



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

IMPORTANCIA ACTUAL DE LOS BIOMARCADORES.

**T E S I N A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

ELSY HERNÁNDEZ LÓPEZ

TUTORA: Esp. LILA ARELI DOMÍNGUEZ SANDOVAL



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

### **A mis padres Elsa y Rafael**

Por todo lo que me han regalado en esta vida, su amor, trabajo, sacrificios, consejos, y apoyo incondicional, siempre viendo por mi bienestar y educación, guiándome por el camino recto de la vida, inculcándome los valores que ahora poseo. Por regalarme la herencia más valiosa que pudiera recibir, la oportunidad de la educación. Por creer en mí. Es por ustedes lo que soy. Gracias por su ejemplo de vida, estoy orgullosa de tener a los mejores padres. Éste logro es de ustedes y vamos por más. Los amo.

### **A mis hermanos Hegel e Icken**

Por estar siempre que los necesito a mi lado a pesar de las distancia, porque son el mejor ejemplo de desarrollo académico y de vida que yo pueda tener. Los admiro y amo.

### **A mi familia**

Por ser parte de mi vida y demostrarme lo valioso y bello que es la familia. Por su apoyo moral y espiritual, que de una u otra forma estuvieron a mi lado. Gracias por su comprensión, apoyo y amistad que me proporcionan todos ustedes.

### **A mis amigos**

Un verdadero amigo es alguien que te conoce tal como eres, confía en ti, te acompaña en tus logros y tus fracasos, celebra tus alegrías, comparte tu dolor y jamás te juzga por tus errores. No me queda duda que ustedes me han brindado una amistad incondicional. Gracias por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto que jamás olvidaré.

### **A mis profesores**

Les agradezco por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, por su tiempo, amistad y por todos los conocimientos que me transmitieron a lo largo de esta etapa.

### **A ti**

Que has estado a mi lado durante 8 hermosos años, que me has regalado consejos, paciencia, apoyo infinito y comprensión, que a pesar de los errores y adversidades sabes demostrar que las personas tienen el derecho a una segunda oportunidad y no fallar ante ésta, que siempre has impulsando mi mente a un camino de superación y que en mis momentos de crisis fuiste mi mejor pilar de apoyo, gracias por todo tu amor, por ser mi ángel y porque a pesar de la distancia física, me has acompañado en este camino. Te amo. SX.

### **A mi Universidad Nacional Autónoma de México**

A la máxima casa de estudios, la cual llevo en el corazón siempre, que me dio todo y abrió sus puertas del conocimiento para mí. A mi maravillosa Facultad de Odontología nido de muchos que como yo eligieron esta extraordinaria carrera y que con mucho orgullo, amor, pasión y respeto representaré.

***“Por mi Raza hablará el Espíritu”***

**José Vasconcelos**

# Importancia actual de los biomarcadores.

## Índice

Introducción .....	5
Objetivos .....	6
1. Biomarcadores .....	7
1.1 Definición.....	7
1.2 Antecedentes.....	9
1.3 Usos de los biomarcadores en medicina .....	12
2. Importancia clínica de los biomarcadores .....	18
2.1 Saliva.....	18
2.1.1 Glándulas salivales.....	18
2.1.2 Funciones y composición de la saliva .....	23
2.1.3 Transferencia de moléculas de la sangre a la saliva .....	27
2.2 La saliva como fluido de diagnóstico .....	29
2.3 Influencia de los métodos de recolección de saliva .....	33
3. Importancia de los biomarcadores en odontología .....	36
Conclusiones .....	44
Referencias bibliográficas.....	46

## **Introducción**

Existen numerosos tipos de biomarcadores importantes para la detección temprana de las enfermedades, así como para determinar el pronóstico y el tratamiento de ellas. Es decir, no solamente indican la presencia de alteraciones patológicas, sino también la posible susceptibilidad de individuos a desarrollar alguna enfermedad en el futuro e incluso evaluar la posible respuesta que generará algún individuo enfermo ante determinados procedimientos terapéuticos. Actualmente hay mucha investigación y desarrollo en el campo de biomarcadores moleculares en todas las áreas de la biología aunque existe relativamente poca información práctica acerca de los biomarcadores salivales, sin embargo hay mucho por conocer. Además, los biomarcadores salivales tienen sobresalientes ventajas, aunque también desventajas, en comparación con los que se encuentran en el suero, que históricamente han sido los más estudiados.

En el presente trabajo, se revisan los biomarcadores en odontología como para la detección de cáncer oral, la enfermedad periodontal y el Síndrome de Sjögren. Es interesante pensar que si existieran biomarcadores para estas enfermedades validados clínicamente con éxito, un gran número de pacientes podrían salvarse o tener un diagnóstico temprano, disminuyendo no solo tasa de mortalidad para esta enfermedad, sino la calidad de vida de los pacientes enfermos.

Lo que se busca en un futuro es que el odontólogo tenga conocimiento en el campo del diagnóstico molecular y que se incremente la posibilidad del diseño de terapias eficientes y los tratamientos adecuados para cada individuo y que así pueda mejorar su calidad de vida.

Es por ello que este trabajo propone hacer una revisión crítica del área, para dar a conocer, desde el punto de vista del odontólogo, la importancia de los posibles biomarcadores que puedan ser utilizados en la práctica clínica odontológica.

## **Objetivos**

1. Conocer la importancia actual de los biomarcadores.
2. Explicar que es un biomarcador.
3. Conocer la importancia de la saliva como fluido de diagnóstico.
4. Conocer la importancia de los biomarcadores en odontología.

# 1. Biomarcadores

## 1.1 Definición

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología (1). Éstos son parámetros biológicos que proveen información sobre el estado normal o patológico de un individuo o una población, y son utilizados para la comprensión de diferentes enfermedades en varios aspectos como: el tratamiento, prevención, diagnóstico y progresión de la enfermedad, respuestas a la terapia, evaluación experimental toxicológica de medicamentos o pesticida, medición de riesgo ambiental y epidemiológico, además de evaluación de la intervención terapéutica entre otros (2).

Por lo tanto un biomarcador es una de las características que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de los procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.

Un criterio de valoración clínica, es una característica o variable que refleja cómo se siente el paciente, sus funciones y si sobrevive.

Y por último un criterio de valoración indirecto es un biomarcador que se pretende sustituir a un criterio de valoración clínica, se espera predecir el beneficio clínico sobre la base de la epidemiología, terapéutica, fisiopatología o de otras pruebas científicas. Esta es una definición y un marco conceptual que han sido desarrollados por el Biomarkers Definitions Working Group, el cual es parte de la iniciativa del Director del NIH sobre los biomarcadores y los criterios de valoración indirectos (3).

No existe un consenso de expertos sobre la clasificación general de los biomarcadores, sin embargo hay diferentes formas de agruparlos empíricamente, por ejemplo: (Observar Tabla 1)

<b>Aplicación</b>	<b>Tipo de biomolécula</b>	<b>Tipo de tejido</b>	<b>Medio líquido</b>
Diagnóstico	ADN	Epitelio	Suero
Pronóstico	ARN	Tejido conjuntivo	Sudor
Terapéutico	Proteínas		Orina
	Enzimas		Líquido cefalorraquídeo
	Anticuerpos		Saliva
	Metabolitos y sus variaciones morfológicas		Lágrimas

Tabla 1. Clasificación de los biomarcadores. Fuente propia.

## 1.2 Antecedentes

Históricamente los biomarcadores han sido indicadores fisiológicos como la presión arterial, tasas de actividad del corazón o niveles de temperatura corporal, lo que puede medirse y directamente ser relacionado con la fisiología de un estado de enfermedad. En el siglo pasado, las herramientas de la química han añadido un gran número de biomarcadores para la atención médica de rutina que podrían medirse en la sangre, el plasma y el cuerpo de otros fluidos y en algunos casos también los tejidos. Estos incluyen la glucosa en sangre, colesterol, creatinina, factores de coagulación y enzimas hepáticas (4).

Uno de los primeros biomarcadores moleculares fue el antígeno carcinoembrionario (CEA) que en el campo de la biología del cáncer con el Dr. Joseph Gold en el año 1965 se aisló de la sangre en pacientes con cáncer de colon, éste antígeno es un biomarcador que se encuentra normalmente en tejidos. A partir de algunos estudios se realizó una considerable inversión para detección precoz del cáncer (5). A finales de la década de 1970, el potencial de prueba de suero había sido desarrollado para detectar una variedad de cánceres (6).

Después más biomarcadores moleculares fueron descubiertos. Por ejemplo, el antígeno específico de la próstata (PSA), que se identificó posteriormente como calicreína-3, ahora se ha convertido en una pantalla de laboratorio de rutina para el cáncer de próstata y la inflamación (7,8). Aunque el (PSA) es el biomarcador más conocido del cáncer que ha sido utilizado por los médicos para la detección temprana del cáncer de próstata (9). Esta prueba (PSA) ha sido ampliamente utilizado, y ha dado lugar a un aumento en la detección temprana de las enfermedades (10).

En 1994 y 1995 fueron analizadas varias familias con fuertes patrones de cáncer de mama, y se descubrió que hay dos genes con alta susceptibilidad a presentar esta enfermedad, estos son el BRCA1 y el BRCA2 (11,12). Las

mujeres que tengan una mutación de estos dos genes, presentan un riesgo muy elevado a presentar cáncer de mama (9).

Otro biomarcador para cáncer es el gen ErbB2 también conocido como el oncogén HER-2/neu, que codifica un receptor transmembrana tirosina quinasa con extensa homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Se ha sabido que ERBB2 la sobreexpresión se produce en un 20% a 30% de los cánceres de mama. La expresión ERBB2 parece estar asociada con un fenotipo más agresivo lo que lo hace el candidato mas utilizado en el diagnóstico para el cáncer de mama (13,14).

Al mismo tiempo otros biomarcadores fueron descubiertos en otras enfermedades (4) tal como la troponina cardiaca T (CTN) que se detectó por primera vez en modelos caninos y roedores como un marcador fiable para la lesión cardiaca (15) y quedó establecido como un biomarcador para el diagnóstico de la enfermedad cardíaca humana, en particular isquemia cardiaca e infarto al miocardio (16).

En la década de 1980 otros biomarcadores de cáncer adicionales fueron desarrollados como el CA19-9 para el cáncer colorrectal y de páncreas, CA15-3 para el cáncer de mama y la CA-125 para cáncer de ovario (9). Sin embargo estos biomarcadores que han sido indicadores fiables de una enfermedad, también están presentes en individuos sanos, pero se encuentran en una cantidad considerablemente alta en pacientes con cáncer, además que estos marcadores en su mayor parte no son específicos para un solo tipo de cáncer. Por ejemplo, los pacientes con cáncer de pulmón o cáncer de mama a menudo se han elevado CEA y CA-125, y estos mismos pueden estar presentes en mujeres con trastornos ginecológicos benignos (17).

Actualmente con los avances registrados en la genómica humana se puede considerar que la nueva era de biomarcadores es aportada por el análisis de macromoléculas orgánicas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos) presente en los individuos, que no solamente indiquen la presencia

de alteraciones patológicas, sino también la posible susceptibilidad de cierto paciente a desarrollar alguna enfermedad en el futuro e incluso evaluar la posible respuesta que generará algún individuo enfermo ante determinados procedimientos terapéuticos(18).

Los procedimientos de diagnóstico de laboratorio más comúnmente utilizados incluyen los análisis de los constituyentes celulares y química de la sangre. Sin embargo otros fluidos biológicos se están utilizando para el diagnóstico de las enfermedades, y la saliva ofrece algunas ventajas distintivas (19).

### **1.3 Usos de los biomarcadores en medicina**

Los avances de la genómica, la proteómica y la patología molecular han generado durante los últimos años muchos biomarcadores con un valor clínico potencial (20). Éstos incluyen las herramientas necesarias que nos ayuden a la comprensión de la predicción, causa, diagnóstico, progresión, regresión o el resultado del tratamiento de la enfermedad.

Los biomarcadores tienen aplicaciones muy valiosas en el diagnóstico y vigilancia del estado de salud de las personas, incluyendo:

- Como herramienta de diagnóstico para la identificación de aquellos pacientes con una enfermedad o una condición anormal (ejemplo, la glucosa en el diabético).
- Utilizar como una herramienta para la clasificación según la gravedad de la enfermedad o la clasificación de la extensión de la enfermedad.
- Como un indicador de pronóstico de la enfermedad (ejemplo, medición de la reducción del tumor (3)).

Los biomarcadores pueden añadir la posibilidad de integrar un indicador preciso de la eficacia con una terapia de mecanismo específico basado en el uso de la composición genética de la lesión y el genotipo de los pacientes para guiar la selección del tratamiento para cada paciente individualmente (21).

Al paso de los años ha existido un gran número de estudios que identifican posibles biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades, incluyendo: cáncer principalmente, enfermedades cardíacas, enfermedades hereditarias, diabetes, trasplante de órganos, enfermedades infecciosas, trastornos inmunológicos y genéticos, trastornos en el sistema nervioso, así como también para monitorear enfermedades orales incluyendo enfermedades periodontales y para evaluar el riesgo a caries, entre otros (4,22,23). En la siguiente parte revisaremos la importancia de los biomarcadores en algunas enfermedades.

➤ **Enfermedad cardiovascular.**

La aterosclerosis es una condición asociada con depósitos de lípidos en el revestimiento de las arterias y conduce progresivamente a un infarto agudo al miocardio. Se ha observado que las persona que tienen mayores concentraciones de proteína C reactiva en sangre (CRP), que es un reactivo de fase aguda producida por el hígado durante los procesos inflamatorios, son susceptibles a desarrollar enfermedades cardiovasculares, sin embargo, a partir de este biomarcador se hizo un estudio donde prescribir rosuvastatina (un fármaco hipolipemiente) redujo la incidencia a eventos cardiovasculares. Podemos destacar que se ha demostrado también que es posible detectar la CRP en la saliva(24).

➤ **Diabetes**

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica ya sea heredada o adquirida, y se caracteriza por la deficiencia de la producción de insulina por el páncreas o por la ineficacia de la insulina producida. La búsqueda de biomarcadores de proteínas específicas de la diabetes mellitus tipo 2 que realizó Samreen Riaza en el 2009, logró encontrar niveles elevado de CRP , de apolipoproteína y de leptina como biomarcadores proteícos para la diabetes mellitus tipo 2. El descubrimiento de estas proteínas marcadoras podría proporcionar un método complementario para la detección precoz de riesgo de esta enfermedad (25).

### ➤ **Enfermedades infecciosas**

En este tipo de enfermedades infecciosas, los biomarcadores se caracterizan por la presencia de anticuerpos. En la infección por *Helicobacter pylori* se asocia con la enfermedad de úlcera péptica y gastritis crónica, cuando se encuentra esta bacteria, se estimula la producción de anticuerpos IgG específica, si se realiza una prueba de ELISA para la detección de estos anticuerpos en el suero, existe una sensibilidad y especificidad de alto porcentaje para esta enfermedad. Para la neumonía neumocócica, en una prueba de ELISA, la detección de polisacárido C neumocócico en la saliva es biomarcador de diagnóstico de esta enfermedad. Se han encontrado biomarcadores para infecciones virales, como la hepatitis, para los bebés recién nacidos con la infección del rotavirus, también anticuerpos para el virus del herpes, incluso para el VIH, entre otros. Muchos de estos biomarcadores se pueden encontrar no solo en suero, también están presentes en la saliva

### ➤ **Cáncer**

En ésta enfermedad hay muchas investigaciones buscando biomarcadores para los diferentes tipos de cáncer, sabemos que los biomarcadores en cáncer son de suma importancia ya que pueden ser útiles para la predicción de varios resultados durante el curso de la enfermedad, incluyendo la detección temprana, los resultados de predicción y la detección de la recurrencia de la enfermedad.

Marcadores candidatos que pueden tener potencial de detección precoz del cáncer es la calcitonina que cuando sus niveles en el suero se elevan, puede ayudarnos a detectar el carcinoma medular de tiroides, el PSA para la detección de cáncer de próstata es el mas estudiado.. Existen otros biomarcadores reportados con baja sensibilidad pero que también pueden

ser útiles, por ejemplo el CA-125 en el diagnóstico precoz de cáncer de ovario, el CEA en el cáncer de colon, el antígeno tumoral vesical (BTA), la proteína de la matriz nuclear-22 y la calreticulina (CRT) para el cáncer de vejiga.

Otro tipo de biomarcadores son los predictivos, con esto se refiere a que tienen el objetivo predecir el resultado del cáncer, en otras palabras tienen la capacidad de distinguir entre los tumores invasivos o no invasivos, entre los tumores metastásicos y no metastásicos y entre los tumores indolentes y que amenazan la vida, algunos de los ejemplos de estos son; en el cáncer de próstata se identificaron la timosina  $\beta$ -15, inhibidor antizyme y colágeno XXIII que tienen la capacidad de presentar metástasis, otros como la proteína p53 mutada, la sobreexpresión de bcl-2 y Ki-67 están asociados con un mal pronóstico en éste mismo cáncer, y algunos otros que son marcadores de pronóstico potenciales de cáncer de próstata son la osteopontina, osteocalcina, metaloproteinasa (MMP) y los inhibidores de MMP. En el cáncer de mama hay dos genes susceptibles BRCA1 y BCRA2 que nos pueden indicar metástasis, la osteopontina también puede servir como marcador pronóstico, la presencia de Her-2 está asociado con pacientes de cáncer de mama con el peor pronóstico y Su-2 es un marcador predictivo que no sólo proporciona el pronóstico de la enfermedad si no que también puede conducir a la selección de un tratamiento apropiado. En el cáncer colorrectal las mutaciones de genes de ADN reparadores de desajustes como MHL1, MSH2 o MSH6 y los aumentos de niveles de D-dímero en el suero se asocian con el pronóstico de cáncer colorrectal. Otros biomarcadores de pronóstico menos utilizados comúnmente son  $\beta$ -2 microglobulina que se ha utilizado para el pronóstico de mieloma múltiple y linfomas, la p53 en el cáncer de pulmón, la caspasa-3 en el carcinoma gástrico. Revisado en (9).

Otro tipo de cáncer que nos compete, es el cáncer oral de células escamosas (COCE), se han encontrado un número de biomarcadores que

nos son útiles para el diagnóstico de esta enfermedad y por su ubicación en la cavidad oral, los biomarcadores salivales son una gran herramienta para el diagnóstico de COCE, más adelante lo revisaremos a fondo.

También nos ayudan en el diagnóstico diferencial, el control de drogas, seguimiento de los niveles hormonales, en el diagnóstico de algunas enfermedades de la cavidad oral ligadas a enfermedades sistémicas, son útiles como herramientas de información para la evaluación de factores de riesgo asociados a la exposición de agentes ambientales por ejemplo en salud ocupacional, toxicología humana y carcinogénesis (19,26).

Un biomarcador por sí solo no puede ser una fuente suficientemente fiable para permitir a los investigadores que definan la patogénesis de la enfermedad, el uso de combinaciones de los biomarcadores y las tecnologías puede proporcionar mayor información para el diagnóstico (24). Desafortunadamente muchos de los biomarcadores no están aún validados, ya que la validación de los biomarcadores a través de la investigación clínica sigue siendo un desafío debido a la multitud de métodos de evaluación para los biomarcadores (ejemplo, técnicas de histoquímica, proteómica, etc), la viabilidad de la obtención de las muestras de tejido, la fiabilidad y reproducibilidad del ensayo, y los gastos relacionados con la evaluación de los biomarcadores (21). También podemos decir que la falta de disponibilidad de marcadores biológicos con alta especificidad y sensibilidad limita nuestra capacidad para detectar biomarcadores para las enfermedades. La sensibilidad se refiere al porcentaje de los individuos con la enfermedad que son marcador positivo (validez de un resultado positivo), mientras que la especificidad se refiere a la probabilidad de que un determinado marcador será elevado sólo en individuos con la enfermedad (validez de un resultado negativo). Un marcador perfecto debe tener una sensibilidad de 100% y 100% de especificidad(9).

Existen marcadores biológicos a base de ADN que se han mostrado como herramientas nuevas y potentes para la detección del cáncer, sin embargo la mayoría de estos marcadores se han identificado ya sea en líneas celulares de cáncer o en la biopsia de cánceres invasivos y metatásicos, esto nos limita a nuestra capacidad de detectar el cáncer en etapas tempranas y con métodos no invasivos. Por lo mismo se han detectado biomarcadores en los fluidos corporales (suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor, lágrimas y saliva), y estos tienen la ventaja de ser no invasivos para el paciente y la capacidad de predecir el desarrollo del cáncer en su etapa más temprana o en etapa precancerosa(27). Dada la importancia de la saliva en la cavidad oral, revisaremos con mayor atención los biomarcadores salivales.

## **2. Importancia clínica de los biomarcadores**

### **2.1 Saliva**

#### **2.1.1 Glándulas salivales**

En la cavidad oral encontramos tres glándulas mayores que están presentes en pares, éstas son la glándula parótida, submandibular, y la sublingual que se encuentran fuera de la cavidad oral y se relacionan con la mucosa mediante largos conductos excretores (28).

Las glándulas salivales mayores producen alrededor de 700 a 1100 mL de saliva al día. Las glándulas salivales menores se hallan en la mucosa y submucosa de la cavidad oral, pero sólo contribuyen en 5% de la producción diaria de saliva (29).

La saliva humana tiene un pH = 6,0-7,0 , es un fluido biológico claro , ligeramente ácido que contiene una mezcla de secreciones de varias glándulas salivales , incluyendo la glándula parótida , submandibular , sublingual y otras glándulas menores por debajo de la mucosa oral, así como líquido crevicular gingival, expectorado de secreciones bronquiales y nasales, suero y células de sangre de las heridas orales, bacterias y productos bacterianos, virus y hongos, restos de alimentos y células epiteliales descamadas (19,23,30).

Las glándulas salivales se componen de células epiteliales especializadas, y su estructura se puede dividir en dos regiones anatómicas específicas que son, las regiones acinares y las ductales (19). La saliva que elaboran las células acinares es isotónica con el plasma y es llamada saliva primaria, ésta se modifica por la acción de las células de los conductos que eliminan de ella iones de sodio y cloruro y secretan iones de potasio y bicarbonato, por lo tanto se denomina saliva secundaria la cual es hipotónica (29).

El tipo de saliva que cada glándula produce refleja sus propiedades reológicas (24). Esto se debe a las características histológicas de cada glándula salival ya que están compuestas por células glandulares serosas y

mucosas, y de acuerdo a estos dos tipos celulares se pueden clasificar en tres categorías siguientes:

Las glándulas serosas que contienen sólo células glandulares serosas y secretan saliva fluida que contiene ptialina, pero carece de mucina, las glándulas mucosas que sólo contienen células glandulares mucosas y secretan mucina bastante viscosa y por último las glándulas mixtas contienen células mucosas y serosas, la secreción es viscosa e incluyen tanto mucina como ptialina (31).

La regulación de la secreción de la saliva para las glándulas mayores depende exclusivamente de su inervación (31). Cabe mencionar que estas glándulas no secretan saliva en forma continua, si no que la actividad secretora es estimulada a través de la inervación simpática y parasimpática (29), esta secreción es estimulada en forma refleja por la acción sobre las papila gustativas y los nervios sensitivos comunes de la mucosa de la boca y por vía indirecta, por determinados estímulos psíquicos u olfatorios (31).

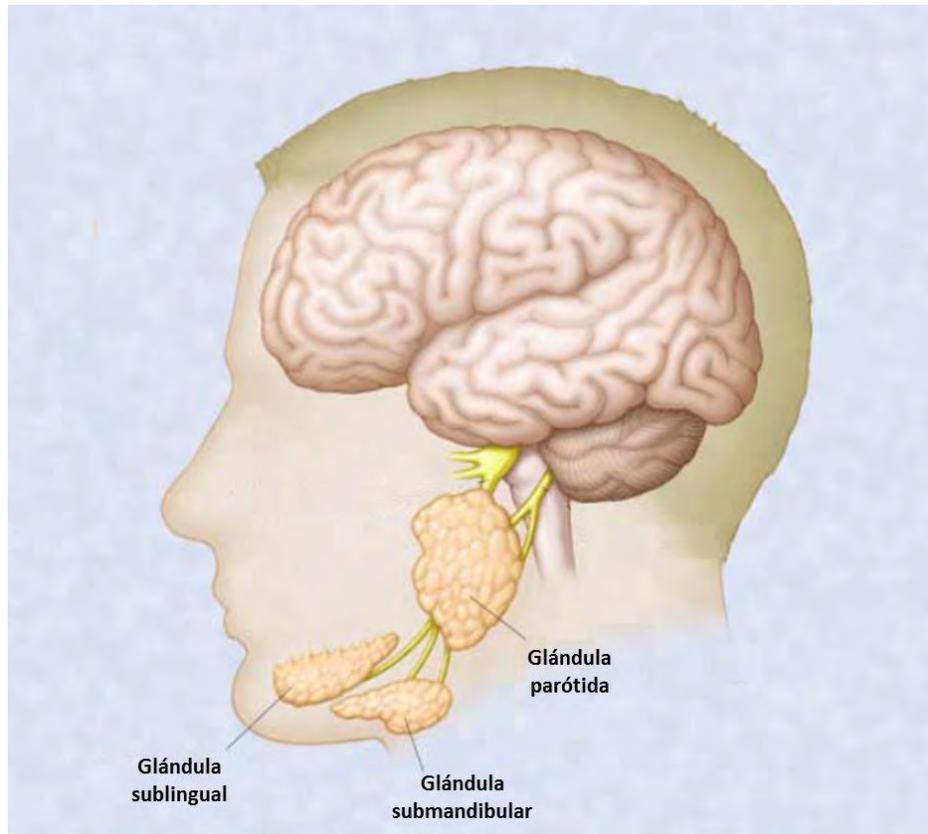


Figura 1. Localizaciones anatómicas de las tres glándulas salivales mayores: parótida, submandibular y sublingual. Tomado de Forde y colleagues2 con permiso de la Fundación Mayo para la Educación e Investigación Médica.

### ➤ **Glándula Parótida**

La parótida es la glándula salival más grande, pesa alrededor de 20 a 30gr (Gartner, 2008), contribuyen en la producción diaria de saliva en un 25 a 30% (32).

Se sitúa entre la mandíbula, la apófisis estiloides y la apófisis mastoideas, justamente detrás de la rama de la mandíbula y delante del músculo esternocleidomastoideo. El conducto excretor principal o conducto parotídeo (de Stenon), desemboca en el vestíbulo de la boca, sobre la papila parotídea frente al segundo molar superior (32). (Revisar Figura1)

Aunque esta glándula produce una secreción serosa pura, el producto secretor tiene múltiples componentes (29).

#### ➤ **Glándula submandibular**

Mide un poco más de la mitad del volumen de la parótida (32), pesa solamente de 12 a 15gr y su producción es del 60% de la cantidad total de la saliva (31).

Se sitúa exactamente ocupando el ángulo que forman entre sí el cuerpo de la mandíbula con el músculo milohioideo (32). El conducto excretor principal, se le denomina conducto submandibular (de Wharton), éste se abre en el piso de la cavidad oral, cerca de la lengua (Revisar figura1). La glándula submandibular posee una cápsula y un estroma de tejido conectivo bien desarrollados (31).

El 90% de los acinos de esta glándula , produce saliva serosa, en tanto que los acinos restantes elaboran saliva mucosa por lo que se le denomina seromucosa (29,31).

#### ➤ **Glándula sublingual**

La glándula sublingual es la más pequeña de todas las glándulas mayores, tiene forma de almendra, pesa 2 a 3gr y elabora nada mas el 5% de la producción total de la saliva (29).

La cápsula de tejido conjuntivo se encuentra poco desarrollada, aún así la glándula presenta finas lobulaciones. Su sistema de conductos no forma un conducto terminal, varios conductos se abren en el piso de boca y en el conducto de la glándula submaxilar (29). Por lo general se encuentran de 10 a 12 conductos excretores sublinguales que se abren cada uno a un pliegue de la membrana mucosa, el pliegue sublingual. Existe un conducto excretor

sublingual de mayor tamaño, este es el conducto principal (de Bartholin), que desemboca junto con el conducto de Wharton (31).

➤ **Glándulas menores**

Estas glándulas están diseminadas por toda la extensión de la mucosa de la cavidad bucal. Existen glándulas labiales, bucales, palatinas y linguales. Las labiales y bucales llevan sus secreciones al vestíbulo de la cavidad bucal y las linguales y palatinas lo llevan a la cavidad bucal propiamente dicha. A diferencia de las glándulas mayores, producen una secreción de una forma más o menos continua (32).

Las glándulas palatina, como su nombre lo indica están situadas en el paladar, las labiales ocupan la cara posterior de los labios, las bucales se sitúan en la mucosa de las mejilla (32).

Las glándulas linguales posteriores y laterales y glándulas palatinas son de tipo mucoso, las glándulas labiales y bucales son de tipo mixto y el resto de glándulas menores son de tipo seroso (32).

### 2.1.2 Funciones y composición de la saliva

El papel básico de la saliva es para proteger y mantener la integridad de la parte superior de la mucosa del tracto digestivo, facilitando más funciones importantes (24)(Observar Tabla2).

- **Lubricación y protección:** La saliva tiene la capacidad de formar una cubierta seromucosa que lubrica y protege los tejidos orales contra agentes irritantes (33,34). Esto se produce debido a las mucinas, PRPs y agua que son las encargadas de la lubricación de las superficies orales tanto tejidos blandos como duros, la protección contra la deshidratación y el mantenimiento de la viscoelasticidad salival, esto es importante para la masticación, el habla y la deglución (24,35). También regulan selectivamente la adhesión de los microorganismos a las superficies de los tejidos orales, y contribuyen en el control de la colonización de bacterias y hongos (35).
  
- **Acción amortiguadora:** La saliva tiene un comportamiento como un sistema de tampón para la protección de la boca de la siguiente forma: impide la colonización de microorganismos potencialmente patógenos, neutraliza y limpia los ácidos producidos por microorganismos acidogénicos, por lo tanto previene la desmineralización del esmalte (35), además el metabolismo de proteínas salivales y bacterias, producen urea y amoníaco, el cual ayuda a aumentar el pH (28).
  
- **Mantenimiento de la integridad dental:** la saliva tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad físico-química de los dientes. Los factores principales que controlan la estabilidad del esmalte son las concentraciones principalmente de calcio, fosfato, fluoruro y el pH salival (36). La remineralización de lesiones cariosas

Grado I puede ocurrir, gracias a la presencia de iones fluoruro en la saliva (28).

- **Propiedades antimicrobianas:** la saliva tiene una importante tarea sobre los microorganismos que colonizan los tejidos de la cavidad oral, tiene un efecto barrera proporcionada por las mucinas, y una actividad antimicrobiana con algunas proteínas como las histatinas, lisozima, lactoferrina, y peroxidasa (28). Algunas proteínas son importantes para la inhibición de la precipitación de los iones de calcio y fosfato en las glándulas salivales (37). La principal inmunoglobulina salival es la IgA secretora, ésta es capaz de neutralizar los virus, bacterias, toxinas y enzimas, también se encarga de la aglutinación de microorganismos impidiendo su adherencia a los tejidos orales (35). Otras inmunoglobulinas (IgG e IgM) están presentes en menos cantidad que la IgA, y esto puede deberse a que llegan a la saliva sólo a través del fluido crevicular (37). Las mucinas, así como aglutininas específicas, microorganismos también agregados.
- **Reparación de tejidos:** existen sustancias que se encargan de promover el crecimiento y la diferenciación de tejidos, cicatrización de heridas, y otros efectos beneficiosos (28). Cuando la saliva es mezclada con sangre, el tiempo de coagulación se acelera (aunque el coágulo resultante es menos sólido de lo normal (35).
- **Digestión:** la saliva es la responsable de iniciar la digestión del almidón, la enzima encargada de esta acción es la enzima digestiva  $\alpha$ -amilasa (ptialina) que disuelve las sustancias alimenticias y comienzan el proceso digestivo (35). La lubricación y humectación de la saliva permiten la formación y deglución del bolo alimenticio (28).

- **Sabor:** las funciones de la saliva en el gusto se debe a las sustancias solubles de los alimentos para que puedan ser detectados por los receptores de sabor localizados en las papilas gustativas (28). La hipotonía salival y su capacidad para disolver sustancias permite a las papilas gustativas percibir diferentes sabores. Además, la saliva contiene proteínas como Gustin que tienen un efecto sobre el crecimiento y maduración de los receptores del gusto (35).

<b>PRINCIPALES FUNCIONES DE LA SALIVA</b>	
<b>Función</b>	<b>Componentes involucrados</b>
<b><i>Protección</i></b>	
<b>Lubricación</b>	Mucina, glicoproteínas ricas en prolina, agua
<b>Antimicrobiana</b>	Amilasa, complemento, defensinas, lisozimas, lactoferrina, lactoperoxidasa, mucinas, cistatinas, histatinas, glicoproteínas ricas en prolina, IgA secretora, inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora, estaterina, tromboespondina
<b>Factores de crecimiento</b>	Factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I & IGF-II), factor de crecimiento nervioso (NGF).
<b>Integridad de la mucosa</b>	Mucinas, electrolitos, agua
<b>Limpieza</b>	Agua
<b>Amortiguadora</b>	Bicarbonato, iones de fosfato, proteínas
<b>Remineralización</b>	Calcio, fosfato, estaterina, proteínas ricas en prolina aniónicas
<b><i>Funciones relacionadas con digestión y habla</i></b>	
<b>Preparación de la comida</b>	Agua y mucina
<b>Digestión</b>	Amilasa, lipasa, ribonucleasas, proteasas, agua y mucinas
<b>Sabor</b>	Agua y gustin
<b>Habla</b>	Agua y mucinas

Tabla 2. Principales funciones de la saliva. Traducida de (3)

### **2.1.3 Transferencia de moléculas de la sangre a la saliva**

La saliva está compuesta generalmente de moléculas que se sintetizan directamente en las glándulas salivales y en su minoría de las moléculas que pasan a la saliva desde el plasma sanguíneo. Existe una serie de mecanismos mediante los cuales se transportan las moléculas de la sangre a la saliva(30), (Revisar Figura 2) entre estos están:

**Difusión simple:** ésta es la ruta más común de moléculas para pasar desde la sangre a la saliva, ya que algunos de los capilares que rodean las glándulas salivales son bastante porosos, además por el gradiente de concentración, por lo tanto la capacidad de una molécula para difundirse pasivamente, depende de su tamaño y la carga eléctrica que lleva. Por ejemplo, moléculas lipofílicas incluyendo las hormonas esteroideas como la testosterona, los estrógenos y progesterona son transportados por difusión simple. Una molécula que proviene del suero sanguíneo debe cruzar 5 barreras, la pared de los capilares, el espacio intersticial, la membrana de las células basales de la célula, el citoplasma de la célula, y la membrana celular luminal (24,30).

**Transporte activo:** este es otro medio de transporte para la entrada de moléculas de los capilares a la saliva, esto es a través de las células secretoras de las glándulas(24). Los iones de sodio son bombeados activamente por las células secretoras, generando un gradiente de concentración diferente. Este tipo de mecanismos es utilizado para muchos electrolitos, algunas moléculas como la IgA y se ha demostrado que en algunos fármacos como la penicilina y la tetraciclina (38).

**Ultrafiltración:** éste es un mecanismo extracelular, se encarga de transportar un tercio del total de moléculas que van de la sangre a la saliva, es el resultado de la filtración a través de los espacios entre los acinos y las células ductales. Sólo permite el tránsito a moléculas relativamente pequeñas, por ejemplo agua, iones catecolaminas y esteroideas sulfatados que no pueden pasar a través de la bicapa de fosfolípidos por sus cargas eléctricas, se introducen a través de este mecanismo (24).

A través del fluido crevicular: la transudación de compuestos del plasma en la cavidad oral ya sea por el fluido crevicular o directamente desde la mucosa oral, es otro de los mecanismos por donde las moléculas se transportan a la saliva. La presencia de moléculas plasmáticas como la albúmina depende de este mecanismo(24). Dependiendo del grado de inflamación en la encía como en el caso de la gingivitis, en la saliva habrá proteínas con peso molecular más alto, por ejemplo la globulina y el fibrinógeno(38).

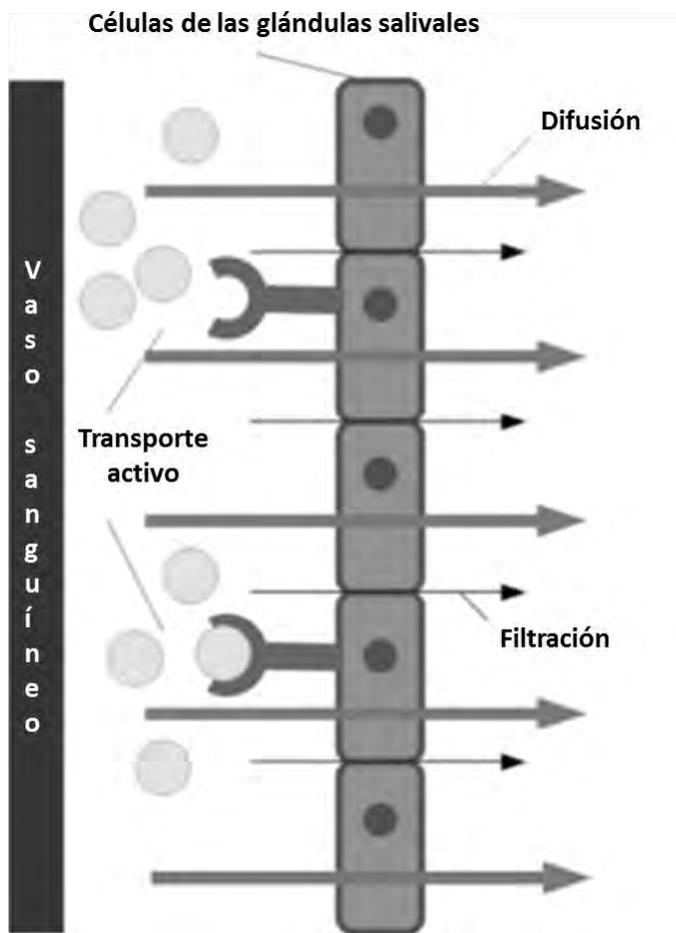


Figura 2. Transporte de biomoléculas a partir de capilares de sangre a la saliva. Tomado de (24)

## **2.2 La saliva como fluido de diagnóstico**

En los últimos 10 años, el uso de la saliva como fluido de diagnóstico ha ganado la atención y se ha convertido en una historia de éxito en la investigación. Algunas de las nanotecnologías actuales y la secuenciación del genoma humano han acelerado el descubrimiento de biomarcadores en fluidos corporales y han demostrado tener la sensibilidad analítica requerida para el uso de saliva como medio de diagnóstico, para detectar y predecir la progresión de la enfermedad (24,30).

La saliva puede reflejar el estado fisiológico, incluyendo variaciones emocionales, endocrinas, nutricionales, metabólicas y proporciona una fuente para la vigilancia de la salud oral y sistémica, sabemos que la mayoría de las moléculas que están presentes en la sangre o la orina también pueden estar presentes en las secreciones salivales, sin embargo su uso como un fluido de diagnóstico ha visto obstaculizado a causa de muchos aspectos como son: la falta de comprensión de la fisiología de la saliva, la variación del ciclo circadiano, la edad, género, diferencias genéticas, falta de comprensión de los medios de transporte de las moléculas a partir de los capilares sanguíneos a la saliva, la caracterización funcional limitada las proteínas salivales, conocimiento de las proteínas que son altamente polimórficas y sus variaciones, la falta de estandarización de los métodos de recolección de las muestras y el cambio de composición salival en función de la dieta y la ingesta de líquidos (23,30).

Las concentraciones de biomoléculas en la saliva son por lo general una décima hasta una milésima parte de los niveles que se encuentran en la sangre, por lo tanto se necesitan las plataforma tecnológicas de detección sensibles para la detección de biomarcadores en saliva.

A pesar de todo, el uso de la saliva en un entorno clínico está en aumento debido al aumento en los conocimientos de las nanotecnologías y también

gracias a las ventajas que tiene como resultado de la facilidad de la recolección salival con respecto a la sangre(23,30). La saliva es un buen medio debido a que cumple las exigencias de su colección es no invasivo y el proceso de donación está relativamente libre de estrés, así se podrían realizar si es necesario múltiples colecciones sin causar alguna molestia al donante, costos relativamente bajos asociados con la recogida de muestras y procesamiento, su almacenamiento, transporte y manejo no requiere de personal altamente capacitado ya que no coagula disminuyendo así las manipulaciones necesarias, también es seguro para el personal que maneja las muestras en comparación con la sangre ofreciendo un riesgo mínimo de contraer microorganismo infecciosos como el VPH y el VIH. Otra de las ventajas sumamente importante es que la recogida para el proceso de diagnóstico en poblaciones especiales en los que la sangre es difícil de recoger, es decir, con venas de acceso comprometido (por ejemplo, pacientes con uso de drogas inyectables), pacientes con hemofilia, lactantes, niños, ancianos y pacientes no cooperadores (19,23,24,30).

La saliva puede ser considerada ya sea como saliva específica de cada glándula o saliva en general, la recopilación y evaluación de las secreciones de las glándulas salivales individuales son principalmente útiles para la detección de alguna patología específica de la glándula, sin embargo se estudia con más frecuencia toda la saliva (saliva mezclada) para la evaluación de trastornos sistémicos(19).

La saliva contiene una gran cantidad de compuestos que pueden ser de carácter informativo para el seguimiento de la salud y el bienestar, la patogénesis de la enfermedad sistémica y oral. Las proteínas son los componentes más importantes de la saliva, el análisis completo y la identificación del contenido del proteoma salival es el primer paso hacia el

descubrimiento de nuevas moléculas en la saliva asociados a la salud o la enfermedad (24).

El proteoma de la saliva humana (HSP), es un análisis que se realiza para la identificación completa y cuantificación de las proteínas totales y sus modificaciones postraduccionales en la saliva humana. A través de estudios bioquímicos y de biología molecular de los genes y proteínas individuales se ha explicado las estructuras y la función de algunas proteínas salivales, sin embargo, sigue existiendo muchas proteínas salivales y sus funciones que se desconocen. Un análisis global de la saliva mejorará nuestra comprensión de la salud oral y la patogénesis de la enfermedad, y nos ayudará a construir una base sólida para la caracterización de biomarcadores salivales para el diagnóstico no invasivo de las enfermedades humanas(39).

Existen diferentes técnicas bioquímicas tradicionales que han sido utilizados en el trabajo del proteoma salival, algunas son, electroforesis en gel (2D SDS-PAGE), electroforesis capilar, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masa, inmunoensayos, análisis de la sonda y la lectina.

Existen varios estudios del análisis global de la saliva, y con el tiempo se identifican cada vez más proteínas. Por ejemplo en el año 2007 Schipper y sus colaboradores(40), identificaron aproximadamente 1100 proteínas en el total de la saliva humana (aproximadamente 650 en parótida y submandibular y aproximadamente 50 en la saliva de la glándula sublingual. En el 2008 Denny et al.(41) lograron identificar aproximadamente 1166 proteínas en la saliva ( 914 en parótida y 917 en la saliva submandibular y sublingual). Sin embargo un estudio reciente de muchos laboratorios han encontrado 2290 proteínas y aproximadamente el 27% de las proteínas del suero sanguíneo se encuentra también en la saliva humana. En la Figura 3

se representa el porcentaje de las proteínas identificadas en cada una de las glándulas salivales.

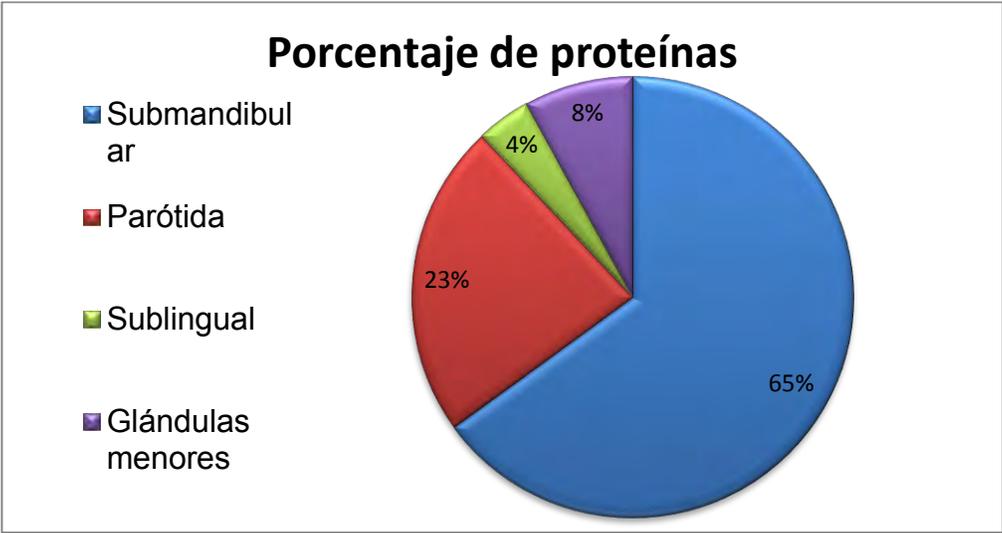


Figura 3. Porcentaje de las proteínas identificadas en cada uno de los 4 tipos de glándulas. Adaptado de (24)

### **2.3 Influencia de los métodos de recolección de saliva**

Para un estudio salival fiable, se tiene que normalizar la recogida de muestras, la preparación y los procedimientos de manejo son muy importantes para posteriores estudios de biomarcadores. Esto requiere esfuerzos de colaboración y protocolo estandarizados para la toma de la muestra, incluyendo el método, el dispositivo de recogida, horarios, la tasa del flujo salival, la preservación de proteínas y la preparación de la muestra(39).

Un estudio realizado por Esser y sus colaboradores(42), demostró que la degradación de las proteínas de la saliva total es muy rápido ya que las actividades proteolíticas juegan un papel importante en la modificación del proteoma salival después de su colección, una forma de reducir la degradación de las proteínas sería reduciendo el tiempo que transcurre entre la recogida de la muestra, el procesamiento y el almacenamiento, otra estrategia para minimizar la acción proteolítica es incluir inhibidor de proteasas, sin embargo su uso aumenta la complejidad de la muestra y podría traer interferencias en el análisis proteómico(30).

Las muestras de saliva frecuentemente en los proyectos de investigación, tienen que ser almacenados por largos periodos de tiempo antes de poder ser analizadas, por lo mismo, las muestras se recogen normalmente en hielo, se centrifugan para eliminar el material insoluble y se conserva a temperaturas inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Es importante que los tiempos de almacenamiento a largo plazo, la congelación múltiple y los ciclos de descongelación sean evitados, ya que puede causar que algunas proteínas se precipiten, revisado en(30).

La saliva puede ser recogida bajo dos condiciones, estimulada o no estimulada en reposo). El flujo salival puede ser estimulado por dos agentes importantes los cuales son, los estímulos gustativos y la estimulación masticatoria. Los estimulantes más utilizados son la masticación de cera parafina, bandas de goma, base de goma y la aplicación de  $0.1 - 0.2 \text{ mol/l}$

(aproximadamente una gota) de ácido cítrico en la lengua. También existen estimulantes eléctricos que han sido utilizados como ayudas terapéuticas en el tratamiento de pacientes con hipofunción de sus glándulas salivales (24,43). En cambio, la saliva no estimulada se define como la saliva recogida con ninguna fuente aparente de estimulación, ésta se puede recoger como toda la saliva o desde las glándulas individuales.

Las tasas de flujo salival pueden variar significativamente entre cada individuo y el mismo individuo bajo diferentes condiciones, la saliva no estimulada se ve afectada por muchos factores, la exposición de la luz, los estímulos olfativos, fármacos utilizados, la posición del cuerpo (lo ideal es recoger la saliva en una posición vertical, con la cabeza ligeramente inclinada hacia adelante con los ojos abiertos), la hiperhidratación y el más importante es el grado de hidratación de la persona, se ha reportado que una reducción de agua del 8% en el cuerpo, puede causar una reducción de hasta el 100% en la tasa del flujo salival. Cabe mencionar que las personas deben abstenerse de fumar y comer o beber durante unas horas. También se debe recordar que la tasa del flujo salival y la composición se ven afectadas por factores estacionales y diurnas, por lo tanto la hora del día para la recogida de la saliva debe ser estandarizada y la época del año debe ser considerado como un factor que puede influir en los estudios a largo plazo. Otros factores importantes que se deben tomar en cuenta en la saliva estimulada, es la duración de la estimulación y la naturaleza del estimulante (43).

Independientemente de que sea un método con saliva estimulada o no, las personas deben ser instruidos para enjuagarse la boca con abundante agua desionizada antes de la recolección, debe estar en la posición indicada, en reposo durante 5 minutos y minimizar los movimientos orofaciales, después se procede a la recolección de saliva, estos son los cuatro métodos mas comunes para la recogida de saliva total:

- Método de drenaje: la saliva gotea del labio inferior a un pesado tubo de ensayo graduado.
- Método de escupir: se acumula la saliva en el piso de boca y el sujeto lo escupe en el tubo de ensayo graduado, se repite cada 60 segundos.
- Método de succión: la saliva se aspira por un eyector o aspirador continuamente desde el piso de boca.
- Método absorbente: se recoge la saliva (absorbida) por un hisopo, rollo de algodón o una esponja, que es colocado en los orificios principales de los conductos de las glándulas.

Comparando estos métodos se observó que los métodos de succión y el absorbente, tienen un grado de estimulación y variabilidad, por eso no son recomendados para recolección de saliva no estimulada. En cambio el método de drenaje y el de escupir proporcionan la misma información en la saliva no estimulada(43).

También existen métodos de saliva en las glándulas individuales, mediante el uso de canulación de los conductos glandulares o por aplicación de dispositivos de recogida específicos a la zona de aparición de los conductos glandulares, sin embargo estos procedimientos son complejos, lentos y le quitarían la ventaja de la saliva de no ser invasiva, además que aquí si se requiere personal calificado(24). Lo que se espera es que los médicos e investigadores sigan una metodología estandarizada para la recolección de saliva para mejorar el valor de la saliva como una herramienta de diagnóstico (43).

### **3. Importancia de los biomarcadores en odontología**

A lo largo del trabajo hemos revisado que los biomarcadores son de suma importancia para prevenir, diagnosticar, pronosticar e incluso tratar diferentes enfermedades. El análisis salival es particularmente importante en la odontología. En el campo de la odontología muchos biomarcadores están en proceso de validación, otros ya se están empleando, en este apartado se mencionarán algunos ejemplos de las enfermedades más frecuentes en las que se ha empleado el uso de los biomarcadores.

#### **➤ En cáncer oral:**

El cáncer es un término general para un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, se produce por modificaciones en la información genética de las células, las cuales proliferan sin control formando tumores malignos que crecen de manera invasiva (44).

El cáncer oral (más del 90% son de células escamosas COCE) forma parte del grupo de cánceres de cabeza y cuello, es el sexto cáncer más común en todo el mundo, tiene un mal pronóstico, con una tasa de supervivencia a 5 años del 80% si se detecta el cáncer en estadio T1, pero si es detectado en etapas posteriores (T3 y T4) sólo es el 20-40% (23,45). El otro 10% de cáncer oral corresponde a melanomas, linfomas, sarcomas, adenocarcinomas de glándulas salivales y metástasis.

Puede desarrollarse en cualquier parte de la cavidad oral (labio, piso de boca, lengua, mucosa oral, encía, paladar duro, glándulas) y la orofaringe (base de lengua, región amigdalina, paladar blando, pared posterior de la faringe)(24). Sin embargo también tiene la capacidad de presentar metástasis que es la invasión del tejido adyacente al tumor primario, y la migración de las células malignas a órganos distantes.

La teoría de la etiología del cáncer más aceptada es que genéticamente el cáncer se produce por un proceso multisequencial que implica una serie de alteraciones discretas, irreversibles y complementarias en los genes que

controlan el crecimiento, la muerte y la diferenciación celular (46). Existen estudios que sugieren que se requiere de 6 a 10 alteraciones genéticas para que se produzca una transformación maligna de la mucosa oral (47). Aunque en general la etiología de COCE sigue desconocida, existen algunos factores de riesgo que posiblemente actúen como agentes carcinógenos capaces de desencadenarlo(46).

Podemos decir que existen factores de riesgo endógenos y exógenos, entre los endógenos se encuentra la edad (el 95% de cánceres ocurren en mayores de 40 años), sexo masculino (H:M 2:1), herencia, antecedentes de cáncer o lesiones precancerosas, enfermedades hepáticas, factores hormonales y algunas infecciones sistémicas como sífilis. Entre los factores de riesgo exógenos que se han identificado para el CO está la ingesta de alcohol y tabaco, maloclusiones, higiene oral defectuosa, infecciones localizadas (bacterianas, micóticas y virales como Papiloma Humano, Epstein Barr y Herpes simple), irritaciones en las mucosas, exposición a toxinas, exposición prolongada al sol, ingestión de comida caliente y/o condimentada, malnutrición, inmunosupresión, radiación, factores socioeconómicos, y factores de riesgo de tipo profesional, como exposición a fibras textiles, refinamiento del níquel y trabajo con madera. Revisado en(48). En cuanto a los signos y síntomas de esta enfermedad se puede decir que la manifestación esperada es una masa de crecimiento más o menos rápida, indurada, puede ulcerarse y sangrar, sin dolor, se puede observar manchas blancas (leucoplasias), rojas (eritropias) o cambio en color de los tejidos orales, úlceras durante más de 15 días, retraso de la cicatrización después de una extracción, sangrado anormal en algún lugar de la boca. Pueden aparecer síntomas como dificultad para deglutir, masticar, hablar, mover la mandíbula o la lengua, dolor, hormigueo, sequedad de boca, movilidad dental, otalgia, disfonía, disfagia, disnea, obstrucción nasal, epistaxis, entre otros (47,49,50).

El hecho de que el CO es normalmente indoloro, puede ser causante de un diagnóstico tardío, sin embargo este tipo de cáncer puede diagnosticarse a tiempo mediante revisiones periódicas o ante la presencia de uno o varios de los síntomas antes mencionados. El diagnóstico normalmente se auxilia de el análisis de biopsias, citología, laringoscopia directa y tomografía axial computarizada, sin embargo el estudio genético de biomarcadores se ha hecho más común, ya que permiten el desarrollo de estrategias para identificar y detectar la enfermedad cuando es una etapa muy temprana, lo que permite una intervención y una terapia eficaz.(39,46,47).

El uso de la saliva como fluido de diagnóstico y descubrimiento de biomarcadores para el cáncer oral de células escamosas es una herramienta sumamente importante debido a su naturaleza no invasiva y a su capacidad de detectar la enfermedad en etapas tempranas de cáncer e incluso etapas precancerígenas (51). Así podríamos enfrentar la alta morbilidad y mortalidad por esta enfermedad.

Existen diferentes tipos de técnicas para identificar biomarcadores para el diagnóstico del cáncer oral, actualmente no hay biomarcadores salivales validados en la clínica para el cáncer oral, sin embargo algunos estudios recientes han sugerido algunas proteínas salivales expresadas diferencialmente en la saliva de los pacientes con cáncer oral en comparación con los controles sanos que pueden ser útiles para el diagnóstico de ésta enfermedad. Entre estos están, Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, CD44, fibronectina, defensina-1, fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA21-1) antígeno de tejido polipéptido, y el antígeno del cáncer CA125(52).

En un estudio que se realizó en el 2009 por Shen Hu, a través de Western Blot y ELISA, se obtuvo satisfactoriamente 5 proteínas potenciales para ser biomarcadores en el COCE, estas proteínas son: Profilina, MRP14, Mac2BP, Catalasa y CD59 y tienen una sensibilidad y especificidad del 90% para la detección del cáncer oral(52).

A pesar de tantos descubrimientos y varios posibles biomarcadores en el diagnóstico de cáncer oral, estas proteínas no han sido validadas en la clínica con éxito, por lo mismo, es necesario saber la importancia de la capacidad de los biomarcadores de ser útiles en la detección de cáncer oral en una etapa temprana.

#### ➤ **Enfermedad periodontal**

La enfermedad periodontal es una infección crónica bacteriana que se caracteriza por la inflamación persistente, la descomposición del tejido conectivo y la destrucción del hueso alveolar (53). A lo largo del tiempo, en periodoncia ha sido un desafío determinar biomarcadores para la detección y la aparición temprana de la enfermedad, la evaluación de la actividad de la enfermedad y la eficacia terapéutica. Las medidas de diagnóstico tradicionales tales como la profundidad de bolsa, el nivel de inserción, índice de placa dentobacteriana, sangrado al sondaje y la evaluación radiográfica de pérdida ósea, nos proporcionan información para determinar la gravedad de la enfermedad, sin embargo algunos de estos a veces nos revelan falsos positivos.

Existen componentes salivares que han sido estudiados como potenciales biomarcadores de diagnóstico para la enfermedad periodontal (Tabla 3) incluyen principalmente proteínas. (54)

Biomarcadores proteómicos	
Alfa- glucosidasa	IgM
Fosfatasa ácida	Calicreina
Fosfatasa alcalina	Cininasa
Aminopeptidasa	Lactoferrina
Aspartato aminotransferasa	Lactotransferrina
Beta- galactosidasa	Lactato deshidrogenasa
Beta-glucosidasa	Lisozima
Beta-glucoronidasa	MMP-13
Calprotectina	MMP-8
Caprilato esteraseslipasa	MMP-9
Catepsina B	Mieloperoxidasas
CD14	Osteocalcina
Cistatinas	Osteonectina
Elastasa	Osteopontina
Factor de crecimiento epidérmico	Factor activador de plaquetas
Esterasa	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Fibronectina	Piridinolina telopéptido carboxiterminal reticulado
Gelatinasa	sIgA (Secretora)
IgA	Tripsina
IgG	Factor de crecimiento endotelial vascular

Tabla 3. Biomarcadores proteómicos para la enfermedad periodontal.

Adaptado de(54).

Los factores de virulencia de las bacterias provocan la degradación de los tejidos del huésped directa o activa una respuesta del huésped. El huésped inicia la liberación de mediadores biológicos de las células y cuando la cantidad es exagerada en comparación con el periodonto sano, comienza la destrucción del tejido (55). Entre estos mediadores incluyen proteasas, citoquinas, prostaglandinas, otras que son importantes participantes en la destrucción del tejido son enzimas derivadas de las bacterias como las que degradan el colágeno, elastasa, proteasas similares a la tripsina, aminopeptidasas. Podemos decir que enzimas derivadas de las bacterias, y otros mediadores inflamatorios parecen ser potenciales como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad periodontal(54).

Existen otros biomarcadores proteómicos específicos que han sido identificados por las 3 características clave de los procesos patogénicos en la enfermedad periodontal:

1. La inflamación
2. La degradación del colágeno.
3. El recambio óseo.

La respuesta del huésped es provocada por los lipopolisacáridos bacterianos y otros componentes y productos, como resultado, los leucocitos polimorfonucleares se activan y van hacia el sitio liberando numerosas citoquinas como la prostaglandina E2, TNF, interleucinas IL-1 e IL-6, como consecuencia de esto, las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que son potentes enzimas que destruyen el colágeno y se producen por el hueso alveolar liberan productos como la piridinolina telopéptido carboxiterminal reticulado que es una proteína que ha sido fuertemente correlacionada con enfermedades orales de reabsorción ósea como la periodontitis y la periimplantitis y su consecuente pérdida de soporte, ésta se transporta a través del líquido crevicular en la bolsa periodontal(54).

Como ya mencionamos las MMPs derivadas del huésped son considerados iniciadores principales de la degradación de la matriz extracelular asociada

con enfermedades periodontales, la MMP-1(colagenasa intersticial) y la MMP-8 (colagenasa derivada de leucocitos polimorfonucleares) son activadas en la periodontitis, aunque sólo la MMP-8 se relacionó con el estado periodontal y se ha utilizado como biomarcador en la periodontitis en cuestión de diagnóstico y la predicción de la progresión de la enfermedad. También se ha encontrado niveles altos en comparación de los controles sanos de MMP-2, MMP-3, MMP-9, IL-1 $\beta$  y TNF (54).

Un estudio que se encargó de perfilar inmunoglobulinas salivales de individuos diabéticos reveló que el papel protector para *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* es la IgA en la patogénesis de la enfermedad periodontal, lo que indica que las personas con niveles altos de IgA salival son propensas a la periodontitis.

➤ **Síndrome de Sjögren:**

El Síndrome de Sjögren (SS), fue descrito por primera vez en 1933 por el médico sueco Henrik Sjögren, es un trastorno crónico autoinmune caracterizado clínicamente por una sequedad de boca (xerostomía) y sequedad en los ojos (queratoconjuntivitis seca). La enfermedad afecta principalmente a mujeres con una proporción de 09:01 sobre la aparición de los hombres.

El SS se clasifica en SS primario que se produce solo y que un tercio de los pacientes con este tipo de SS desarrollan manifestaciones extraglandulares sistémicas, como el linfoma maligno(56), y SS secundaria presenta en conexión con otra enfermedad autoinmune, tales como artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico (LES)(57). El SS es una enfermedad poco conocida y compleja que puede ir sin diagnosticar durante varios meses o años.

Desafortunadamente hay una falta de biomarcadores de diagnóstico precoz y el diagnóstico se retrasa generalmente por la aparición de los síntomas. Un consenso internacional para el diagnóstico de SS requiere signos y síntomas

de sequedad, incluyendo un aspecto característico de una biopsia de la glándula salival mayor o menor, o la presencia de anticuerpos como anti-SSA. Lo que se busca es que el desarrollo de biomarcadores moleculares para el diagnóstico precoz del SS primario mejore la aplicación de terapias sistemáticas y también mejore la fijación de criterios con los que controlar las terapias y evaluar el pronóstico (por ejemplo, el desarrollo de linfoma)(57).

Se ha utilizado un enfoque proteómico y genómico combinado, y han descubierto un conjunto de productos génicos como  $\beta 2$ -microglobulina ( $\beta 2 m$ ), receptor soluble de IL-2, IL-6,(57) anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B y anti- $\alpha$  fodrina que pueden ser de carácter informativo para la detección primaria del SS, en otro estudio para biomarcadores en SS lograron indicar que el perfil de proteínas salivales SS es una mezcla de un aumento de las proteínas inflamatorias y la disminución de las proteínas acinares, en comparación con el patrón proteómicos de la saliva sana(58). Sin embargo, ninguno de ellos es individualmente suficientemente sensible o específico para utilizarse en el diagnóstico de SS. Por lo tanto, es importante usar enfoques proteómicos y genómicos emergentes para descubrir una amplia gama de biomarcadores informativos y discriminatorios que pueden combinarse para mejorar la sensibilidad y especificidad para la detección de SS primario. Aunque estos biomarcadores candidatos no se han validado, se puede decir que los marcadores salivales en esta enfermedad serían capaces de diferenciar el SS de otras enfermedades autoinmunes y así poder diagnosticarla a tiempo(39).

## **Conclusiones**

Un biomarcador es una herramienta ya sea de origen proteico o genético importante que tiene la capacidad de ofrecer información sobre el estado de salud o enfermedad de un individuo o una población, y son utilizados para la comprensión de diferentes enfermedades en varios aspectos como: el tratamiento, prevención, diagnóstico y progresión de la enfermedad, respuestas a la terapia, evaluación experimental toxicológica de medicamentos o pesticida, medición de riesgo ambiental y epidemiológico, además de evaluación de la intervención terapéutica entre otros.

La importancia que actualmente tienen los biomarcadores es el beneficio que se le da a la salud humana, si se logra una utilidad clínica constante y su integración a la práctica de rutina, se podría manejar la enfermedad con mayor facilidad y así mejorar la calidad de vida de las personas.

Cada vez es más frecuente e importante el uso de biomarcadores, gracias a su potencial, aunque desgraciadamente existen pocos biomarcadores validados en la clínica, el desarrollo tecnológico hace posible que los biomarcadores implementados sean cada vez más específicos para tener mayor información y elaborar estrategias y políticas correctivas para mejorar las condiciones de vida de los pacientes, y así poder disminuir la mortalidad y morbilidad de los individuos.

La saliva tiene el potencial de convertirse en una muestra diagnóstica de primera línea de elección, por eso los biomarcadores salivales son importantes y tienen algunas ventajas sobre los biomarcadores en suero que son los más utilizados.

Los biomarcadores en odontología son tan importantes como los biomarcadores para enfermedades sistémicas, así el odontólogo tendrá la facilidad de manejar las enfermedades de la cavidad oral con mayor precisión. Los biomarcadores salivales son de gran importancia en

odontología, ya que la saliva se encuentra en la cavidad oral y muchas de las moléculas de importancia se encuentran en la saliva e incluso están en contacto con la lesión.

## Referencias bibliográficas

1. Rentar M. Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecol. Mol.* 2000. p. 541–66.
2. Lock EA BJ. Biomarkers in translation: past, present and future. *Toxicology.* 2008;245(3):163–6.
3. Definitions B, Group W. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* [Internet]. 2001 Mar [cited 2013 Sep 19];69(3):89–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11240971>
4. Kurian S, Grigoryev Y, Head S, Campbell D, Mondala T, Salomon DR. Applying genomics to organ transplantation medicine in both discovery and validation of biomarkers. *Int. Immunopharmacol.* [Internet]. 2007 Dec 20 [cited 2013 Sep 23];7(14):1948–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2215739&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Gold P FS. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* 1965;121(439).
6. Gold P FS. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp Med.* 1965;122(467).
7. Allhoff EP, Proppe KH, Chapman CM, Lin CW PJG. Evaluation of prostate specific acid phosphatase and prostate specific antigen in identification of prostatic cancer. *J Urol.* 1983;129(2):315–8.
8. Kuriyama M, Wang MC, Lee CI, Papsidero LD, Killian CS, Inaji H E al. Use of human prostate- specific antigen in monitoring prostate cancer. *Cancer Res.* 1981;41(10):3874–6.
9. Chatterjee SK, Zetter BR. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol.* [Internet]. 2005 Feb;1(1):37–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16555974>
10. MJ B. Clinical practice. Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2001;344:1373.

11. Miki Y, Swensen J S-ED et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* (80-. ). 1994;266:66–71.
12. Wooster R, Bignell G LJ et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995;378:789–92.
13. Haye DF TA. c-ERBB-2 in breast cancer:development of a clinically useful marker. *Semin Oncol*. 2002;29(3):231–45.
14. Massod S BM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech*. 2002;59(2):102–8.
15. O'Brien PJ, Dameron GW, Beck ML, Kang YJ, Erickson BK, Di Battista TH et al. Cardiac Troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim Sei*. 1997;47(5):486–95.
16. Alpert JS, Thygesen K, Antman E BJ. Myocardial infarction redefined-a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(3):959–69.
17. Yilmaz A, Ece F, Bayramgurler B, Akkaya E BR. The value of Ca-125 in the evaluation of tuberculosis activity. *Respir. Med*. 2011;95:666–9.
18. Vandya JVVS y B. Biomarkers in medicine, drug discovery and environmental health. In: Jersey. JW and SN, editor. 1a ed. USA; 2010.
19. Kaufman E, Lamster IB. the Diagnostic Applications of Saliva-- a Review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*. [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2013 Sep 19];13(2):197–212. Available from: <http://cro.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/154411130201300209>
20. Ludwig J a, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. 2005 Nov [cited 2013 Sep 17];5(11):845–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239904>
21. Mandrekar SJ, Sargent DJ. Clinical trial designs for predictive biomarker validation: theoretical considerations and practical challenges. *J. Clin. Oncol*. [Internet]. 2009 Aug 20 [cited 2013 Sep 20];27(24):4027–34. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2734400&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

22. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx* [Internet]. 2004 Apr;1(2):182–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=534923&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Spielmann N, Wong DT. Saliva : diagnostics and therapeutic perspectives. 2012;17(4):345–54.
24. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin. Chem.* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Sep 19];57(5):675–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383043>
25. Riaz S, Alam SS, Akhtar MW. Proteomic identification of human serum biomarkers in diabetes mellitus type 2. *J. Pharm. Biomed. Anal.* [Internet]. 2010 Apr 6 [cited 2013 Sep 28];51(5):1103–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015604>
26. Ss A. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana Biomarkers for the evaluation of human health risks.
27. Li Y, John MARS, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RCK, et al. Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection. *J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2004;10(24):8442–50.
28. Hand AR. Salivary Glands. *Ten Cate's Oral Histol. Dev. Struct. Funct.* 6a Ed. USA: Mosby; 2003. p. 299–328.
29. Gartner, Leslie P E al. *Texto Atlas de Histología.* 3a Ed. México: Edit. McGraw-Hill; 2008. p. 413–7.
30. Schulz BL, Cooper-White J, Punyadeera CK. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Crit. Rev. Biotechnol.* [Internet]. 2013 Sep [cited 2013 Sep 25];33(3):246–59. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07388551.2012.687361>
31. Geneser F. *Histología.* 3a Ed. España: Panamericana, Edit.; 2000. p. 472–5.

32. Velayos JL. Anatomía de la cabeza con enfoque odontostomatológico. 2a Ed. España: Edit. Panamericana; 1998. p. 213–26.
33. Stack KM PA. Xerostomia:etiology and clinical management. *Nutr Clin Care*. 2001;4:15–21.
34. Nagler R. Salivary glands and the aging process: mechanistic aspects, health-status and medicinal-efficacy monitoring. *Biogerontology*. 2004;5:223–33.
35. Almeida PDV de. Saliva Composition and Functions : A Comprehensive Review. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2008;9(3):72–80.
36. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of dental caries. *Illions:Quintessence books*. 2000;2.
37. WM E. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J*. 1992;172(8):305–12.
38. Diagnostica N, Nella CE, Biologica R. \* Borsista, Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria. 295. 2002;XXII:295–311.
39. Hu S, Loo J a, Wong DT. Human saliva proteome analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* [Internet]. 2007 Mar [cited 2013 Sep 27];1098:323–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435138>
40. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch. Oral Biol.* [Internet]. 2007 Dec [cited 2013 Sep 27];52(12):1114–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692813>
41. Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, et al. The Proteomes of Human Parotid and Submandibular / Sublingual Gland Salivas Collected as the Ductal Secretions research articles. 2008;1994–2006.
42. Esser D, Alvarez-Llamas G, de Vries MP, Weening D, Vonk RJ, Roelofsen H. Sample Stability and Protein Composition of Saliva: Implications for Its Use as a Diagnostic Fluid. *Biomark. Insights* [Internet]. 2008 Jan;3:25–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2688372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

43. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993;694:72–7.
44. Karp G. *Biología Celular y Molecular*. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2001. p. 671.
45. Rethman MP, Carpenter W, Cohen EE, Epstein J, Evans CA, Flaitz CM et al. Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas. *J Am Dent Assoc.* 2010;141:509–20.
46. García García V, González-Moles MA BMA. Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. *Av. Odontoestomatol.* 2005;21(6):287–95.
47. Chimenos E, Font I LJ. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004;9:377– 84.
48. Cuevas B, Cuevas RZ. Identificación de factores y marcadores moleculares de riesgo para cáncer oral. 2008. p. 138p. Presentada en la Universidad Veracruzana.
49. E D la R. Manual para la detección de alteraciones de la mucosa bucal y lesiones premalignas. Secretaría de Salud; 2003. p. 1,15–23. Este documento está realizado conforme al Título VI, Capítulo II Artículo 148 de la Ley Federal del Derecho de Autor. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de julio de 2003
50. Philip SJ, Eversole LR WP. *Patología oral y maxilofacial*. España: Edit. Harcut; 1998. p. 174–95.
51. Dowling P, Wormald R, Meleady P, Henry M, Curran A CM. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. *J Proteomics.* 2008;71:168–75.
52. Hu S, Wong DTW I. Salivary protein biomarkers for human oral cancer. WIPO patent publication no WO/2009/055820; 2009.
53. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4:1–6.
54. Zhang L, Henson BS, Camargo PM, Wong DT. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol.* 2000

[Internet]. 2009 Jan;51:25–37. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878467>

55. Haffajee AD SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000*. 2005;38:9–12.
56. Ioannidis JP, Vassiliou VA MH. Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2002;46:741–7.
57. Hu S, Wang J, Meijer J, leong S, Xie Y, Yu T, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. [Internet]. 2007 Nov [cited 2013 Oct 16];56(11):3588–600. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2856841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
58. Ryu OH, Atkinson JC, Hoehn GT, Illei GG, Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)*. [Internet]. 2006 Sep [cited 2013 Oct 15];45(9):1077–86. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522680>