías

◉ Limitaciones del método tradicional

- Requiere personal entrenado
- Equipo especializado (radiográfico) costoso
- Parámetros de diagnóstico representan historial pasado de la enfermedad
- Daños significativos deben ocurrir antes que se pueda evaluar el nivel o severidad de la enfermedad

Biomarcadores salivares de enfermedad periodontal

- **Uso de biomarcadores para diagnóstico**
 - Análisis de fluido del crevículo gingival.
 - **Utiliza filtros de papel para recoger muestra por sitio individual**
 - **Es trabajoso**
 - **Costoso pues cada muestra se analiza independientemente**
 - **Hay que enviar muestras a laboratorio**
 - **Detecta mediadores inflamatorios, de destrucción de tejido conectivo y remodelación de hueso**



Biomarcadores salivares de enfermedad periodontal

○ Uso de biomarcadores para diagnóstico

- Uso de la saliva
 - Fácil y rápida colección
 - No invasivo
 - No requiere personal adiestrado
 - La información representa el estado general del paciente si esta activo y la severidad, aunque no refleja los lugares específicos de enfermedad.
- Objetivo con biomarcadores en saliva
 - Diagnosticar la enfermedad pudiendo distinguir las tres fases: inflamatoria, degradación de tejido conectivo, pérdida ósea
 - Poder predecir pacientes a riesgo
 - Monitorear efecto de tratamiento

Biomarcadores salivares de enfermedad periodontal

● Identificación de biomarcadores en proteoma salivar

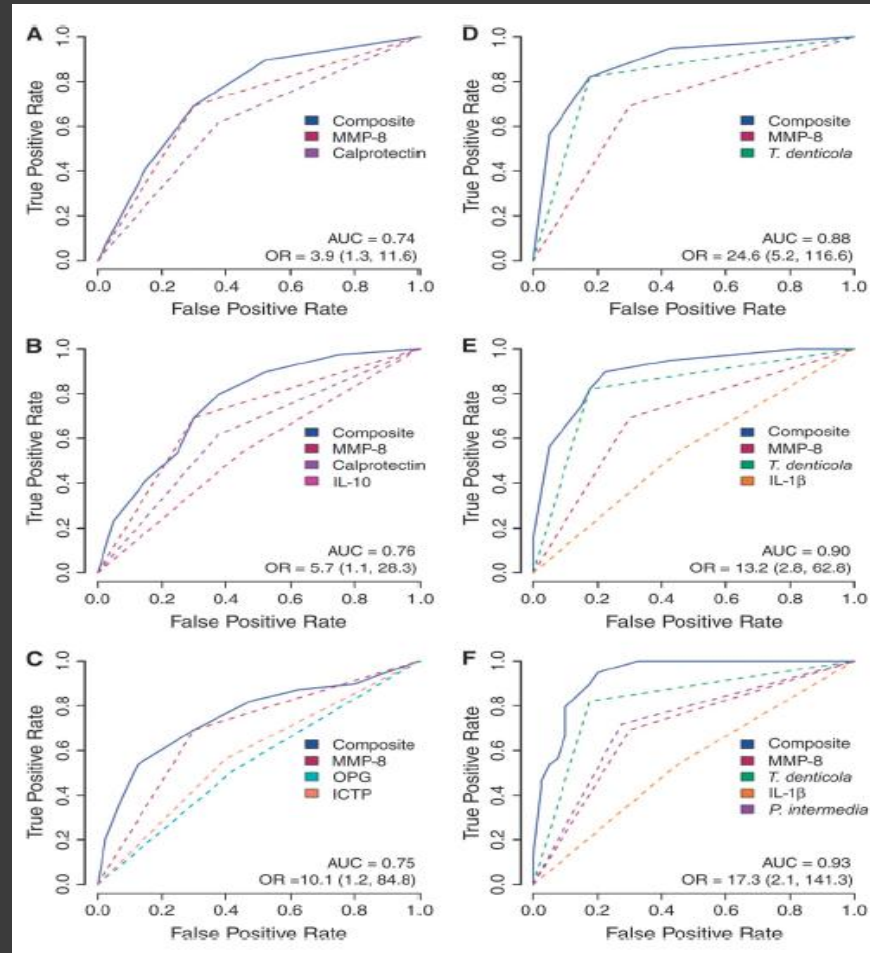
- Ramseier CA., et al., J Periodontol 2009
- Pacientes divididos en grupos: saludables, gingivitis, perio leve, perio moderada/severa.
- Colectaron saliva completa no estimulada y muestras de placa subgingival
- Analizaron biomarcadores del proteoma usando ELISA, radioinmuno ensayo, micromatrices de proteínas
- Midieron niveles de bacterias en placa subgingival con RT-qPCR

Biomarcadores salivares de enfermedad periodontal

Median Levels (ranges) and Diagnostic Ability of Salivary Biomarkers and Plaque Biofilm Pathogens

| Biomarker | Group A Healthy (median [range]) | Group B Gingivitis (median [range]) | Group C Mild Chronic Periodontitis (median [range]) | Group D Moderate to Severe Chronic Periodontitis (median [range]) | P Values Comparing A Through D | P Values Comparing A and B Versus C and D | AUC | Importance Score via Random Forest |
|--------------------------|--|---|--|---|--------------------------------------|---|------|---|
| MMP-8 (ng/ml) | 23.6 (2.5 to 322.5) | 54.1 (1 to 473.9) | 129.9 (8.5 to 978.9) | 203.8 (10.1 to 2,681.1) | <0.001 | <0.001 | 0.75 | 7.1 |
| OPG (pg/ml) | 2.3 (1.4 to 6.6) | 2.7 (1.2 to 6.2) | 1.9 (0.2 to 10.1) | 1.6 (0.5 to 11.8) | 0.056 | 0.007 | 0.62 | 6.3 |
| MMP-9 (ng/ml) | 106.4 (10 to 1,185.7) | 225.8 (4.9 to 1,732.2) | 301.6 (4.6 to 3,348.1) | 780.8 (10.4 to 9,778.2) | 0.002 | 0.001 | 0.72 | 5.1 |
| Calprotectin (ng/ml) | 3.0 (1.3 to 10) | 3.5 (0 to 24.6) | 4.3 (0 to 17.8) | 5.4 (1.7 to 97.6) | 0.082 | 0.023 | 0.68 | 4.7 |
| IL-1 β (pg/ml) | 158.6 (0 to 6,000) | 206.7 (0 to 3,856.8) | 247.5 (24.1 to 3,120) | 462.2 (15.7 to 6,000) | 0.157 | 0.059 | 0.72 | 3.7 |
| ICTP (ng/ml) | 0.9 (0 to 4) | 0.8 (0 to 4) | 0.6 (0 to 5.4) | 0.9 (0 to 13.9) | 0.195 | 0.185 | 0.58 | 3.2 |
| IL-6 (pg/ml) | 0.0 (0 to 1,915) | 22.1 (0 to 8,784.9) | 14.6 (0 to 5,259.7) | 88.7 (0 to 10,816.9) | 0.127 | 0.092 | 0.71 | 2.2 |
| IL-10 (pg/ml) | 881.4 (0 to 11,088.8) | 120.6 (0 to 45,488.9) | 1,153.1 (0 to 24,581.4) | 1,445.1 (0 to 30,633.1) | 0.618 | 0.329 | 0.68 | 1.9 |
| TNF- α (pg/ml) | 9.8 (0 to 1,788.3) | 0.0 (0 to 3,720.5) | 8.1 (0 to 4,370.2) | 0.0 (0 to 8,212.7) | 0.483 | 0.954 | 0.64 | 1.8 |
| IL-13 (pg/ml) | 14.3 (0 to 83,151.1) | 0.0 (0 to 92,423.8) | 0.0 (0 to 76,046) | 169.9 (0 to 75,445.2) | 0.780 | 0.783 | 0.64 | 1.5 |
| IL-4 (pg/ml) | 0.0 (0 to 5,315.1) | 0.0 (0 to 6,579.3) | 54.4 (0 to 14,588) | 69.5 (0 to 11,714.3) | 0.377 | 0.086 | 0.71 | 1.3 |
| IL-2 (pg/ml) | 0.0 (0 to 3,718.1) | 0.0 (0 to 6,000) | 8.0 (0 to 6,205.5) | 0.0 (0 to 14,400.1) | 0.421 | 0.178 | 0.69 | 1.2 |
| <i>T. denticola</i> (%) | 0.11 (0 to 0.54) | 0.10 (0 to 2.95) | 1.53 (0 to 5.25) | 2.34 (0.79 to 6.63) | <0.001 | <0.001 | 0.86 | 13.7 |
| <i>P. gingivalis</i> (%) | 0.05 (0 to 0.9) | 0.04 (0 to 0.66) | 0.53(0 to 2.36) | 1.00 (0.43 to 3.24) | <0.001 | <0.001 | 0.84 | 9.6 |
| <i>T. forsythia</i> (%) | 0.09 (0 to 0.88) | 0.07 (0 to 0.8) | 0.71 (0 to 3.16) | 1.26 (0.11 to 3.55) | <0.001 | <0.001 | 0.85 | 8.4 |
| <i>P. intermedia</i> (%) | 0.11 (0 to 1.17) | 0.20 (0 to 1.99) | 0.82 (0 to 3.77) | 1.85 (0 to 3.5) | <0.001 | <0.001 | 0.79 | 6.7 |
| <i>C. rectus</i> (%) | 0.00 (0 to 1.22) | 0.00 (0 to 1.18) | 0.66 (0 to 2.82) | 1.32 (0 to 3.34) | 0.001 | <0.001 | 0.74 | 4.7 |
| <i>F. nucleatum</i> (%) | 2.96 (0 to 8.27) | 2.33 (0 to 7.32) | 3.29 (0 to 10.74) | 3.30 (0 to 9.56) | 0.251 | 0.196 | 0.59 | 3.9 |
| <i>E. corrodens</i> (%) | 0.00 (0 to 0.96) | 0.00 (0 to 1.04) | 0.00 (0 to 1.32) | 0.00 (0 to 0.1) | 0.697 | 0.259 | 0.56 | 0.3 |

Biomarcadores salivares de enfermedad periodontal

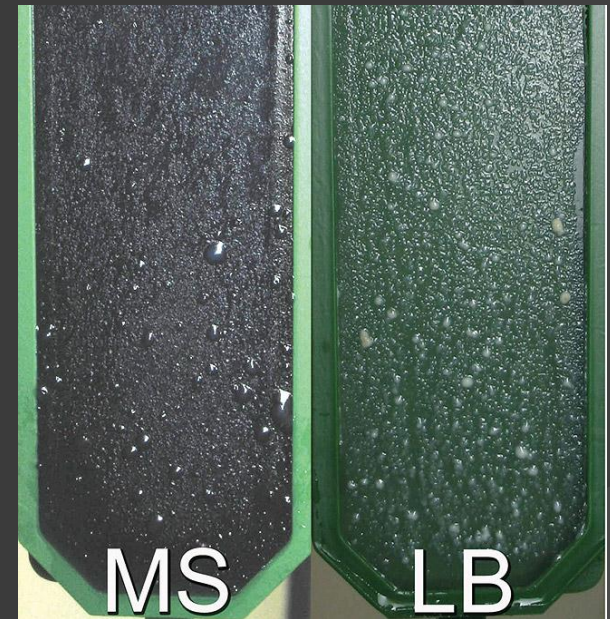


El rol de pruebas de saliva en manejo de caries por evaluación de riesgo

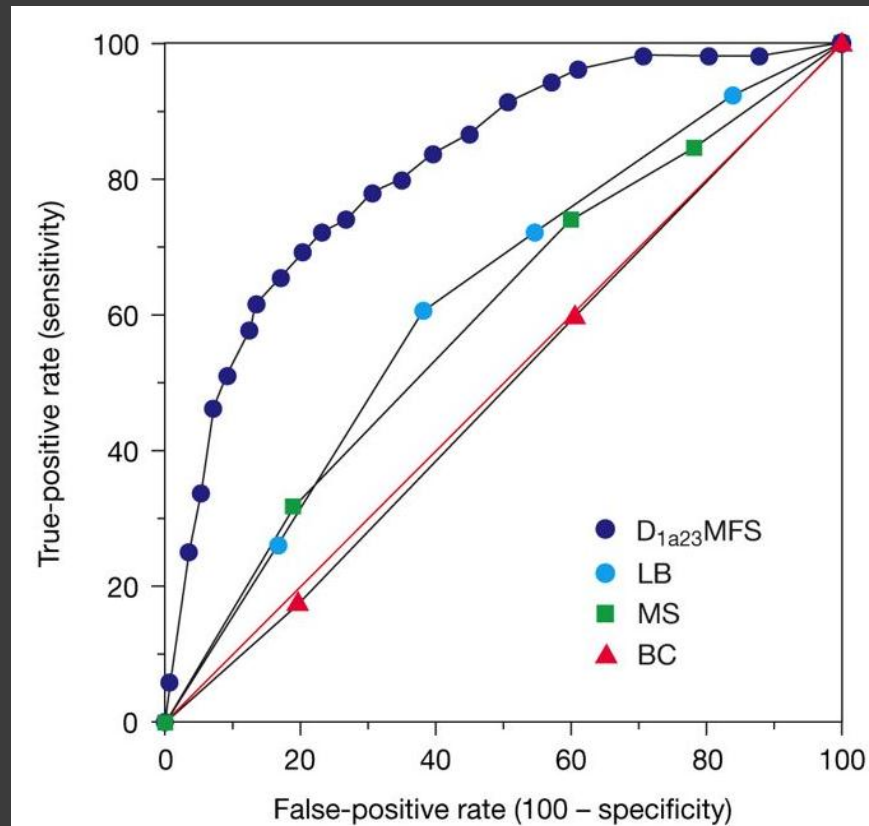
- Manejo de caries por evaluación de riesgo promueve que el manejo efectivo de las caries dentales debe estar basado en la identificación y el manejo de los factores que ponen a riesgo a cada paciente. Si estos factores no son eliminados, la enfermedad recurre.
- La inclusión de pruebas salivares en modelos de riesgos de caries multifactoriales, como CAMBRA, Cariogram, etc., aumentan significativamente el valor pronosticador de estos modelos.
- Por eso, en este momento, el uso de pruebas salivares puede ser recomendado como un componente de un abordaje comprensivo para el manejo de caries por evaluación de riesgo, en combinación con otros factores clínicos y sicosociales.

Factores de saliva tradicionalmente asociados con actividad de caries

- **Flujo salivar**
 - Significativo solamente como factor de riesgo de caries en xerostomía severa.
- **Capacidad amortiguadora (CRT-buffer, Dentobuff, Saliva-Check buffer)**
 - Llena Puy et al. (2000), Shi et al. (2003): no correlación con niveles de caries en niños.
 - Nishikawara et al. (2006). Correlación con caries interproximales en adultos.
- **Mutans y lactobacilos en saliva (Dentocult, CRT-bacteria, Saliva-Check)**
 - Fuerte asociación con caries
 - Umbral usual 10^5 CFU/ml
 - Tiempo de incubación: 48 hrs
 - Valores de sensibilidad y especificidad reportados en literatura son muy variables (desde 5% a 98%: Van Houte, 1993)



Mutans y lactobacilos salivares y capacidad amortiguadora no son buenos pronosticadores de futuras caries.



ROCs para caries presentes, mutans salivar, lactobacilo salivar y capacidad amortiguadora en un cohorte de niños de 13 años en Vantaa. H. Hausen: Caries Prediction en "Dental Caries: the Disease and its Clinical Management, 2nd Edition" Ole Fejerskov y Edwina Kidd, editores

Factores salivares que actualmente están siendo validados como pronosticadores de caries

- **Péptidos antimicrobiales (α -defensins)**
 - Tao et al., 2005
- **Tipos de oligosacáridos en glicoproteínas salivares**
 - Denny et al. 2006
- **GTF (transferasa de glucosil)**
 - Vacca-Smith et al., 2007
- **Arginina y actividad de deaminasa de arginina (ADS)**
 - Nascimento et al., 2009, Gordan et al. 2010
- **Urea and actividad de ureasa**
 - Morou-Bermúdez et al., 2011
- **Proteoma salivar mediante espectrometría de masa**
 - Hart et al., 2011

Biomarcadores salivares de enfermedades cardiovasculares

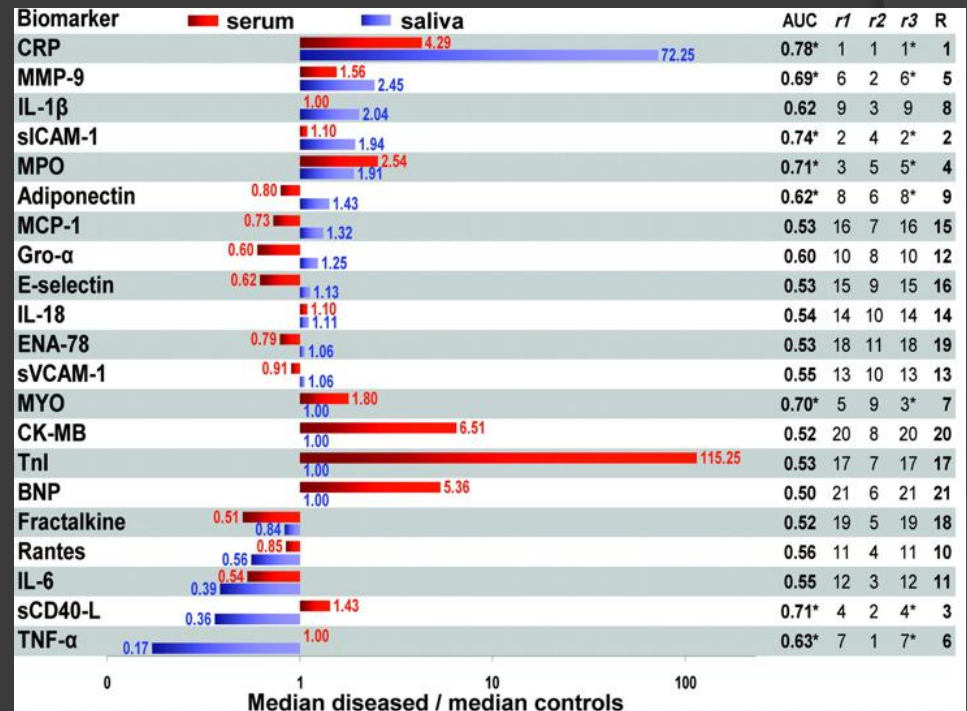
○ Diagnóstico de infarto cardiaco

- Basado en evidencia de isquemia miocárdial en ECG o imágenes y aumento y/o disminución de biomarcadores cardiacos en la sangre
 - **Troponinas I y T**
 - **Quinasa de creatina total**
 - **CK-MB**
 - **Mioglobina**
- La meta es desarrollar pruebas que ayuden a detectar el infarto lo antes posible y también aquellos donde el ECG no es conclusivo (permite comenzar terapia cuando es mas efectiva para el paciente, e.g. rtPA)

Biomarcadores salivares de enfermedades cardiovasculares

○ Detección de biomarcadores en saliva

- Análisis de 21 biomarcadores en saliva y sangre de pacientes con o sin infarto cardiaco agudo
- Diferencias entre suero y saliva
- Ningún biomarcador en saliva por si solo tiene la sensibilidad de troponina en sangre (AUC 0.99, 91%, 100%)
- El mejor resultado en saliva fue la combinación de CRP, MPO y ECG (AUC 0.95, 90%, 90%)



Floriano PN., et al., Clin Chem 55 (2009)

Biomarcadores salivares de malignidades no orales

● Cáncer de seno

- Análisis de proteoma en saliva de pacientes de carcinoma de seno detecta presencia elevada de c-erB-2 (HER2) y CA-15-3 los cuales habían sido identificados en suero (sensitividad 87% y especificidad 65%)
- Análisis de proteoma y transcriptoma de saliva identifico 8 genes y una proteínas (CA6) sobrepresados como posibles biomarcadores de saliva para carcinoma de seno (sensitividad 83%, especificidad 97%)

● Cáncer de páncreas

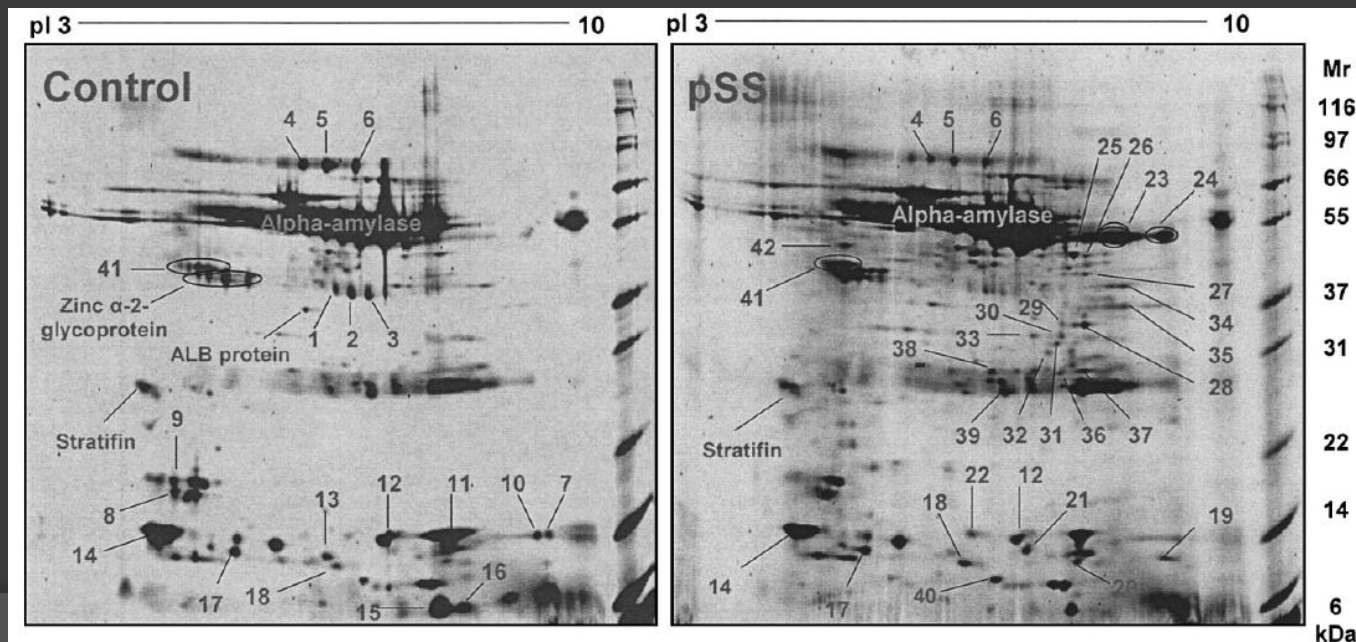
- Análisis de transcriptoma en saliva de pacientes con carcinoma de páncreas y normales por medio de micromatrices y qPCR se identificaron 12 biomarcadores
- Analizando distintas combinaciones de biomarcadores se obtuvo una combinación de 4 biomarcadores con sensitividad de 90% y especificidad de 95% (AUC=0.971)

Biomarcadores salivares de síndrome de Sjögren

- Usualmente toma meses a años diagnosticar desde que comienzan los síntomas
- Criterios de diagnóstico
 - Signos y síntomas objetivos de resequeidad de ojos y boca
 - Histopatología (biopsia) de glándula salivar
 - Prueba positiva en sangre de autoanticuerpos anti-SSA y/o anti-SSB
- Detección de biomarcadores en saliva de pacientes con SS
 - 10 pacientes con SS y 10 controles
 - Saliva completa analizada
 - **Gelatina bidimensional y espectrometría de masa para detectar proteínas**
 - **Micromatrices de ADN para detectar ARNm y qPCR para confirmar expresión de los genes**
 - Hu S., et al., Arthritis Rheum 2007:55

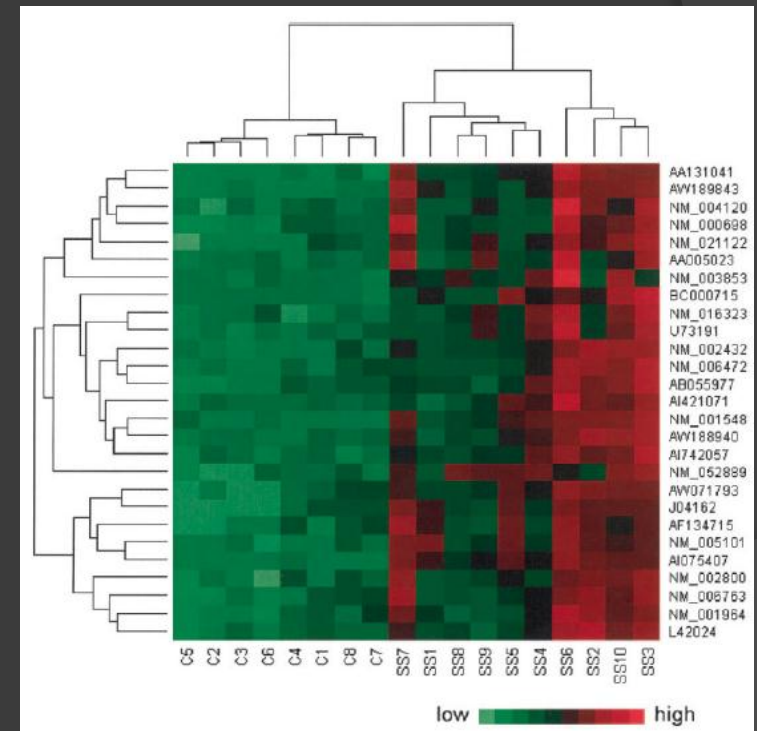
Biomarcadores salivares de síndrome de Sjögren

- Biomarcadores en saliva de pacientes con SS
 - De un total de 325 proteínas en las gelatinas, 42 estaban diferencialmente expresadas entre pacientes y controles
 - 27 péptidos sobreexpresados en saliva de SS
 - Proteína mas sobre expresada fue α -amilasa salivar



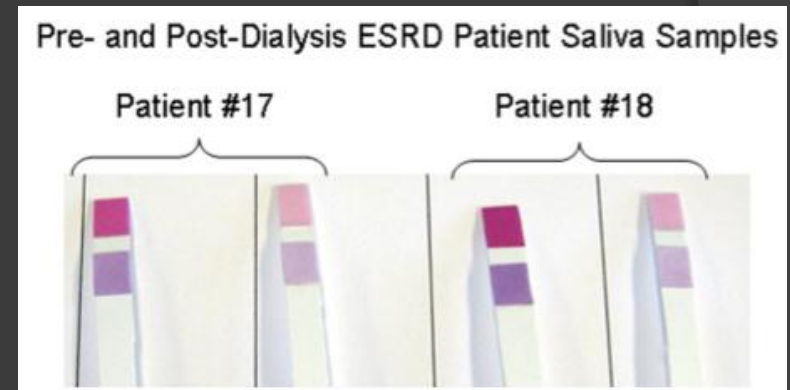
Biomarcadores salivares de síndrome de Sjögren

- Biomarcadores en saliva de pacientes con SS
 - 328 ARNm diferencialmente expresados en saliva de pacientes con SS y controles
 - 168 genes sobreexpresados en SS
 - 11 genes de los mas expresados fueron validados por qPCR
 - Gene mas sobreexpresado fue *G1P2* (500x)



Biomarcadores salivares de enfermedad renal

- ◉ **Biomarcadores en evaluación**
 - Cortisol, nitrito, ácido úrico, Na, Cl, amilasa, lactoferina, pH
- ◉ **Cortisol**
 - Niveles en saliva pueden indicar presencia insuficiencia adrenal en pacientes de ESRD
- ◉ **Nitritos y ácido úrico**
 - Prueba colorimétrica puede ayudar a determinar cuando el paciente necesita diálisis



Blicharz TM., et al., Clin Chem 2008:54

Biomarcadores salivares de diabetes tipo 2

○ Detection de biomarcadores

- Estudio con 2 grupos, controles (n=4) y diabéticos tipo 2 (n=4)
- Saliva analizada por MS
- 65 proteínas diferencialmente expresadas
- Pudieran ser útiles para establecer diagnóstico sin tener que hacer prueba de sangre
- Los niveles de α -1-antitripsina aumentan según la severidad de la condición
 - **Control < Prediabético < Diabético**
- Rao PV., et al., J Proteome Res 2009: 8

Rol de la saliva en la detección de sustancias de abuso

- ◉ Por años se ha usado la saliva para detectar sustancias controladas
- ◉ Existe la tecnología de medidores portátiles que permite el análisis fuera de laboratorio
- ◉ Drogas detectables en saliva
 - Cocaína, marihuana, anfetaminas y metanfetaminas, opiatos, fenciclidina (PCP), barbitúricos, benzodiacepinas, etanol, nicotina



Home Health testing



Philips Roadside Drug Test Kit

Uso de la saliva en la detección de enfermedades infecciosas

● VIH

- Sistema comercialmente disponible de Orasure Technologies (OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test Hepatitis)

● Hepatitis

- Virus de hepatitis A, B y C puede ser diagnosticado por detección de IgM en saliva.

● Virus de papiloma humano

- OralDNA Labs usa PCR para detectar en saliva presencia y tipo de virus (HPV16 & 18).



Uso de la saliva para monitoreo de drogas y hormonas

- ◉ Debe existir una buena correlación entre los niveles de la droga u hormona en sangre y en saliva
- ◉ Las drogas u hormonas detectadas se caracterizan por ser moléculas pequeñas, lipofílicas, no ionizadas que pueden pasar la membrana celular
- ◉ Puede ser ventajoso pues se detecta la forma libre de la droga que es la que es activa farmacológicamente.
- ◉ Ejemplos
 - Drogas: Ciclosporina, fenitoina, carbamacepina, litio, digoxin
 - Hormonas: cortisol, estradiol, aldosterona, testosterona, progesterona, insulina. (Puede ser útil para monitoreo del sistema endocrino ya que la facilidad de recolectar saliva permite tomar muestras secuenciales)

Uso de pruebas diagnósticas en la oficina dental

- **Objetivo del lab en chip**
 - Instrumentos miniaturizados para detección y cuantificación de multi-marcadores en la oficina dental
- **Aplicación de tecnología para identificar pacientes que requieren monitoreo o tratamiento**
 - Detectar cáncer oral cuando es tratable
- **Concepto aplica a otras enfermedades**
 - Enfermedades orales y sistémicas
 - Las personas ven mas al dentista que a los médicos
 - El dentista puede ser parte integral del manejo medico de los pacientes discerniendo para condiciones que entonces pueda referir al tratamiento correcto y monitorear el progreso de estas

Tecnología para pruebas en Punto de Contacto (POC)



Wei, F, Patel, P, Liao, W, Chaudhry, K, Zhang, L, Arellano-Garcia, M, Hu, S, Elashoff, D, Zhou, H, Shukla, S, Shah, F, Ho, C M, and Wong, D T Electrochemical sensor for multiplex biomarkers detection. *Clin Cancer Res*, 2009; 15: 4446-4452.

Tecnología para pruebas en Punto de Contacto (POC)

Handheld Oral Health Diagnostics Using Bio-active Nanoscale Detection

A next-generation handheld diagnostic platform delivers precision analysis of oral fluids.

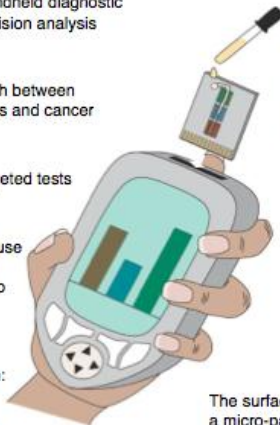
It's **smart**. Distinguish between several oral pathogens and cancer biomarkers.

It's **fast**. Perform targeted tests in just minutes.

It's **painless**. Make use of the body's natural diagnostic medium, no needles required.

It's **easy to use**.

A technological fusion: microfluidics, optical cell detection and nanobiotechnology come together in a compact diagnostic tool for any clinic.



Administer the patient sample directly into a disposable microfluidic cartridge.

The detector analyses the bio-content of the sample and provides a concise, reliable readout.



The surface of the fluid channel houses a micro-patterned array of active biomolecules.



Oral Fluid NanoSensor Test (OFNASET)

Conclusiones

- Diagnostico salivar es no invasivo, bajo costo y fácil para personal de salud y pacientes
- Biomarcadores han sido validados para cáncer oral e identificados para otras enfermedades
- La tecnología esta en camino de aprobación para conducir las pruebas clínicas necesarias para comercialización
- Esta tecnología puede transformar la medicina diagnostica y salvar vidas con discernimiento simple, económico y rutinario y detección temprana