



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA
SALIVA DE MUJERES MEXICANAS, PARA LA
PROBABLE IDENTIFICACIÓN DE
BIOMARCADORES ASOCIADOS AL
ENVEJECIMIENTO. ESTUDIO PILOTO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

LIZETH DORANTES GÓMEZ



DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. LORENA ROMERO SALAZAR
DR. RAÚL ROSALES IBÁÑEZ**

ABRIL 2019

A los cinco importantes pilares de mi vida
que han estado conmigo durante todo este recorrido.

*“Success is not final, failure is not fatal.
It is the courage to continue that counts.”*

Winston Churchill

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Biotecnología y biomarcadores	9
2.2. Fluidos corporales	9
2.3. Fisiología de la saliva	11
2.3.1. Composición de la saliva	12
2.3.2. Funciones de la saliva	12
2.4. Saliva como una matriz opcional para el diagnóstico.....	13
2.4.1. Proceso de evaluación de biomarcadores	14
2.5. Características fisicoquímicas de la saliva que fungen como biomarcadores 16	
2.5.1. Sialometría.....	16
2.5.2. Escala de acidez pH	18
2.5.3. Concentración total de proteínas	19
2.5.4 Viscosidad	20
2.6. Cambios en las características salivales relacionados con la edad	26
CAPÍTULO 3. MARCO EXPERIMENTAL.....	29
3.1. Diseño del estudio	29
3.2. Variables de estudio	30
3.3. Toma de muestras de saliva	31
3.4. Mediciones salivales	31
3.4.1. Sialometría.....	32
3.4.2. Escala de acidez pH	32
3.4.3. Concentración total de proteínas	33
3.4.4. Viscosidad	34
3.5. Análisis estadístico	35
CAPÍTULO 4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	36
4.1. Resultados experimentales	36
4.1.1. Sialometría.....	36

4.1.2. Escala de acidez pH	41
4.1.3. Concentración total de proteínas	43
4.1.4. Viscosidad	45
4.1.5. Correlaciones.....	59
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	62
CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS	65
CAPÍTULO 7. ANEXOS	67
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....	69
Agradecimientos.....	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Ejemplos de enfermedades no infecciosas con cambios identificables en la saliva, agrupados según el tipo de enfermedad y ordenados alfabéticamente. Modificado de lo reportado por Cuevas *et al* [43].

Cuadro 2.1. Grado de relevancia clínica de algunos biofluidos humanos agrupados en columnas y ordenados alfabéticamente. Modificado de lo reportado por Feig [34].

Cuadro 3.1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación considerados en el presente trabajo para la selección de las participantes.

Cuadro 3.2. Operacionalización de las variables estudiadas en el presente trabajo.

Cuadro 4.1. Distribución de la población estudiada según edad y consumo promedio de agua al día.

Cuadro 4.2. Estadística descriptiva del flujo salival (ml/min) para cada grupo evaluado.

Cuadro 4.3. Estadística descriptiva del pH al momento de la valoración para cada grupo evaluado.

Cuadro 4.4. Estadística descriptiva de la concentración de proteínas totales (mg/ml) salivales para cada grupo evaluado.

Cuadro 4.5. Estadística descriptiva de la viscosidad salival (mPa·s) en la aceleración de 300 a 1000 (1/s) para cada grupo evaluado.

Cuadro 4.6. Valores de ajuste lineal de los datos de viscosidad con en la aceleración. Reología a cizallamiento de aceleración constante (0-300 1/s).

Cuadro 4.7. Valores de ajuste lineal de los datos de viscosidad con en la aceleración. Reología a cizallamiento de aceleración constante (300 a 1000 1/s).

Cuadro 4.8. Estadística descriptiva de la viscosidad salival (mPa·s) en la desaceleración de 1000 a 300 (1/s) para cada grupo evaluado.

Cuadro 4.9. Valores de la correlación para las variables evaluadas de ambos grupos.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales causas de mortalidad en el año 2016 para cada gran grupo de edad de mujeres considerado por el INEGI en México. Fuente: construcción realizada en base a los datos del INEGI [11].

Figura 2.1. Vista lateral del rostro mostrando la ubicación de las glándulas salivales mayores humanas [65].

Figura 2.2. Resumen de algunas de las diversas funciones de los componentes salivales. Modificado de Dawes [68]; Ngamchuea [69].

Figura 2.3. Proceso de descubrimiento y validación de biomarcadores de cáncer, según la guía desarrollada por la EDRN del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Fuente: construcción realizada en base a lo descrito por la EDRN [80].

Figura 2.4. Representación de un líquido entre dos placas para ilustrar el término de viscosidad. Fuente: elaboración propia.

Figura 2.5. Representación del comportamiento de distintos tipos de fluidos según la ley de Newton. Fuente: elaboración propia.

Figura 2.6. Geometría de un reómetro rotativo de cono-placa con el radio R y el ángulo de cono α señalados; el cono gira mientras la placa inferior está estacionaria. Fuente: elaboración propia.

Figura 3.1. Recolección de saliva haciendo uso del método de babeo pasivo.

Figura 3.2. Procesamiento de las dos muestras de saliva obtenidas de cada participante. Fuente: elaboración propia.

Figura 3.3. Determinación del peso del tubo y de la escala de acidez pH. a) Tubo colocado en la balanza analítica para obtener su peso; b) Tiras para estimación de acidez pH salival. En la parte superior una tira nueva y en la inferior una tira después de entrar en contacto con la muestra de saliva.

Figura 3.4. Tubos con CBBG para determinar la concentración de proteínas totales en la saliva utilizando el método de Bradford. De lado izquierdo el colorante antes y de lado derecho, el colorante después de interactuar con la muestra de saliva.

Figura 3.5. Procesamiento reológico de muestras. De izquierda a derecha: muestra en el centro de la placa del reómetro, acercamiento del mismo paso y reómetro con cubierta para evitar salpicaduras y en posición de adquisición de datos.

Figura 4.1. Distribución de las participantes de acuerdo al flujo salival (ml/min) de a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

Figura 4.2. Diagrama de caja y bigotes con la comparación del flujo salival (ml/min) por grupo al momento de la valoración.

Figura 4.3. Distribución de las participantes de acuerdo al pH promedio al momento de la valoración para a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

Figura 4.4. Distribución de las participantes de acuerdo a la concentración promedio de proteínas salivales totales (mg/ml) al momento de la valoración para a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

Figura 4.5. Diagramas de caja con la comparación de la concentración de proteínas totales (mg/ml) entre los grupos estudiados.

Figura 4.6. Distribución de las participantes de acuerdo a la viscosidad (mPa·s) en la aceleración obtenida al momento de la valoración para a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

Figura 4.7. Curvas de flujo de las muestras de saliva para cada grupo, durante la rampa de aceleración constante de 0 a 300 1/s para a) grupo 1 y b) grupo 2.

Figura 4.8. Curvas de flujo de las muestras de saliva para cada grupo, durante la rampa de aceleración constante de 300 a 1000 1/s para a) grupo 1 y b) grupo 2.

Figura 4.9. Curvas de flujo de las muestras de saliva para cada grupo, durante la rampa de aceleración constante de 0 a 1000 1/s para a) grupo 1 y b) grupo 2.

Figura 4.10. Curvas de viscosidad salival de las participantes del a) grupo 1 y b) grupo 2. Reología a cizallamiento de aumento constante (0–1000 1/s).

Figura 4.11. Distribución de las participantes de acuerdo a la viscosidad (mPa·s) en la desaceleración para el a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

Figura 4.12. Curvas de flujo de las muestras de saliva para cada grupo, durante la rampa de desaceleración constante de 1000 a 0 1/s para a) grupo 1 y b) grupo 2.

Figura 4.13. Diagramas de caja y bigotes con la comparación de la viscosidad (mPa·s) entre los grupos estudiados en a) la aceleración de 300 a 1000 1/s y, b) la desaceleración de 1000 a 300 1/s.

Figura 4.14. Diagrama de correlación de Pearson entre las variables analizadas para ambos grupos, donde se encuentran reportados los valores de r .

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

Las principales enfermedades que ocasionan morbilidad y mortalidad tienen una causa en común: el envejecimiento. El envejecimiento es un proceso heterogéneo que ocurre cuando un organismo deja de crecer y se caracteriza por una disminución progresiva del funcionamiento en todos los niveles, incluyendo células, tejidos y órganos, que conducen a una reducción en la adaptabilidad de los seres humanos a su entorno [1–6].

México experimenta un intenso proceso de envejecimiento demográfico, pues transita de una población joven a una más envejecida. Esto implica que la proporción de personas de la tercera edad aumenta más rápidamente que cualquier otro grupo de edad. De acuerdo con el Consejo Nacional de Población (CONAPO), en 2015, de cada diez mexicanos tres eran menores de 15 años (27.6%) y sólo uno de 60 años o más (10%). Sin embargo, se prevé que para el año 2050 esta composición se vea profundamente alterada, pues en la población habrá una proporción casi idéntica de jóvenes de menos de 15 años (20.7%) y de adultos mayores (21.5%) [7].

Aunado a lo anterior, el envejecimiento conlleva una especificidad de género, puesto que en todas las entidades federativas la población adulta femenina de mujeres de 60 años o más, es mayor a la masculina [7]. La población femenina se enfrenta, paradójicamente a una peor calidad de vida, ya que existe una mayor prevalencia de enfermedades relacionadas con la edad, en particular enfermedades degenerativas y, en consecuencia, un aumento de la discapacidad [1].

Varios factores, como las hormonas sexuales, los genes codificados en los cromosomas sexuales y los comportamientos relacionados con el género, podrían contribuir a las diferencias observadas en la incidencia de enfermedades crónicas y autoinmunes. Por esto, se vuelve prioritario ampliar la comprensión respecto a los cambios relacionados con el aumento de la edad y el género [8,9], mediante la evaluación de las características fisiológicas de la población joven sana en la

primera mitad del ciclo vital, antes de que desarrollen enfermedades [2,4,8]. El objetivo de este enfoque de investigación no es aumentar la longevidad humana, sino la longevidad libre de discapacidad y dependencia funcional [4].

Considerando que en 35 años, la población de 60 años o más comprenderá una fracción mayor al 20% de los habitantes de México [7], esta tesis se enfocó en la población femenina de entre 15 y 59 años, pues en 2015, equivalía al 63% de la población total de mujeres del país, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) [10].

En la figura 1.1. se reportan las principales causas de mortalidad para las mujeres en este rango de edad y se puede observar que las padecimientos crónicos relacionados con la edad, como las enfermedades del corazón, la diabetes *mellitus* y el cáncer, son las que presentan tasas más altas de mortalidad después de los 35 años [11]. Estas afecciones patológicas, así como la periodontitis y la artritis reumatoide, por mencionar sólo algunas, están determinadas, al menos en parte, por algunos mecanismos, como el estrés oxidativo, la inflamación, la senescencia y muerte celular [1].

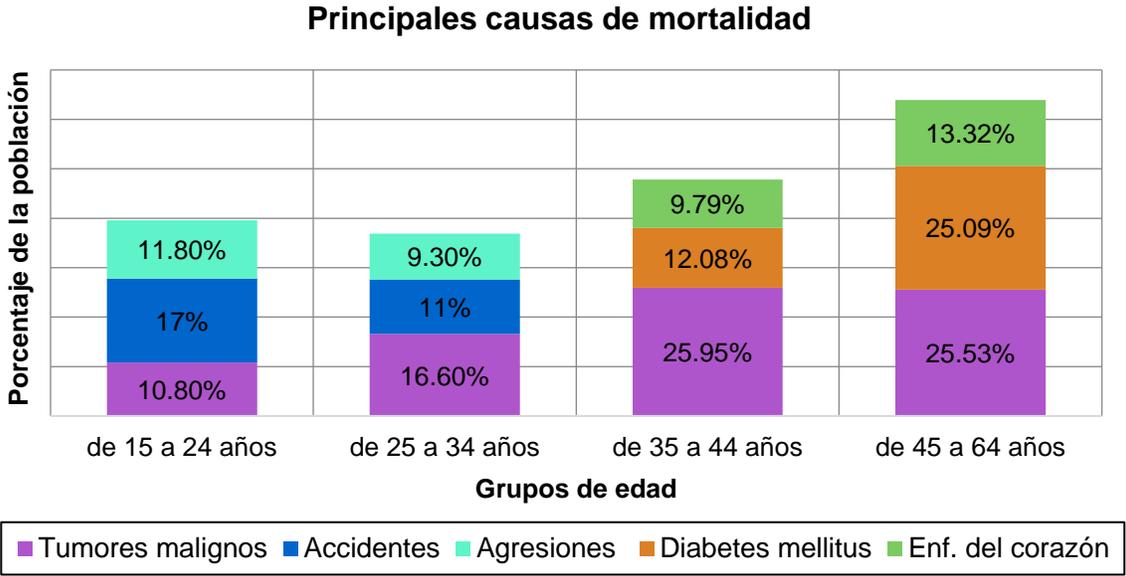


Figura 1.1. Principales causas de mortalidad en el año 2016 para cada gran grupo de edad de mujeres considerado por el INEGI en México. Fuente: construcción realizada en base a los datos del INEGI [11].

La mayoría de estas enfermedades representan un gran desafío debido a que no se detectan hasta una fase tardía donde los síntomas mórbidos se hacen evidentes [12], por ello, ha crecido el interés en torno al uso de herramientas de análisis como los biomarcadores [1,13], que revelan una problemas médicos antes de que la enfermedad se complique [14] y que se han manejado extensivamente con el adelanto persistente de la biotecnología [13].

La biotecnología se define como “la aplicación de la ciencia y la tecnología a los organismos vivos, así como a sus partes, productos y modelos, para alterar los materiales vivos o no vivos para la producción de conocimiento, bienes y servicios” [15,16]. Particularmente, en la presente tesis se abordaran temas relacionados con la biotecnología médica (también llamada roja) [17]. Algunas de las aplicaciones sobresalientes de los últimos años, han sido realizadas en áreas que se han ramificado de la biotecnología médica como la medicina molecular, la medicina regenerativa y la medicina personalizada [18]. Esta última tiene como objetivo principal “mejorar la estratificación y el tiempo de atención a la salud utilizando información biológica y biomarcadores” [19], siendo estos últimos, el objeto de estudio de esta tesis.

Un biomarcador como acrónimo de marcador biológico, se define como “una característica determinada que se utiliza como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a una exposición o intervención, incluidas las intervenciones terapéuticas” [20]. Dentro de la literatura, se puede encontrar una diferenciación entre los biomarcadores denominados clásicos y los nuevos [21].

Los biomarcadores clásicos o macroscópicos son las manifestaciones clínicas, desde el pulso y la presión arterial hasta pruebas de laboratorio de sangre y otros tejidos. Algunos ejemplos cotidianos son los niveles de glucosa en sangre de personas con diabetes *mellitus* o el lactato en sangre después del ejercicio [21–23]. En cambio, los marcadores nuevos o microscópicos, están vinculados al rápido crecimiento de la biología molecular y la tecnología en los laboratorios [23,24]. También pueden ser llamados biomarcadores moleculares y son cualquier

alteración molecular específica de una célula [21,25,26]. Tanto muestras de tejido sólido como de fluidos corporales, pueden ser aptas para emplearse como biomarcadores o ser el medio de detección de estos [27,28].

Los biomarcadores se desarrollan para muchos propósitos diferentes, un ejemplo es la clasificación y predicción de enfermedades. En este trabajo, se consideran los que pertenecen a la primera categoría, que incluye los marcadores de diagnóstico, detección y pronóstico [29]. Asimismo, se hace énfasis, en los marcadores de detección, es decir, aquellos que se usan en personas asintomáticas para detectar una enfermedad o afección en una etapa temprana [29]. Estos también se denominan de “prevención secundaria”, pues están dirigidos a evitar las consecuencias involucradas con el desarrollo de enfermedad avanzada, en términos de muerte y discapacidad [30].

En la mayoría de los casos, cuanto antes se detecta y diagnostica una enfermedad, es más probable que se cure o controle con éxito. El manejo de una enfermedad, en especial, en etapas tempranas, puede reducir drásticamente la gravedad de su impacto en la vida del paciente, o prevenir y/o retrasar las complicaciones posteriores [14]. Los programas ideales de detección deberían ser no invasivos, de bajo costo, y conducir definitivamente a una reducción de la morbilidad y la mortalidad [28].

No obstante, para la detección y diagnóstico de las principales causas de mortalidad mencionadas anteriormente, se utilizan procedimientos invasivos, como las biopsias centrales utilizadas para la confirmación del diagnóstico de cáncer [31], o caros, como las tecnologías de imágenes, que son utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad arterial coronaria (principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes) [32].

Considerando lo anterior, en los últimos años se ha propuesto el uso de biofluidos, porque, en comparación con las biopsias, pueden recolectarse de manera menos invasiva y las pruebas son relativamente más económicas [33,34].

La sangre sigue siendo el material de diagnóstico más utilizado. Desafortunadamente, la extracción de sangre es un procedimiento invasivo que puede implicar cierto riesgo para la salud del personal médico y los pacientes, así como una gran incomodidad para muchos grupos de pacientes. Por lo tanto, muchos investigadores han recomendado la saliva como el material de diagnóstico ideal no invasivo [35], debido, principalmente a sus características excelentes de muestreo, ya que puede ser recolectado sin dolor, fácilmente por los pacientes o el personal de atención médica, no requiere el uso de agujas eliminando la probabilidad de infecciones transmitidas por la sangre y mejora la conformidad del paciente [36–38], evitando las molestias transitorias, infección en el sitio de venopunción y hematomas [39].

Una de las barreras para la adopción generalizada de métodos de diagnóstico salival, provenía del alto costo y la poca velocidad de la tecnología involucrada [40]. Sin embargo, gracias al rápido desarrollo de técnicas de análisis, actualmente se puede relacionar la presencia o el cambio en las concentraciones de componentes salivales con el diagnóstico de enfermedades y el análisis del estado de salud general [41]. Además, en el pasado, los científicos estaban más interesados en estudiar las funciones biológicas de la saliva en la boca que en tratar de evaluar su posible papel como indicador de enfermedades sistémicas u orales. No obstante, gracias al uso de la saliva en el diagnóstico de la enfermedad cardíaca, las enfermedades autoinmunes y que en 2012, la *Food and Drug Administration* (FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos, por sus siglas en inglés) aprobara el primer kit de autodiagnóstico en el hogar, sin receta, que utiliza una muestra oral para la detección rápida de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha demostrado que la saliva puede ser una ayuda útil para el diagnóstico clínico y ha llamado la atención sobre las posibilidades de detección de otras enfermedades a través del análisis salival [40,42]. Otros ejemplos de enfermedades que pueden ocasionar cambios salivales se mencionan en el cuadro 1.1.

Enfermedades no infecciosas detectables en la saliva

Cáncer	Mentales	Sistema inmunológico
de cabeza y cuello de glándula salival de hígado de mama de ovarios de páncreas de pulmón gástrico oral	Anorexia nerviosa	Enfermedades reumáticas
	Ansiedad	Síndrome de Sjögren
	Autismo	Hereditarias
	Depresión	Fibrosis quística
	Sistema endocrino	Sistema cardiovascular
	Diabetes mellitus tipo 2	Enfermedad del corazón
	Síndrome metabólico	Hipertensión

Cuadro 1.1. Ejemplos de enfermedades no infecciosas con cambios identificables en la saliva, agrupados según el tipo de enfermedad y ordenados alfabéticamente. Modificado de lo reportado por Cuevas *et al* [43].

Asimismo, la saliva ha sido evaluada para el monitoreo de fármacos terapéuticos; para la detección de alcohol, drogas terapéuticas e ilícitas; análisis hormonales; pruebas genéticas y de paternidad [41]. Estos avances han hecho evidente las numerosas formas de usar la saliva como un fluido con valor diagnóstico; preciso y útil en la evaluación de afecciones orales y sistémicas, que se manifiestan por trastornos en la secreción y en la composición, así como cambios en los parámetros químicos y físicos [43,44]. Por ello, en la última década se ha desarrollado un creciente interés en la investigación de las propiedades químicas, es decir la sialoquímica, y físicas de la saliva, como la sialometría, que es el análisis del flujo salival [43,45].

Por todo lo anterior, en esta tesis se planteó la evaluación de las características fisicoquímicas de la saliva como el flujo, el pH, la viscosidad y la concentración total de proteínas en la población femenina adulta, aparentemente sana, que no presentara signos visibles o síntomas relacionados a enfermedades crónicas. De este modo, se tendrían características fisicoquímicas de referencia en individuos sanos, necesarias para su comparación con individuos enfermos en estudios posteriores. Las edades de los dos grupos de estudio, son similares a los previamente reportados por Nagler *et al.* [46].

La hipótesis que planteamos en este estudio piloto, es que los indicadores cuantitativos de la saliva para dos grupos de mujeres, grupo 1 de 18 a 29 años y

grupo 2 de 30 a 59 años, muestran diferencias; para el grupo 2 se presentará menor flujo salival, menor pH, mayor viscosidad y mayor concentración de proteínas totales.

El objetivo general propuesto para comprobar esta hipótesis, fue realizar la caracterización fisicoquímica de la saliva de mujeres mexicanas, entre 18 y 59 años de edad, con el propósito de utilizar dicha información para la posible identificación de biomarcadores asociados con el envejecimiento; mediante la adecuación de una metodología de toma de muestras considerando lo previamente reportado por Navazesh y Kumar [47], Foglio-Bonda *et al.* [48], Vibhakar *et al.* [49] y Alves *et al.* [50], a las condiciones del laboratorio. Asimismo, se elaboró un protocolo de caracterización de las muestras a través de la medición de flujo salival, pH, viscosidad y contenido de proteínas utilizando de referencia las metodologías reportadas por Navazesh y Kumar [47]; Ueno *et al.* [51] y Sajewicz *et al.* [52]; Hussein *et al.* [53]; Justino *et al.* [54]; respectivamente.

Además, para el correcto manejo de la información y muestras proporcionadas por los participantes de este proyecto se contó con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Anexo 7.1.) y del Comité de Ética en Investigación del Centro de Investigaciones Médicas (CICMED), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx) (Anexo 7.2.).

La pertinencia de la propuesta se justifica, puesto que en la revisión bibliográfica no se halló ningún trabajo que considerara esta caracterización fisicoquímica de la saliva en población femenina mexicana. Aunado a lo anterior, los reportes clínicos y científicos no han logrado reportar rigurosamente los cambios salivales cuantitativos y cualitativos debido a la falta de estandarización en los métodos de recolección de saliva [44], lo cual dificulta la comparación de resultados entre estudios.

Por lo tanto, esta tesis presenta un panorama general respecto al uso de la saliva como medio de probable detección de enfermedades asociadas con el envejecimiento. En el siguiente capítulo, se hablará de los biomarcadores y las fases

involucradas en la investigación de biomarcadores; de cómo la saliva puede fungir como matriz de análisis y los cambios que ocurren conforme la edad avanza relacionados con las características salivales. En el capítulo tres se presentan las técnicas y procedimientos utilizados para el análisis de las propiedades fisicoquímicas de la saliva. Los resultados, su análisis y discusión se presentan en el capítulo cuatro. Por último, las conclusiones y perspectivas que surgieron de la elaboración de este trabajo se encuentran en el capítulo cinco y seis respectivamente.

CAPÍTULO 2.

MARCO TEÓRICO

2.1. Biotecnología y biomarcadores

La biotecnología médica, mediante el desarrollo de múltiples tecnologías y productos para el cuidado de la salud, ha permitido mejorar y aumentar la expectativa de vida [18]. Por medio de la medicina personalizada, tiene el potencial de permitir que los individuos reciban diagnósticos más tempranos, evaluaciones de riesgo y tratamientos óptimos. Manteniendo la promesa de mejorar la atención médica y al mismo tiempo reducir los costos [55].

Una herramienta importante en el camino hacia personalizar la medicina, es incluir en el proceso de toma de decisiones a los biomarcadores [27], mediante un enfoque macro-microscópico, con la integración de información clínica y molecular para proporcionar un enfoque eficaz, objetivo y repetible, que proporcione la viabilidad y la solidez para la detección y diagnóstico diferencial de enfermedades [23]. Sin embargo, algunos obstáculos, son la ausencia de métodos de recolección de muestras poco costosos y la falta de biomarcadores definidos para enfermedades específicas. Afortunadamente, estas limitaciones se pueden superar analizando la saliva [12] y, estos aspectos se abordarán en las siguientes secciones.

2.2. Fluidos corporales

Actualmente existe un gran interés en el estudio y búsqueda de biomarcadores en los fluidos corporales humanos, también conocidos como biofluidos, biomedios o fluidos biológicos. Estos términos se usan a menudo de manera intercambiable y hacen referencia a los líquidos producidos y secretados por las células del cuerpo [33] que contienen aproximadamente 40% del agua del cuerpo humano [34].

Los biofluidos se excretan, secretan o suministran desde el cuerpo y poseen diferentes características y composiciones, y gracias a esto se consideran entidades capaces de diagnosticar y predecir el curso de un amplio rango de enfermedades [56–58]. En el cuadro 2.1. se resume el nivel actual de aplicaciones que tienen algunos los biofluidos [34].

Relevancia clínica de algunos biofluidos

Utilizado en la rutina clínica	Aumento de relevancia clínica	Sin relevancia clínica todavía
Espudo Heces Líquido amniótico Líquido cerebroespinal Orina Plasma Saliva Sudor	Bilis Flujo peritoneal Humor vítreo Lagrimas Líquido sinovial Mucosa nasal Pus Sangre menstrual	Cerumen Fluido cervicovaginal Humor acuoso Linfa Líquido de revestimiento epitelial Perilinfia Reuma Sebo

Cuadro 2.1. Grado de relevancia clínica de algunos biofluidos humanos agrupados en columnas y ordenados alfabéticamente. Modificado de lo reportado por Feig [34].

El suero es el fluido más utilizado en la práctica clínica y es el componente líquido que queda si la sangre se deja coagular. El suero difiere del plasma en que carece de los componentes sólidos y los factores de coagulación, pero retiene los electrolitos y las proteínas solubles, incluidos los anticuerpos [59]. El plasma representa aproximadamente el 55% del volumen total de sangre. Se compone principalmente de agua (92% en volumen) y contiene proteínas disueltas (6-8%), glucosa, lípidos, iones minerales, hormonas y dióxido de carbono. Es ligeramente opalescente y su color amarillo pálido es causado por la presencia de pigmentos, formados por la descomposición de los eritrocitos [60,61].

Pese a su amplio uso, la recolección de muestras de sangre es un procedimiento invasivo que puede implicar cierto riesgo para la salud del personal médico y de los pacientes, como infecciones por VIH o el virus de la hepatitis B. En los pacientes, puede ocasionar molestias transitorias, hematomas, infección en el sitio de venopunción o anemia, si se requieren grandes volúmenes. La recolección de sangre también es menos favorecida en investigaciones que involucran niños u otros sujetos de investigación para quienes el acceso venoso sea difícil, como ancianos o enfermos graves. Conjuntamente, las muestras de sangre necesitan procesamiento adicional para la eliminación de proteínas plasmáticas [35,39,58,62].

En contraste, la saliva se considera un medio circulante, con mayor disponibilidad que la sangre y es un fluido de monitoreo en tiempo real, dado que las secreciones

de las glándulas salivales exocrinas son representativas del estado de salud de un individuo en el momento de la recolección [63].

2.3. Fisiología de la saliva

La saliva como sinónimo de “fluido oral”, se utiliza para describir la combinación de líquidos que hay en la boca [64]. Es un fluido corporal acuoso accesible, que recubre constantemente las membranas mucosas de la boca, la garganta y la laringe. Es una secreción mucinosa-serosa clara, compuesta de varios electrolitos, pequeñas sustancias orgánicas, proteínas, péptidos y polinucleótidos provenientes principalmente de las glándulas salivales [44,65].

El sistema de glándulas salivales humano se puede dividir en dos grupos exocrinos distintos. Los tres pares de glándulas salivales mayores: parótidas, submandibulares y sublinguales, y las glándulas salivales menores que se encuentran por toda la mucosa oral, a excepción de las encías y la parte anterior del paladar duro [64]. Se observa la ubicación de los pares de glándulas mayores en la figura 2.1.

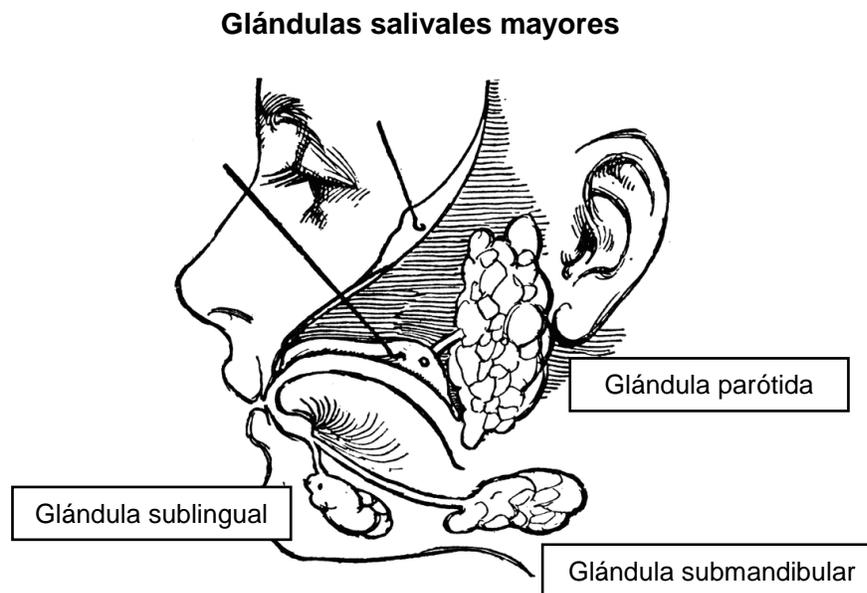


Figura 2.1. Vista lateral del rostro mostrando la ubicación de las glándulas salivales mayores humanas [66].

Alrededor del 65% de la saliva en reposo proviene de la glándula submandibular, el 25% de la glándula parótida, el 4% de la glándula sublingual y el resto de las glándulas salivales menores [44,63].

2.3.1. Composición de la saliva

La saliva está compuesta por las secreciones de las glándulas salivales y por una mezcla de pequeñas partículas alimentarias, secreciones del fluido gingival, secreciones de las glándulas sebáceas y otras sustancias procedentes de la vía aérea superior y la orofaringe [64,67,68]. Asimismo, incluye: virus, hongos, bacterias, metabolitos bacterianos, células epiteliales exfoliadas, leucocitos, transudado mucoso, secreciones bronquiales y nasales expectoradas, reflujo gastrointestinal, derivados séricos y sanguíneos de heridas orales y otros componentes celulares [23,38,46]; además de gases disueltos como el dióxido de carbono y el oxígeno [33].

2.3.2. Funciones de la saliva

Los componentes presentes en la saliva desempeñan varias funciones vitales y se resumen en la figura 2.2.

Algunas de las funciones más destacables son: la humectación o lubricación y protección de la mucosa oral [35,44,69]; el transporte de sustancias de sabor, la digestión y la detección de olores [69,70]; la acción de amortiguación [71] y la protección de la integridad dental [41].



Figura 2.2. Resumen de algunas de las diversas funciones de los componentes salivales. Modificado de Dawes [69]; Ngamchuea [41].

2.4. Saliva como una matriz opcional para el diagnóstico

La saliva posee características ideales de muestreo, ya que, puede ser recolectada fácilmente y sin dolor por los pacientes o el personal de atención médica; no requiere el uso de agujas, por lo que elimina la probabilidad de infecciones transmitidas por la sangre y mejora la conformidad del paciente [36–38], evitando las molestias transitorias, infección en el sitio de venopunción y hematomas [39], además, permite el muestreo múltiple por paciente [72]. Es fácil de manejar durante los procedimientos de diagnóstico, lo que reduce las técnicas de manipulación para el paciente y la capacitación para la toma de muestras. El enfoque de recolección no invasiva podría reducir drásticamente la ansiedad, la incomodidad, y podría aumentar el deseo de la población de someterse a controles de salud rutinarios, aumentando en gran medida la oportunidad de monitorear la salud general a lo largo del tiempo [35,73–75].

Desde el punto de vista ético, la saliva puede considerarse el mejor material para investigaciones científicas, considerando las características mencionadas

anteriormente. Además, en comparación con la sangre, la recolección de saliva permitiría la aprobación de manera más sencilla por parte de los comités éticos, incluso en estudios que involucren a niños [35,76]. En países en desarrollo, permite un menor pre-procesamiento de muestras, pues la saliva no se coagula, por lo que se facilita su manejo, procesamiento y almacenamiento, haciéndola rentable [72,77,78].

De este modo, la saliva como herramienta de diagnóstico, satisface las demandas por un método de detección económico, no invasivo y fácil de usar. Es un fluido biológico complejo, útil para diagnosticar enfermedades o detectar la evolución de ciertas situaciones patológicas en el cuerpo humano [14]. Y, si bien el diagnóstico salival se desarrolló inicialmente para controlar enfermedades orales y para evaluar caries dentales [14], de la mano de la biotecnología, un gran número de biomarcadores para diferentes enfermedades relacionadas con el envejecimiento podrán seguir identificándose en la saliva y, en un futuro cercano, utilizarse de manera rutinaria. En este sentido, en la siguiente sección se hablará de los retos a superar para evaluar los nuevos marcadores descubiertos para la detección de enfermedades.

2.4.1. Proceso de evaluación de biomarcadores

El proceso de evaluación de los biomarcadores candidatos a convertirse en herramientas de detección, se encuentra representado en la figura 2.3. [79].

Fue propuesto originalmente para la investigación de marcadores tumorales, por la *Early Detection Research Network* (EDRN, red de investigación de detección temprana, por sus siglas en inglés) [80,81], no obstante, podría considerarse como una guía general para la identificación de biomarcadores correlacionados con diversas condiciones fisiológicas y cuyas fases son necesarias para el desarrollo de herramientas útiles de detección [29].

El proceso comienza con el descubrimiento del biomarcador, seguido por una evaluación rigurosa de la precisión de clasificación y finalmente, la evaluación del impacto del biomarcador en los resultados clínicos [29].

El presente trabajo se encuentra en la fase uno, también conocida como etapa de descubrimiento. Aquí, se define la validez pre-analítica, relacionada al manejo de muestras, pues los resultados de un ensayo podrían verse influenciados por una serie de factores relacionados con la muestra, que incluyen el tiempo y las condiciones de almacenamiento entre la recolección y el procesamiento, así como el tiempo de almacenamiento y las condiciones posteriores al tratamiento [82].

Fases en el desarrollo de biomarcadores

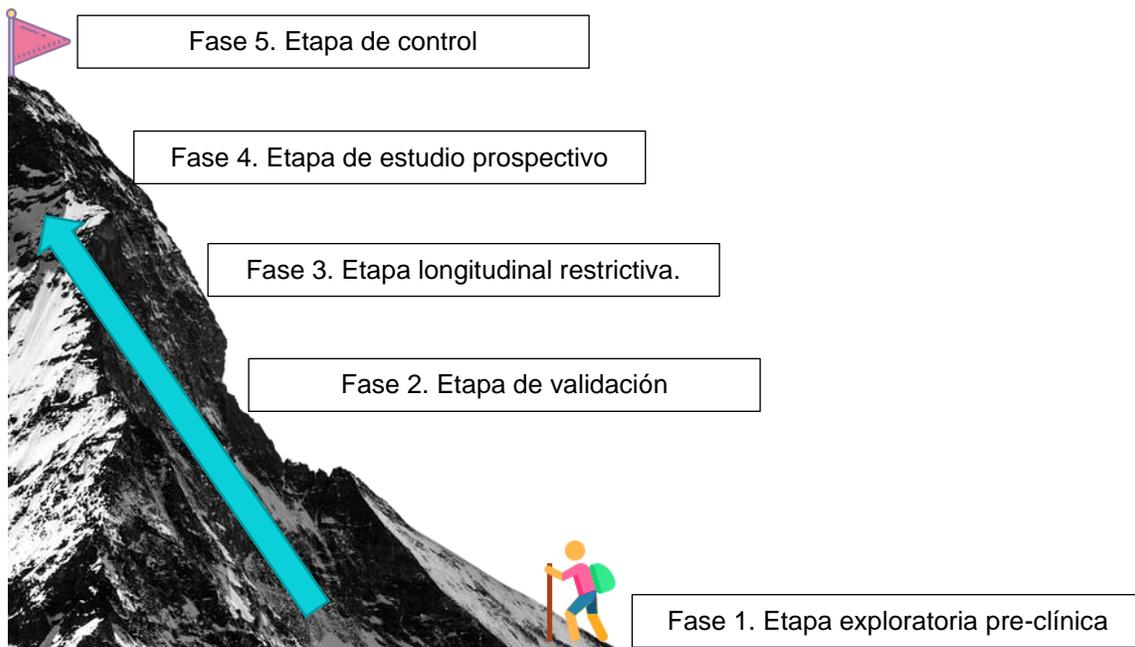


Figura 2.3. Proceso de descubrimiento y validación de biomarcadores de cáncer, según la guía desarrollada por la EDRN del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Fuente: construcción realizada en base a lo descrito por la EDRN [79].

Desafortunadamente, la mayoría de los estudios no avanzan más allá de esta fase por diversas razones, en particular, la gran variabilidad en la concentración de biomarcadores moleculares [79] debido a la influencia en la detección de biomarcadores que ejercen las características particulares de cada participante y los ritmos circadianos, así como los métodos de recolección y procesamiento [78]. Asimismo, la saliva contiene abundante amilasa y otras proteínas que podrían enmascarar potencialmente la presencia de biomarcadores proteicos presentes en concentraciones bajas [78].

Considerando las fases para el desarrollo de biomarcadores, la saliva enfrenta dos retos principales: 1) la identificación de biomarcadores moleculares relacionados con enfermedades que tengan alta sensibilidad y especificidad, ya que se necesitan estudios con muestras de mayor tamaño y que incluyan fases de descubrimiento, verificación y validación para el uso de biomarcadores salivales; 2) el desarrollo de plataformas rentables para la detección de las mismas [77,83].

Es en este sentido, que en los últimos años se ha desarrollado un creciente interés en la investigación de las propiedades físicas, es decir, de biomarcadores macroscópicos de la saliva, en virtud de su uso potencial como marcadores fisiológicos o patológicos [45,84]. Ciertamente, su uso como material de diagnóstico es posible, y en la sección siguiente se abordan a detalle las características que podrían ser útiles como biomarcadores.

2.5. Características fisicoquímicas de la saliva que funcionan como biomarcadores

Se ha hecho un gran énfasis en la búsqueda de biomarcadores sialoquímicos, es decir: de las propiedades químicas, para la detección, el diagnóstico y el seguimiento de enfermedades renales, trastornos metabólicos, tumores malignos, enfermedades cardíacas y enfermedades autoinmunes, así como para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos virales, entre los que destaca el virus de inmunodeficiencia humana [12,35,78,85]; y una menor cantidad de investigaciones de las propiedades físicas de la saliva, como la sialometría [43,45], para una mayor variedad de enfermedades, pues generalmente se evalúa con relación al síndrome de Sjögren.

Por lo anterior, en este trabajo se plantea el análisis de las características físicas de la saliva en personas sanas como: flujo, pH y viscosidad; y químicas como la concentración de proteínas totales, de las cuales a continuación se hace mención.

2.5.1. Sialometría

La tasa de flujo salival se define como la cantidad de saliva obtenida de un participante, medida en mililitros por unidad de tiempo [64]. Es la diferencia entre la entrada de saliva de las glándulas salivales a la cavidad oral y la posible pérdida de

líquido, por absorción a través de la mucosa oral y por evaporación durante la respiración bucal, sólo en caso de que esta se produzca durante la recolección de saliva [69].

Uno de los propósitos principales de la medición del flujo salival es investigar los posibles factores etiológicos que causan flujos alterados. En este sentido, se ha reportado que la tasa normal de flujo salival en reposo oscila entre 0.2-0.5 ml/min [50,84,86,87]. Flujos de entre 0.1 y 0.01 ml/min, implican una disminución del flujo salival, también conocido como hiposalivación [50,88].

Si bien es natural que el ser humano pase por períodos cortos de hiposalivación cuando está expuesto a condiciones de estrés psicológico, pueden existir otros motivos para la reducción del flujo salival [89] como: esquizofrenia, diabetes *mellitus* [50], ansiedad, estrés [64], hipotiroidismo y condiciones autoinmunes como el síndrome de Sjögren y la artritis reumatoide [89]. Además, muchos fármacos utilizados para el tratamiento de afecciones comunes como la hipertensión, la depresión y las alergias, influyen en la tasa de flujo salival y su composición [90].

El segundo caso de flujo alterado es la salivación excesiva o sialorrea, que puede ser ocasionado por una variedad de trastornos neurológicos como parálisis cerebral, retraso mental y enfermedad de Parkinson; así como por el uso de medicamentos, presencia de irritación intraoral o cirugía mandibular. También, ocurre como resultado de la rabia y por la intoxicación por metales pesados [44,91].

Aunado a lo anterior, la tasa de secreción salival y la velocidad a la que se envía la saliva a la boca muestra una amplia variación de persona a persona, incluso en condiciones normales [44,78]. Se encuentra reportado que la cantidad de saliva secretada por adultos en un día varía entre 0.5 – 1 litro de saliva, de los cuales el 80% se debe a la ingesta de alimentos [35]. Mientras que otros autores reportan una secreción normal de 600 a 700 mililitros o hasta 1 a 2 litros [44,64,73].

Estas variaciones pueden deberse a múltiples causas como el ritmo circadiano, el estrés [84], el envejecimiento, el número de dientes, el estado de salud periodontal, la fuerza de mordida, presencia de enfermedades oncológicas, diabetes, fibrosis

quística [35,64,92], el grado de hidratación [73], los medicamentos que se consumen y otras enfermedades sistémicas [92]. Asimismo, el flujo salival registra variaciones estacionales, con un mayor flujo salival en climas fríos que en climas templados [93]. Finalmente, destaca como causa de estas diferencias que el método de toma de muestras aún no se encuentra estandarizado [64].

2.5.2. Escala de acidez pH

Las alteraciones en la composición salival pueden causar un desequilibrio oral que se manifiesta clínicamente por una mayor incidencia de caries y susceptibilidad a la candidiasis oral, lesiones de la mucosa, halitosis, ineficiencia de la formación y al transporte de bolo alimenticio, desmineralización de la dentición, dificultades para hablar y masticar, así como alteración de la percepción del gusto y presencia de xerostomía [50,92,94,95]. La xerostomía es un síntoma subjetivo que consiste en la sensación de boca seca y se asocia frecuentemente con cambios cuantitativos y cualitativos del flujo salival [96].

El pH de la saliva no es un valor constante y experimenta cambios significativos bajo la influencia de diversos factores como la tasa de secreción salival, el ciclo circadiano, la dieta y las enfermedades sistémicas [44]. Los valores de pH pueden encontrarse en un rango de 5.3 a 7.8 [48], no obstante, ha sido reportado que en individuos sanos el pH se mantiene cerca de la neutralidad entre 6.7-7.3 [97]. Otras investigaciones reportan que los valores normales de pH oscilan entre 6.2-7.6, con 6.7 como el pH promedio. De esta manera, el pH en reposo de la boca no alcanza valores por debajo de 6.3, pues la saliva contribuye al mantenimiento del pH por dos mecanismos. Primero, el flujo de saliva elimina los carbohidratos que pueden ser metabolizados por las bacterias y elimina los ácidos producidos por las bacterias. En segundo lugar, la acidez de las bebidas y los alimentos, así como la actividad bacteriana, se neutraliza por la actividad amortiguadora de la saliva [98].

Existe evidencia de que el flujo salival puede afectar el pH, pues alteraciones en la cantidad y calidad de la saliva se traducen en cambios en la capacidad de la saliva para amortiguar el pH intraoral [48,99]. Así, el pH de la saliva depende en gran medida de la tasa de producción salival y cuando el proceso de salivación es más

lento, por ejemplo, al dormir, el pH desciende y alcanza valores entre 6.2–6.5 [44]. Por lo tanto, la disminución en el pH intraoral es consecuencia directa de la disminución de la tasa de flujo salival [99].

2.5.3. Concentración total de proteínas

Desde una perspectiva bioquímica, las proteínas son los componentes más importantes de la saliva [100] y se ha identificado la presencia de más de 2,000 proteínas de baja abundancia, y de estas solo el 20-30% están presentes también en la sangre [78,101]. Esto sugiere que la saliva podría usarse como una alternativa a la sangre para las pruebas de diagnóstico, ya que puede proporcionar avances tanto en biomarcadores conocidos como desconocidos de diversas enfermedades [43,84].

Las proteínas identificadas hasta ahora en la saliva cubren una amplia gama de funciones que van desde procesos metabólicos y estructurales de las células y tejidos, hasta actividades catalíticas o enzimáticas, cascadas de coagulación, adhesión y comunicación celular [40]. También apoyan la ecología de la cavidad oral, aumentan los mecanismos defensivos en la boca y determinan las propiedades químicas y físicas de la saliva, como la viscosidad y la lubricación [102]. En el caso de la viscosidad y la lubricación, las proteínas involucradas son: las glicoproteínas ricas en prolina que provienen de las glándulas parótidas y las mucinas, que se secretan de las glándulas salivales submandibulares y sublinguales [103].

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular con una estructura alargada que contribuyen significativamente al comportamiento viscoelástico de la saliva y comprenden hasta el 26% de la concentración total de proteína salival [44,103,104]. La saliva contiene dos tipos de mucinas: la mucina monomérica MUC7 (también conocida como MG2) y la mucina oligomérica MUC5B (MG1) [35,51,105]. Las MUC5B son sintetizadas por las células mucosas y las MUC7 por las células serosas de las glándulas salivales [35]. En la saliva no estimulada, constituyen el 20-30% de la cantidad total de proteínas [44]. Es de la MG1 de la cual dependen las propiedades reológicas, como la viscosidad y la elasticidad de la saliva [44,51,85].

El ensayo utilizado mayormente para la determinación de proteínas totales en saliva es el método de Bradford, cuyas ventajas son: facilidad de uso, sensibilidad y el bajo costo de los reactivos [106]. El principio de este ensayo se basa en la interacción existente entre las proteínas y el colorante *Coomassie Brilliant Blue G* (CBBG, Coomassie azul brillante G, por sus siglas en inglés) bajo condiciones ácidas. Estudios detallados indican que el colorante libre puede existir en cuatro formas iónicas diferentes, siendo tres formas cargadas del colorante las que predominan en la solución ácida. Es la forma más aniónica (la azul), la que se une a la proteína. Por lo tanto, la cantidad de proteínas se puede estimar determinando la cantidad de colorante en la forma iónica azul midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm. Este método mide la presencia de los residuos de aminoácidos básicos como arginina, lisina e histidina, así como de fenilalanina, triptófano y tirosina. Esta especificidad puede conducir a una variación en la respuesta del ensayo a diferentes proteínas, que es el principal inconveniente del método. El ensayo original de Bradford muestra una gran variación en la respuesta entre diferentes proteínas y por ello se han desarrollado varias modificaciones al método para superar este problema. Sin embargo, estos cambios generalmente resultan en un ensayo menos robusto que a menudo es más susceptible a la interferencia de otros productos químicos. Consecuentemente, el método original ideado por Bradford sigue siendo la formulación más conveniente y ampliamente utilizado. Asimismo, hasta el momento el mecanismo exacto de interacción no se conoce en su totalidad [106–108].

2.5.4 Viscosidad

Un fluido es un tipo de material que se deforma continuamente cuando se aplican fuerzas externas; un fluido ideal se define por no experimentar fuerzas de fricción, sino que las fuerzas que actúan sobre cualquier sección interna del fluido son puramente fuerzas de presión, incluso durante el movimiento. No obstante, en un fluido real, como la saliva, las fuerzas extensionales y de cizallamiento entran en juego cada vez que tiene lugar el movimiento, dando lugar a la fricción del fluido [60,109].

Estas fuerzas corresponden a una propiedad del fluido llamada viscosidad. La viscosidad, se define como “la fricción interna de un fluido causada por la atracción molecular, que lo hace resistir la tendencia a fluir”. Esta fricción se hace evidente cuando una capa de fluido se mueve en relación con otra capa, como se observa en la figura 2.4., donde dos placas paralelas sólidas se colocan una encima de la otra con una película líquida de espesor Y entre ellas [60,110].

Perfil de velocidad de un flujo contenido entre dos placas

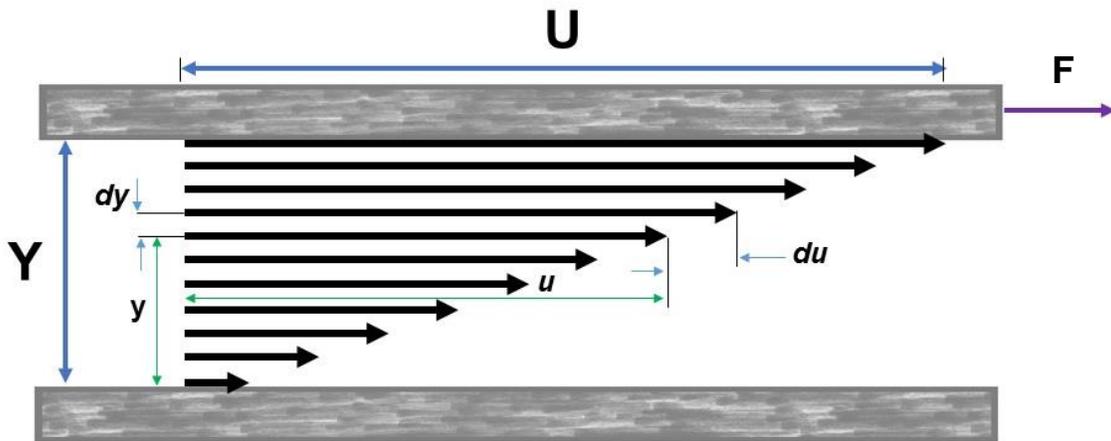


Figura 2.4. Representación de un líquido entre dos placas para ilustrar el término de viscosidad. Fuente: elaboración propia.

La placa inferior está en reposo, y la placa superior se pone en movimiento mediante una fuerza F que resulta en la velocidad U . El movimiento del primer plano superior pone en movimiento la capa inmediatamente adyacente de moléculas del líquido; esta capa transmite la acción a las capas subsiguientes a ella debido a las fuerzas intermoleculares entre las moléculas. En un estado estable las velocidades de estas capas van desde U , en la capa más cercana a la placa móvil, hasta 0 en la capa más cercana a la placa estacionaria [60].

La fuerza aplicada F , actúa sobre un área de la superficie del líquido A induciendo un esfuerzo cortante, también llamado fuerza cortante, de corte, de cizalla o tensión de corte. Se expresa como $\tau = F/A$, el cual es la fuerza por unidad de área requerida para producir la acción de cizallamiento [60]. Cuanto mayor es la fricción dentro del líquido, mayor es la cantidad de fuerza requerida para causar el movimiento [110].

El gradiente de velocidad, du/dy , es una medida del cambio en la velocidad a la que las capas intermedias se mueven entre sí. Describe las experiencias de cizallamiento del líquido y, se denomina velocidad de cizallamiento o de corte (U/Y) [60].

Usando los términos antes mencionados e introduciendo una constante de proporcionalidad η , el esfuerzo cortante entre las dos láminas delgadas y el fluido puede ser expresado por:

$$\tau = \frac{F}{A} = \eta \frac{U}{Y} = \eta \frac{du}{dy} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

En forma transpuesta, la ecuación 2.1. permite definir la constante de proporcionalidad que se conoce como coeficiente dinámico de viscosidad, viscosidad dinámica, o viscosidad aparente (η) y que se expresa en la ecuación 2.2. [60].

$$\eta = \frac{\tau}{du/dy} = \frac{\tau}{\gamma} \quad (\text{Ec. 2.2.})$$

Esta constante, como se mencionó anteriormente, describe la resistencia a la deformación de un fluido, es decir, la relación del esfuerzo cortante sobre la velocidad de corte. Para los fluidos newtonianos, la viscosidad dinámica mantiene un valor constante, lo que significa una relación lineal entre η y τ . Un fluido newtoniano se representa gráficamente con un comportamiento lineal en la figura 2.5.

Por su parte, el término $du/dy = \gamma$ se conoce como tasa de corte y describe el gradiente de velocidad [111]. De la ecuación 2.2., se obtiene la ecuación newtoniana (ecuación 2.3.), que ilustra el comportamiento del flujo de un líquido ideal [60,111].

$$\tau = \frac{\eta}{\gamma} \quad (\text{Ec. 2.3.})$$

Debido a que la viscosidad es la pendiente de las curvas en la figura 2.5., se muestra que la viscosidad de un fluido newtoniano permanece constante a medida que varía la velocidad de cizallamiento. En contraste, los fluidos no newtonianos no muestran una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de corte. Esto se debe a los efectos de deformación exhibidos por los materiales involucrados en dichos fluidos y su compleja estructura determinarán cuánta fuerza se requiere para moverlos. Por lo general, su estructura consiste en una mezcla de moléculas con diferentes formas y tamaños, que a medida que pasan unos junto a los otros, como sucede durante el flujo, a cada velocidad específica de corte puede cambiar su alineación, así como su forma y cohesión, y se puede requerir más o menos fuerza para mantener el movimiento [111].

Una característica particular de muchos fluidos no newtonianos es la retención de una "memoria" de su historia de flujo que se denomina elasticidad. Representantes típicos de fluidos no newtonianos son líquidos que se forman parcial o totalmente de macromoléculas (polímeros), o materiales de dos fases, como, por ejemplo, suspensiones de partículas sólidas de alta concentración en una solución de vehículo líquido [60].

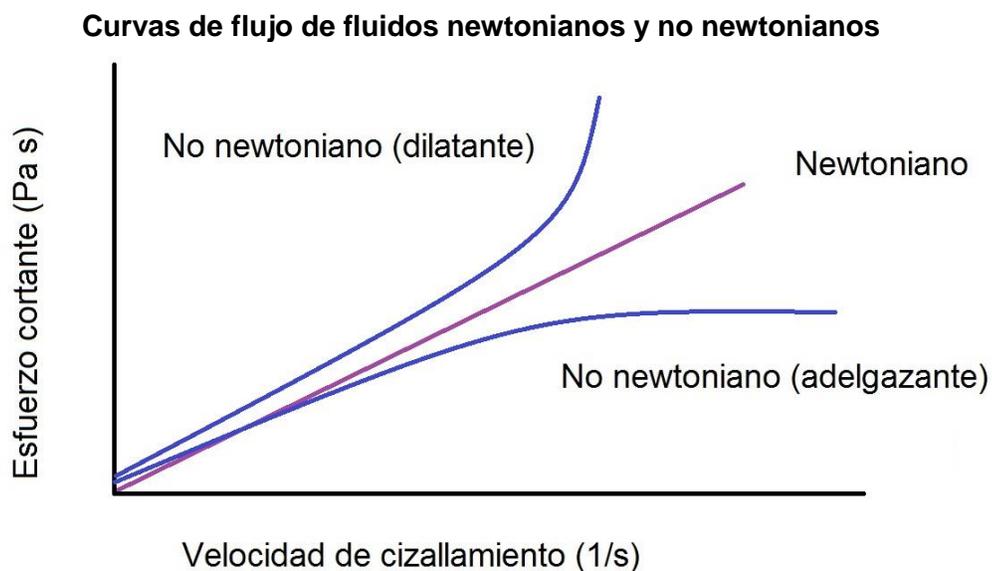


Figura 2.5. Representación del comportamiento de distintos tipos de fluidos según la ley de Newton. Fuente: elaboración propia.

Es importante mencionar que los fluidos no newtonianos son diversos y pueden caracterizarse como: fluidos pseudoplásticos, viscoplásticos, dilatantes y tixotrópicos [111]. En la figura 2.5. se encuentran representados los fluidos dilatantes o plásticos y los adelgazantes o pseudoplásticos.

Los fluidos viscoplásticos, se comportan como fluidos pseudoplásticos pues necesitan una tensión de corte predeterminada para empezar a fluir. Un fluido de este tipo es el plástico de Bingham, que requiere que el esfuerzo de cizalla (τ) supere el valor de esfuerzo de fluencia (τ_0) mínimo para pasar de una alta viscosidad a una baja viscosidad. Después de este cambio, prevalecerá una relación lineal entre τ y la tasa de cizalla ($\dot{\gamma}$). Ejemplos de líquidos de plástico Bingham son la sangre, la saliva y el líquido sinovial, por mencionar algunos [111].

De manera que, la saliva se clasifica como un fluido no newtoniano, cuyo comportamiento reológico se puede caracterizar como un adelgazamiento por cizallamiento con un componente elástico muy alto [103,112]. Por ello, es preferible el uso de aparatos especializados para medir muestras de poco volumen y baja viscosidad [51].

Pese a que existe un número limitado de estudios centrados en la reología de la saliva utilizando reómetros rotativos, estos han permitido describir el comportamiento de la saliva. La geometría de cono y placa de un reómetro rotativo, donde el cono gira mientras la placa inferior está estacionaria, se encuentra representado en la figura 2.6.

Los primeros estudios interpretaban el comportamiento de la saliva como el de un gel, debido a la existencia de un límite elástico y un adelgazamiento por cizallamiento. Waterman *et al.* [113] demostraron más tarde que estas mediciones no tomaban en consideración la adsorción de las proteínas a la interfaz aire-líquido en el borde de los reómetros rotacionales, dando como resultado la formación de una interfaz elástica de tipo sólido [103,114]. Esta capa de superficie elástica causa la medición de un límite de fluencia y módulos viscoelásticos similares a los geles, y por lo tanto, las propiedades medidas se deben a un fenómeno interfacial y no a

las propiedades reológicas de la saliva [115]. Stokes y Davies evitaron los problemas asociados con la interfaz aire-líquido aplicando una solución de *sodium dodecyl sulfate* (SDS, dodecilsulfato sódico, por sus siglas en inglés) alrededor de los bordes de las placas del reómetro [114].

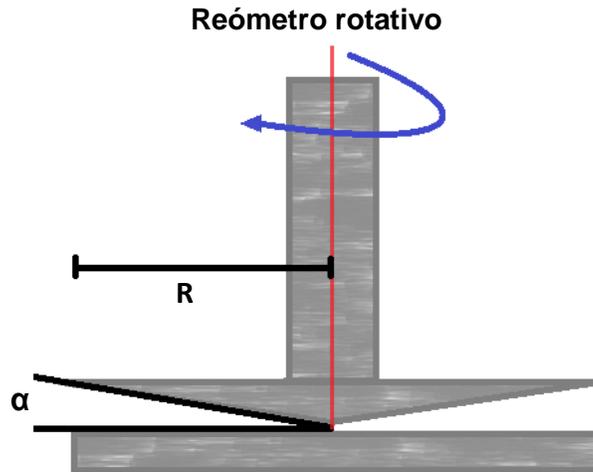


Figura 2.6. Geometría de un reómetro rotativo de cono-placa con el radio R y el ángulo de cono α señalados; el cono gira mientras la placa inferior está estacionaria. Fuente: elaboración propia.

Dado el comportamiento adelgazante de la saliva, los datos que se obtienen con el reómetro rotativo, se ajustan a través del modelo reológico matemático de Bingham (ecuación 2.4.), que describe la curva de flujo de un material con un esfuerzo de fluencia y una viscosidad constante a esfuerzos de corte por encima de τ_0 , que es el punto en la curva de esfuerzo de deformación, que corresponde a la transición desde la deformación elástica a la plástica [109,111].

$$\tau = \tau_0 + \eta \dot{\gamma} \quad \text{Ec 2.4.}$$

Si el valor de τ_0 es igual a 0, quiere decir que el fluido tiene un comportamiento newtoniano, mientras que valores distintos a 0, describen el comportamiento de un plástico de Bingham [111].

Los valores de viscosidad promedio de la saliva reportados en la literatura, presentan un rango entre 1.09 – 1.40 mPa·s [48,105,116,117] debido, probablemente a la heterogeneidad de los grupos estudiados, tanto en edad como

en el género. Respecto a esto último, algunos grupos estaban compuestos tanto de hombres como de mujeres o no lo reportaban.

2.6. Cambios en las características salivales relacionados con la edad

Aun cuando las tasas de flujo salival han sido evaluadas en múltiples estudios en los últimos 50 años las consecuencias del envejecimiento en la fisiología de las glándulas salivales es controvertida [118].

Se ha planteado la hipótesis de que la función salival disminuye con la edad [59,98] y que es independiente de la perturbación extrínseca, como enfermedades o medicación [119]. Pues con la edad se producen cambios morfológicos en el área glandular que es reemplazada por depósitos grasos y tejido conectivo [64]. De igual forma, aparece una reducción significativa del tamaño y los componentes celulares a lo largo del tiempo, pues se ha reportado disminución del 20% al 40% en el volumen de células responsables de la secreción de saliva. Otros cambios que pueden aparecer son atrofia acinar, vasos sanguíneos congestionados, formación de conductos e infiltrados mononucleares, en consonancia con la salida de saliva alterada [64,91,95].

Affo *et al.* [95] realizaron un meta-análisis, cuyos resultados sugieren que el flujo salival disminuye con el envejecimiento. Aunque este efecto fue evidente para la saliva total, no todos los subcomponentes de saliva mostraron un flujo disminuido, concretamente, las tasas de flujo de las glándulas parótidas y de las glándulas salivales menores no fueron diferentes en adultos jóvenes y mayores.

Como se mencionó, lo anterior está en entredicho, pues otros estudios han demostrado que la secreción de las glándulas salivales mayores no experimenta disminuciones clínicamente significativas en individuos sanos [118], esto está acorde con lo previamente reportado por Gittings *et al.* [117], Saluja *et al.* [120] y por León *et al.* [121], ya que se ha reportado que las glándulas salivales poseen una capacidad de reserva funcional dentro de la glándula salival [119]. Además, los componentes salivales también parecen ser estables en ausencia de enfermedad y del consumo de medicamentos que inducen la xerostomía. La mayoría de los casos

de xerostomía se deben probablemente a la medicación, las enfermedades sistémicas y la radiación en la cabeza y el cuello [118].

El estudio realizado por León *et al.* [121]. señalaba que las personas mayores presentan una menor producción de saliva al día en comparación con los adultos de mediana edad. Sin embargo, los autores reportan que esta situación parece estar más relacionada con enfermedades sistémicas y el uso continuo de medicamentos, que con el envejecimiento como tal [121]. Sin embargo, otras investigaciones han cuestionado el vínculo entre la vejez y la medicación, y entre la medicación y la hiposalivación. Así, cuando se han estudiado sujetos no medicados en la vejez, el efecto de la edad todavía está presente [101]. Por lo tanto, hasta la fecha no se tienen claros los efectos que la edad tiene sobre la salivación.

Con relación al pH, aunque el flujo salival puede afectar el pH [48,99], hasta el momento no se ha encontrado relación entre el valor del pH y la edad de los participantes [44].

La concentración de proteínas totales en la saliva parece tener diferencias dependientes de la edad y el género. El contenido total de proteínas de la saliva humana está entre 2.0 – 4.0 mg/ml, y se cree que puede afectar la densidad, el flujo y el pH de la saliva [122,123]. Bhuptani *et al.* [122] reportaron que la concentración media de proteínas disminuía ligeramente en la adolescencia (2.25 ± 0.74 mg/ml) al compararlo con el de niños y, disminuía (2.05 ± 0.91 mg/ml) en el grupo de 25 a 60 años de edad al compararlo con el valor promedio de los adolescentes, esto para grupos de ambos sexos. Asimismo, encontraron que las mujeres tenían concentraciones de proteínas salivales totales mayores que los hombres. Mientras que Nagler *et al.* [46] no reportaron diferencias significativas entre grupos de diferentes edades.

Respecto a las propiedades biofísicas, las investigaciones sugieren que pueden ocurrir cambios en la viscoelasticidad de la saliva relacionados con el envejecimiento, particularmente en la saliva producida por las glándulas submandibular y sublingual [91]. Khaldoun *et al.* [119] y Zussman *et al.* [124], encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad y

reportaron un aumento en la viscosidad salival en adultos mayores, con un aumento del doble cuando se comparó con los otros grupos de edad. Asimismo, Gittings *et al.* [117] reportaron que la viscosidad de la saliva fue significativamente mayor para el grupo de edad 28 – 35 años en comparación con los participantes de 20–27 años.

Aunado a lo anterior, las diferentes condiciones de la recolección de saliva en los estudios encontrados durante la revisión bibliográfica pueden explicar, hasta cierto punto, la controversia con respecto a la comprensión de la fisiología salival relacionada con el envejecimiento [46]. En el presente estudio, solo se consideraron las muestras de saliva no estimulada.

En resumen, algunos reportes señalan que el envejecimiento afecta las glándulas salivales y altera la cantidad, pues existe una reducción en la tasa de flujo salival, y la calidad, por ejemplo, en la composición de iones y proteínas, así como la reología de la saliva; por lo cual se puede presentar un aumento en la viscoelasticidad salival y en el contenido de proteínas[114].

En el siguiente capítulo se menciona la metodología utilizada para evaluar estos parámetros en la saliva de las participantes de este estudio piloto.

CAPÍTULO 3.

MARCO EXPERIMENTAL

3.1. Diseño del estudio

El presente fue un estudio piloto transversal observacional en el que se realizó un muestreo a conveniencia. El universo de trabajo consistió en la población femenina que respondió a la invitación de participar en este protocolo de investigación entre el mes de septiembre y noviembre del 2018 en el área cercana a la Facultad de Ciencias de la UAEMéx. Fue diseñado de acuerdo con las pautas emitidas en la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité de Ética de la FES-I, UNAM (Anexo 7.1.) y el Comité de Ética en Investigación del CICMED, UAEMéx (Anexo 7.2.).

Las participantes fueron adultas aparentemente sanas, de entre 18 y 59 años. La edad se registró de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud hasta el último cumpleaños [119]. Después de una reunión con cada participante, donde se daba una explicación detallada sobre el estudio, se obtuvo el consentimiento informado por escrito, firmado por la participante y un testigo, así como la información necesaria para completar el cuestionario de evaluación médica, el cual permitió determinar su estado de salud. Las participantes no padecían ninguna enfermedad sistémica u oral, a excepción de caries [49].

Todas las participantes recibieron instrucciones de abstenerse de fumar y beber 12 horas antes de la recolección de saliva, y haber permanecido sin comer, beber, consumir goma de mascar o realizar cualquier procedimiento higiénico dentro de la cavidad oral (por ejemplo, cepillarse los dientes) dos horas antes de la cita de toma de muestras [47,50].

Debido a la influencia de muchos fármacos en la secreción salival, las participantes debían evitar tomar medicamentos al menos ocho horas antes de la recolección salival [47] y un día antes del procedimiento en caso de que fueran medicamentos que afectaran la secreción salival como atropina, drogas antihistamínicas, anfetaminas, yodo y mercurio. El consumo de estos medicamentos fue considerado

un criterio de exclusión [50]. En el cuadro 3.1. se mencionan las características consideradas para la selección de participantes.

Criterios considerados de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mujeres ▪ Voluntarias sanas ▪ Edad entre 18 y 59 años.
Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mujeres mayores de 59 años o menores de 18 años ▪ Mujeres con signos evidentes de enfermedad periodontal ▪ Presencia de deshidratación ▪ Presencia de enfermedades sistémicas de los órganos vitales ▪ Participantes expuestas a radioterapia y quimioterapia ▪ Participantes que consumieran medicamentos que pudiera alterar el flujo salival ▪ Fumadoras. ▪ Participantes que no hayan seguido las especificaciones previas a la toma de muestras ▪ Participantes que no firmaron el consentimiento informado
Criterios de eliminación
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inadecuada cantidad de saliva para realizar los ensayos

Cuadro 3.1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación considerados en el presente trabajo para la selección de las participantes.

3.2. Variables de estudio

Parámetros salivales analizados

Variable	Tipo de variable	Definición	Unidad de medida	Valores de referencia
Edad	Independiente Cuantitativa discreta de razón	Edad que refiere la participante al momento del estudio	Años	18-59
Flujo salival	Dependiente Cuantitativa continua de razón	Cantidad de saliva producida naturalmente por las glándulas salivales	ml/min	< 0,1 (muy bajo) 0.1 – 0.2 (bajo) > 0.2 (normal)
Viscosidad salival	Dependiente Cuantitativa continua de razón	Es el espesor relativo de la saliva producida por las glándulas salivales	mPa·s	1.33 ± 0.29
pH	Dependiente Cuantitativa continua de intervalo	Una medida de la acidez o alcalinidad de una solución	Adimensional	6.7-7.3
Concentración de proteínas	Dependiente Cuantitativa continua de razón	Cuantificación de proteínas en una muestra para análisis	mg/ml	~0.2-0.4

Cuadro 3.2. Operacionalización de las variables estudiadas en el presente trabajo.

3.3. Toma de muestras de saliva

En el presente trabajo se utilizó el método de drenaje o babeo pasivo, que consiste en permitir que la saliva fluya pasivamente de la boca a un recipiente graduado, pues tiene las ventajas de ser reproducible y confiable para medir el flujo salival. Se realizó con adecuaciones a las metodologías reportadas previamente por Navazesh y Kumar [47], Foglio-Bonda *et al.* [48], Vibhakar *et al.* [49]; Alves *et al.*[50].

Todas las muestras de saliva total en reposo se recolectaron siempre entre las 9:00 y las 12:00 horas, para una mayor estabilidad fisicoquímica [44]. Las muestras se tomaron 2-3 horas después del consumo de alimentos, en una sala ventilada y bien iluminada.

Antes de la recolección, las participantes se enjuagaron la boca con agua destilada y permanecieron cómodamente sentadas, manteniendo una actitud pasiva por 5 minutos sin hablar, con los ojos abiertos, sin estimular la salivación, con los brazos apoyados sobre las rodillas y con la cabeza baja y mirando hacia adelante, entre los brazos; evitando los movimientos del cuerpo, como se representa en la figura 3.1.

Toma de muestra



Figura 3.1. Representación de la recolección de saliva haciendo uso del método de babeo pasivo.

3.4. Mediciones salivales

Se tomaron dos muestras de saliva total no estimulada por cada participante, el mismo día, con una diferencia de 15 minutos entre cada toma de muestras. Las muestras se analizaron de acuerdo al diagrama presentado en la figura 3.2. y del siguiente modo: se calculó el flujo salival para ambas muestras, sin embargo, la

primera muestra se utilizó para una prueba de reometría, dos ensayos de Bradford y dos mediciones de pH; mientras que la segunda muestra se utilizó para dos pruebas de reometría, un ensayo de Bradford y una medición de pH. Estas pruebas se realizaban inmediatamente después de la recolección. A continuación, se habla a detalle de las mismas.

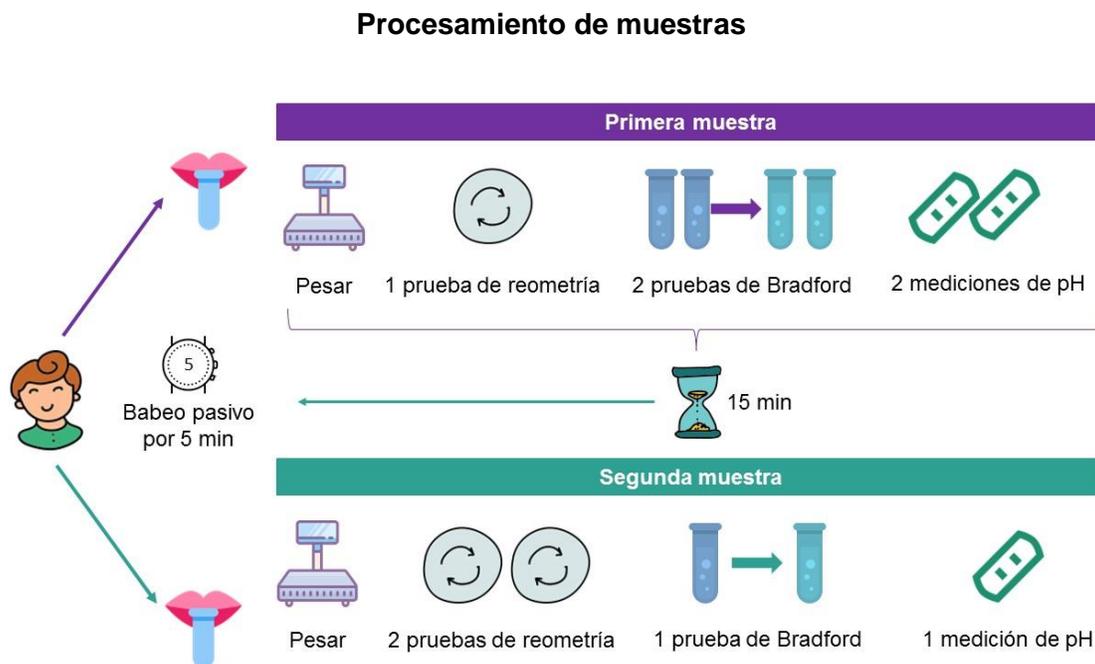


Figura 3.2. Procesamiento de las dos muestras de saliva obtenidas de cada participante. Fuente: elaboración propia.

3.4.1. Sialometría

El procedimiento utilizado en el presente trabajo consistió en pesar en balanza analítica (Precisa, XB 220A) los tubos cónicos antes y después de los 5 minutos de babeo pasivo de saliva, como se representa en la figura 3.3.a. La diferencia entre los valores obtenidos se registró como el peso de la saliva. Se dividió el peso por el tiempo de duración de la recolección (5 minutos) y se calculó el flujo en g/min, que es equivalente a ml/min, ya que más del 99% de la saliva está compuesta de agua [50].

3.4.2. Escala de acidez pH

El pH salival se midió directamente con tiras indicadoras de pH (*Microessential Laboratories, Hydrion 0.0-14.0*) inmediatamente después de la recolección de la

muestra, según lo reportado previamente por Hussein *et al.* [53]. El resultado se obtenía 10 segundos después de la aplicación de la tira a la muestra y el viraje de la tira indicadora se comparaba con la escala de color, en ejemplo de esto se encuentra en la figura 3.3.b. Se realizó la determinación de pH por triplicado en cada muestra, sin embargo, si la muestra era insuficiente, sólo por duplicado.

Determinación del peso del tubo y del pH

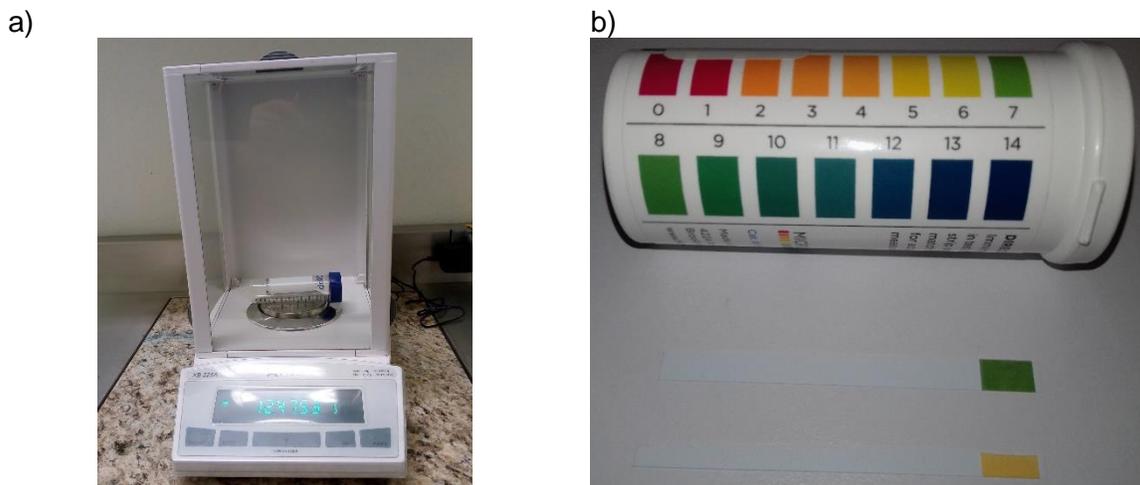


Figura 3.3. Determinación del peso del tubo y de la escala de acidez pH. a) Tubo colocado en la balanza analítica para obtener su peso; b) Tiras para estimación de acidez pH salival. En la parte superior una tira nueva y en la inferior una tira después de entrar en contacto con la muestra de saliva.

3.4.3. Concentración total de proteínas

La concentración total de proteínas salivales en cada muestra se determinó mediante el método de Bradford, según lo reportado por Justino *et al.* [54]. Se realizó una curva estándar utilizando *bovine serum albumin* (BSA, albúmina de suero bovino, por sus siglas en inglés) (marca USBiological) y agua destilada con concentraciones de 0.0 a 1.0 mg/ml, en intervalos de 0.1 mg/ml. La determinación por participante se realizó por triplicado, en tubos de borosilicato (Tubo de cultivo con tapón de rosca, Kimax), colocando 0.2 ml de la muestra de saliva y 6 ml de reactivo de Bradford preparado con el colorante CBBG CAS 6104-58-1 (marca *Santa Cruz Biotechnology*). Posteriormente, se leyó la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro de luz visible (modelo 1100RS, marca Unico). En la figura 3.4. se

presenta el cambio de color que el colorante tiene al entrar en contacto con las proteínas presentes en la muestra.

Método de Bradford



Figura 3.4. Tubos con CBBG para determinar la concentración de proteínas totales en la saliva utilizando el método de Bradford. De lado izquierdo el colorante antes y de lado derecho, el colorante después de interactuar con la muestra de saliva.

3.4.4. Viscosidad

La medición de las propiedades reológicas de la saliva se realizó en el presente trabajo con adecuaciones a la técnica reportada por Ueno *et al.* [51] y Sajewicz *et al.* [52].

Se utilizó un reómetro de marca Haake Mars III (*Thermo Fisher Scientific*, Karlsruhe, Alemania) acoplado al software de análisis Haake RheoWin 4.6. (*Thermo Fisher Scientific*, Karlsruhe, Alemania). Utilizando un cono superior (L13025) con un diámetro de 35.0 mm y un ángulo de 1°, y una placa inferior para módulos de temperatura con un diámetro de 35.0 mm.

Todas las mediciones se realizaron a una temperatura de 37°C, utilizando 0.2 ml de saliva colocados en el centro de la placa inferior, como se observa en la figura 3.5. Se aplicaron 2-3 gotas de SDS (J.T.Baker, Center Valley, PA) al 0.1% alrededor del borde de la placa inferior, de acuerdo a lo reportado previamente por Stokes y Davies [115] para evitar la interacción entre las proteínas y la interface gaseosa. Para la obtención de datos, el equipo se configuró para aplicar sobre la muestra tasas de corte de 0 a 1000 (1/s), dividido en dos rampas de 0 a 300 (1/s) y de 300 a 1000 (1/s), tanto en la aceleración y como en la desaceleración.

Se establecieron las condiciones óptimas para que en un lapso de aproximadamente 30 minutos, se tomaran las dos muestras de saliva de cada participante y se realizaran las tres mediciones reológicas: una con la primera muestra proporcionada y dos con la segunda muestra, de manera consecutiva. Cada medición tomaba un tiempo aproximado de 20 minutos.

Medición de la viscosidad



Figura 3.5. Procesamiento reológico de muestras. De izquierda a derecha: muestra en el centro de la placa del reómetro, acercamiento del mismo paso y reómetro con cubierta para evitar salpicaduras y en posición de adquisición de datos.

3.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el software R (versión 3.5.1) en conjunto con RStudio. Se consideraron las medidas de tendencia central para el análisis descriptivo y para evaluar las diferencias entre las medias de los grupos, se utilizó la prueba de t de *Student* para observaciones pareadas, dada su utilidad para analizar pares de individuos con una característica similar. Los valores críticos de la distribución t con un valor de significancia de 0.05 fueron considerados para determinar la significancia estadística [125].

Asimismo, según la normalidad de los datos obtenida con la prueba de Shapiro-Wilk [48], se aplicó la prueba de correlación de Pearson [88,95,117] y la prueba de correlación de Kendall para comparar los valores obtenidos. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos [48,88,117].

CAPÍTULO 4.

PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Resultados experimentales

En este estudio piloto, a partir de la metodología planteada en el capítulo anterior, se evaluaron las características fisicoquímicas de la saliva de doce participantes (n=12) en un rango de edad de 18 a 59 años. Las participantes incluidas en este estudio se dividieron en dos grupos de edad, el grupo 1 conformado por participantes de entre 18 y 29 años de edad (n=6) y el grupo 2, con participantes en un rango de edad de entre 30 y 59 años (n=6). En el cuadro 4.1. se muestran las características de la población de estudio, es decir: edad y consumo de líquidos promedio al día. La edad promedio para el grupo 1 fue 22.67 años y para el grupo 2 de 43.67 años.

Características de la población de estudio

Variable	Grupo 1 (n=6)	Grupo 2 (n=6)
	Promedio ± DE	Promedio ± DE
Edad (años)	22.67 ± 1.033	43.67 ± 8.733
Consumo de agua (l)	1.58 ± 0.492	1.42 ± 0.736

DE, desviación estándar

Cuadro 4.1. Distribución de la población estudiada según edad y consumo promedio de agua al día.

A continuación, se reportan la media y la desviación estándar para los datos con distribución paramétrica (con distribución normal), mientras que, adicionalmente para los datos no paramétricos (distribuidos de manera no normal) se reportan los valores máximos y mínimos. La normalidad de los datos se determinó con el estadístico p de la prueba de Shapiro-Wilk.

4.1.1. Sialometría

En el cuadro 4.2. se muestran los valores promedio del flujo salival por grupo. Para el grupo 1 se obtuvo un valor promedio de 0.18 (± 0.071) ml/min, mientras que para el grupo 2 el promedio fue de 0.33 (± 0.198) ml/min. En la figura 4.1. aparecen los flujos salivales promedio de las dos mediciones realizadas para cada participante.

Evaluación comparativa del flujo salival (ml/min) entre grupos

	Grupo 1	Grupo 2
Promedio	0.18	0.33
Desviación estándar	0.071	0.198
Mínimo	0.117	0.166
Máximo	0.300	0.709

Cuadro 4.2. Estadística descriptiva del flujo salival (ml/min) para cada grupo evaluado.

Existe un acuerdo general en la literatura de que el límite superior para el flujo salival no estimulado considerado como muy bajo es 0.1 ml/min. Mientras que las tasas entre 0.1 y 0.2 ml/min se han sugerido como bajas mientras que las superiores a 0.2 ml/min se han estimado como normales [86,87].

Promedio del flujo salival por participante

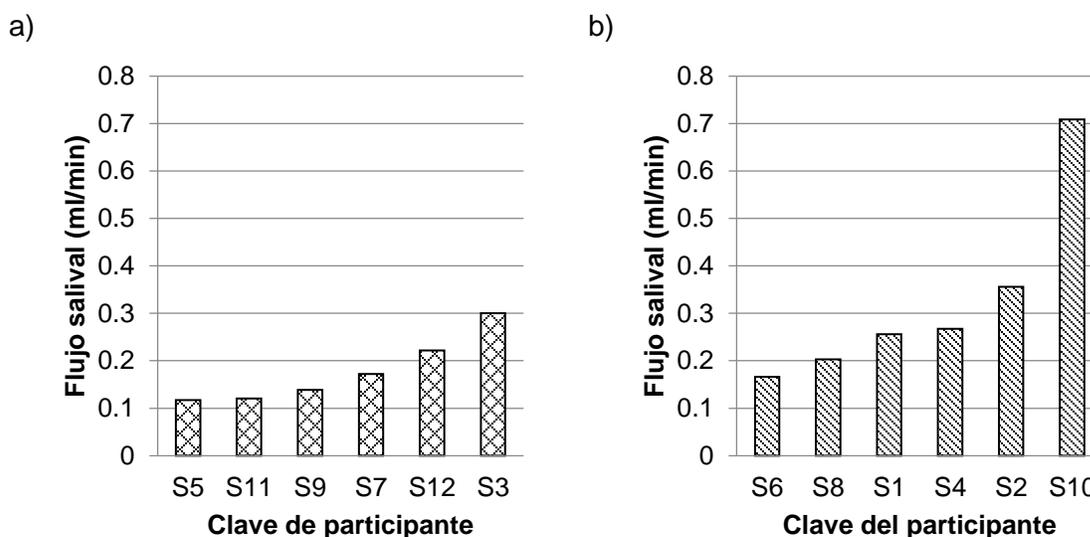


Figura 4.1. Distribución de las participantes de acuerdo al flujo salival (ml/min) de a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

Se puede observar que el valor promedio para el grupo 2 se encuentra dentro del rango de flujo normal, en concordancia con lo previamente reportado para las mujeres de entre 40–49 años por Flink *et al.* [87], cuyo flujo salival oscilaba en 0.30 (± 0.22) ml/min.

En contraste, las participantes del grupo 1, como se aprecia de manera gráfica en la figura 4.1., presentaron un flujo salival menor que las del grupo 2, lo cual no coincide con lo encontrado previamente en la bibliografía. Tres sujetos del grupo 1 (50%), presentaron una tasa de flujo igual o inferior a 0.16 ml/min, que se considera como flujo bajo [88], en contraste con el flujo salival promedio de 0.30 (± 0.21) ml/min reportado por Flink *et al.* [87] para las mujeres de entre 20 y 29 años de edad.

Dado que en el cuestionario ninguna de ellas expuso consumir medicamentos que afectaran el flujo salival, ni padecer enfermedades sistémicas [92,118], las posibles causas de estos valores disminuidos, podrían relacionarse a que las participantes del grupo 1 eran estudiantes en evaluaciones finales. Previamente fue reportado por Queiroz *et al.* [126] y Matos-Gomes *et al.* [127] que el nerviosismo y la ansiedad causados por presentar exámenes finales contribuyen a una reducción en la secreción salival de los estudiantes. Si los factores estresantes psicológicos, presentes en estudiantes neuróticos y ansiosos, se conjugan con el estrés oxidativo, los individuos son más propensos a manifestar los principales factores de riesgo relacionados con el desarrollo de enfermedades crónicas [128]. Se ha sugerido que las especies reactivas de oxígeno están involucradas en la aparición y patología del síndrome de Sjögren. Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno causan disfunciones en las glándulas salivales [129].

Asimismo, el flujo salival tiene una mayor tendencia a ser afectado por el grado de hidratación [73] y los estudiantes durante los periodos de evaluación, inconscientemente hacen cambios en su rutina que los hacen descuidar su propio cuerpo [127], por lo que no se puede descartar por completo, que las participantes del grupo 1 estuvieran bajo una situación de estrés y condiciones de deshidratación. Al respecto de la hidratación, la correlación de Pearson entre el consumo de agua y el flujo salival fue estadísticamente no significativa ($r = 0.243$, $p = 0.641$ para el grupo 1).

Se sabe muy poco sobre las causas de la hiposalivación en este grupo de edad [87], pero se conoce suficiente sobre las consecuencias, pues un flujo salival bajo,

disminuye el pH intraoral [99], limita el aclaramiento bacteriano de la boca, lo que ocasiona la progresión de caries, presencia de sensibilidad dental y el aumento de enfermedades periodontales [130]. En este sentido, resultados de un estudio epidemiológico, mostraron que los jóvenes con enfermedad periodontal y molares ausentes, tenían un mayor riesgo de muerte prematura causada por enfermedades potencialmente mortales como neoplasias malignas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades del sistema digestivo [131]. La razón de la asociación propuesta es que la inflamación es un factor importante tanto en las enfermedades periodontales como en el cáncer [130,131]. No obstante, se necesitan estudios adicionales para explorar las asociaciones sugeridas.

Por otro lado, la determinación estadística de la diferencia entre las medias, se realizó con la prueba de *t* de *Student* pareada. Los valores críticos de la distribución *t* obtenidos fueron: $t < -2.201$ o $t > 2.201$. El estadístico de prueba $t = -2.791$, no se encuentra entre los valores críticos; por lo tanto, se puede rechazar la hipótesis nula y suponer que la media de los valores del flujo salival entre los grupos 1 y 2 presenta diferencias estadísticamente significativas; esto se observa gráficamente en la figura 4.2. a través de un diagrama de caja y bigotes.

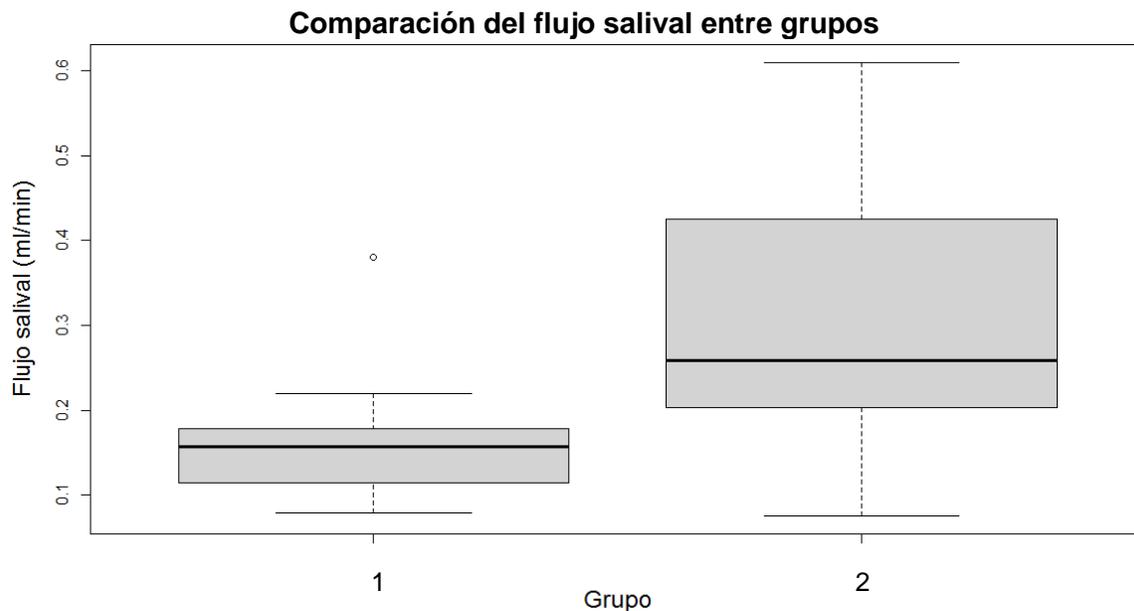


Figura 4.2. Diagrama de caja y bigotes con la comparación del flujo salival (ml/min) por grupo al momento de la valoración.

En contraste con nuestra hipótesis inicial y con la revisión bibliográfica, los datos obtenidos en esta tesis muestran una disminución para el grupo 1 que no había sido reportada con anterioridad. Autores como Jornet [64] y Affo *et al.* [95] encontraron que la función salival disminuye con un aumento de la edad [71,118,124,132] y es independiente de la perturbación extrínseca de las enfermedades o la medicación, debido a mecanismos de envejecimiento celular normal en el organismo [101,119,133]. En el mismo sentido, Zussman *et al.* [124], reportaron una reducción de la tasa de flujo salival relacionada con el aumento de edad, al igual que Fenoll *et al.* [88] quienes encontraron un flujo era mayor en las personas jóvenes (de menos de 44 años) que en personas de más de 44 años. La disminución en el grupo de participantes jóvenes puede estar relacionado con el estrés al que estuvo sometido el grupo 1 por las evaluaciones finales y también, al pequeño número de participantes evaluadas en este trabajo. Por lo que se necesitan más estudios al respecto.

Dado que todas las participantes incluidas en el presente estudio estaban aparentemente libres de enfermedades sistémicas o locales y no se encontraban bajo medicación que afectara la secreción salival, la diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos tampoco está en concordancia con lo previamente reportado por Gittings *et al.* [117], Saluja *et al.* [120] y por León *et al.* [121] pues, ellos encontraron que la secreción de las glándulas salivales mayores no experimenta disminuciones clínicamente significativas en individuos adultos sanos y los componentes salivales parecen ser estables en ausencia de enfermedades y del consumo de medicamentos que inducen la xerostomía [118]. Mese y Matsuo [94] reportaron que diversos estudios funcionales demuestran que no hay disminución en el flujo con la edad en individuos sanos, no medicados.

Por lo anterior, son necesarios más estudios al respecto en la población mexicana, pues no se encuentra caracterizado el flujo salival en participantes jóvenes libres de enfermedades.

4.1.2. Escala de acidez pH

En el cuadro 4.3. se encuentran reportados el pH promedio, la desviación estándar, los valores máximos y mínimos. El pH promedio del grupo 1 fue de 6.17 (± 0.408), mientras que para el grupo 2 fue de 6.5 (± 0.548).

Evaluación comparativa del pH entre grupos

	Grupo 1	Grupo 2
Promedio	6.17	6.50
Desviación estándar	0.408	0.548
Mínimo	6	6
Máximo	7	7

Cuadro 4.3. Estadística descriptiva del pH al momento de la valoración para cada grupo evaluado.

Ambos grupos presentaron un pH salival promedio por debajo de 7, que generalmente indica acidemia (acidez anormal) y, si se mantiene a largo plazo en la cavidad bucal, conduce a la colonización de bacterias cariogénicas que podría comprometer la salud bucal, desplazando a las bacterias beneficiosas presentes en la flora oral normal. Por lo tanto, la boca es más susceptible a caries dentales, halitosis, periodontitis y erosión dental, que es un desgaste de los dientes mediado por sustancias químicas debido al bajo pH en la cavidad oral. Esta condición se encuentra comúnmente en personas con problemas relacionados con el sueño, que presentan sequedad bucal o enfermedad de reflujo gastroesofágico. Ambos grupos de pacientes comparten como causa común la reducción de la tasa de flujo salival [38,98,99,132], pues con la presencia de flujos salivales bajos, se libera menos bicarbonato y disminuye el pH [120], lo cual parece cierto para el grupo 1, que presento un flujo salival bajo y para el cual, ya se han mencionado las problemáticas que conlleva.

El promedio de las mediciones de pH realizadas por participante se pueden observar en la figura 4.3. y se puede notar que del mismo modo que hubo participantes con acidemia, hubo participantes con un pH de 7, que generalmente indica una situación dental y periodontal saludable, así como una baja incidencia de caries dental [98].

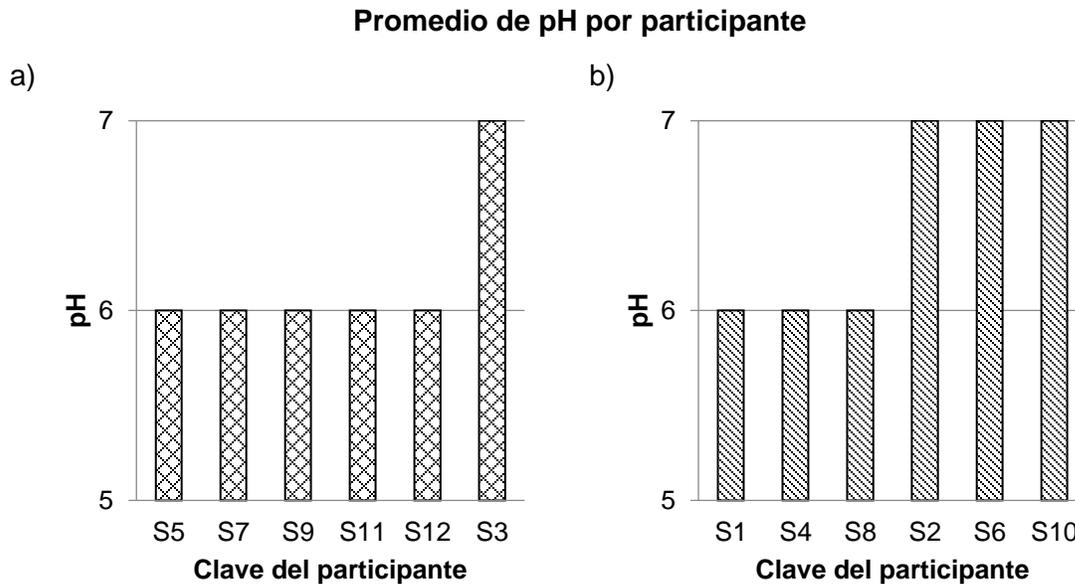


Figura 4.3. Distribución de las participantes de acuerdo al pH promedio al momento de la valoración para a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

La distribución no incluye valores fraccionarios dado que el instrumental utilizado sólo determinaba valores enteros. Por lo que estos datos no permiten distinguir leves diferencias entre coloraciones con una escala fraccionaria, mismas que podrían representar diferencias de pH salival entre participantes del estudio de un mismo grupo.

Para determinar la diferencia entre los grupos, se obtuvo que el estadístico de prueba $t = 2.915$ no se encuentra entre los valores críticos de la distribución ($t < -2.201$ o $t > 2.201$); por lo tanto, la hipótesis nula se puede rechazar y se puede suponer que existen diferencias estadísticamente significativas. Esto no está en concordancia con lo previamente reportado, pues hasta el momento no se había reportado relación entre el valor del pH y la edad de los participantes [44,117]. Una razón para estos resultados puede ser el flujo salival disminuido presente en algunas de las participantes de ambos grupos, que afecta el pH y causa alteraciones en la cantidad y calidad de la saliva; esto se traduce en cambios en la capacidad de la saliva para amortiguar el pH intraoral [48,99]. Son necesarios más estudios para explorar estas suposiciones.

4.1.3. Concentración total de proteínas

En el cuadro 4.4. se reportan los valores promedio y la desviación estándar de la concentración de proteínas totales en la saliva de las participantes, obtenidos a través del método de Bradford descrito en el capítulo anterior. Para el grupo 1, el promedio de la concentración de proteínas totales salivales fue de 0.57 (± 0.200) mg/ml, mientras que para el grupo 2, el promedio fue de 0.61 (± 0.167) mg/ml.

Evaluación comparativa de la concentración de proteínas (mg/ml) entre grupos

	Grupo 1	Grupo 2
Promedio	0.57	0.61
Desviación estándar	0.200	0.167

Cuadro 4.4. Estadística descriptiva de la concentración de proteínas totales (mg/ml) salivales para cada grupo evaluado.

En la figura 4.4., se observan los valores promedio por participante de las tres repeticiones realizadas para obtener la concentración total de proteínas en saliva.

Si bien, diversos estudios han reportado la concentración total de proteínas salivales en individuos de distintas edades, las metodologías utilizadas son heterogéneas y los grupos están integrados tanto por hombres como mujeres. Por ello, los resultados obtenidos en esta tesis se compararon con las tendencias reportadas en la bibliografía y, a continuación, se mencionan los estudios cuyos grupos de estudio estaban conformados por hombres y mujeres, y que reportan datos similares a los obtenidos en esta tesis.

Valores que están de acuerdo con el promedio obtenido para el grupo 1 son los de Nagler *et al.* [46] quienes reportaron para un grupo con promedio de edad de 20.5 (± 1.5) años una concentración de proteínas de 0.636 (± 0.068) mg/ml. En la figura 4.4. se notan valores por debajo de los reportados, como los de los participantes con clave S12 y S9.

Por otra parte, en concordancia con los datos obtenidos para el grupo 2, se encuentra la concentración de proteínas de 0.6 (± 0.3) mg/ml en un grupo cuya edad promedio era 49.6 (± 13.5) años, en un estudio realizado por Méjean *et al.* [134].

Promedio de proteínas totales por participante

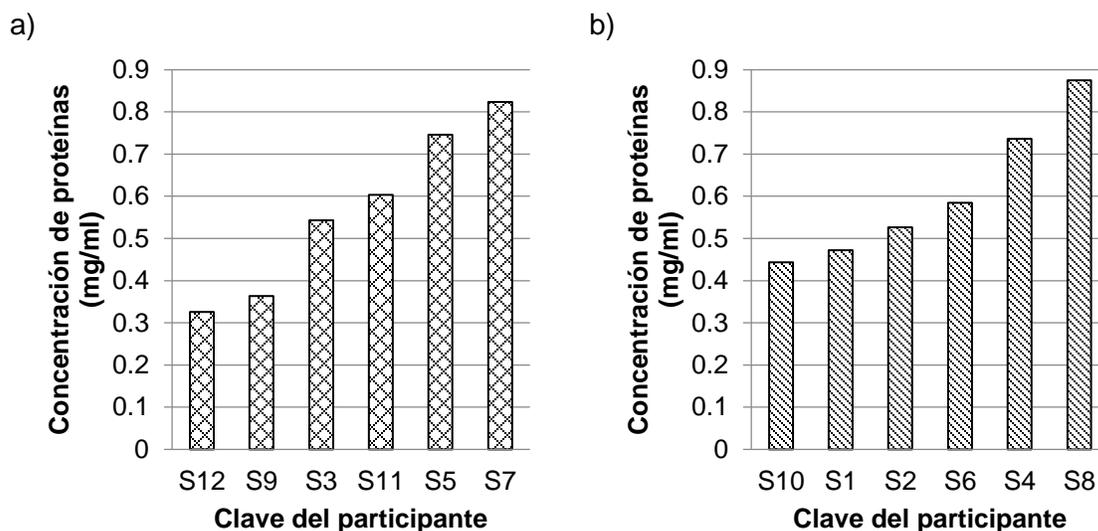


Figura 4.4. Distribución de las participantes de acuerdo a la concentración promedio de proteínas salivales totales (mg/ml) al momento de la valoración para a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

Algunos reportes que difieren con los aquí reportados (por ser mayores) son los siguientes: Milton y Bhambal [135] evaluaron un grupo de voluntarios, de ambos géneros, mayores de 15 años y menores de 45 años de edad. Obtuvieron una concentración promedio de proteínas de $1.53 (\pm 0.335)$ mg/ml. Bhuptani *et al.* [122] encontraron que para el grupo de edad >20 años de ambos géneros, la concentración de proteínas era de $2.05 (\pm 0.91)$ mg/ml, mientras que para el grupo de mujeres de diversas edades era de $2.25 (\pm 0.85)$ mg/ml. Öztürk *et al.* [136] reportaron una concentración de $1.28 (\pm 0.41)$ mg/ml de proteínas salivales totales en un grupo de adultos jóvenes sanos, entre 19 y 25 años.

Al realizar la prueba de *t* de Student pareada para la diferencia de medias, se pudo concluir con un 95% de confiabilidad, que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos evaluados para el parámetro de concentración de proteínas pues el estadístico $t = 0.245$ esta dentro de los valores críticos de la distribución ($t < -2.201$ o $t > 2.201$). De manera gráfica, se observa lo anterior en la figura 4.5., mediante un diagrama de caja y bigotes. Lo obtenido, concuerda con

Nagler *et al.* [46] quienes no reportaron diferencias significativas entre grupos de diferentes edades y compuestos por hombres y mujeres.

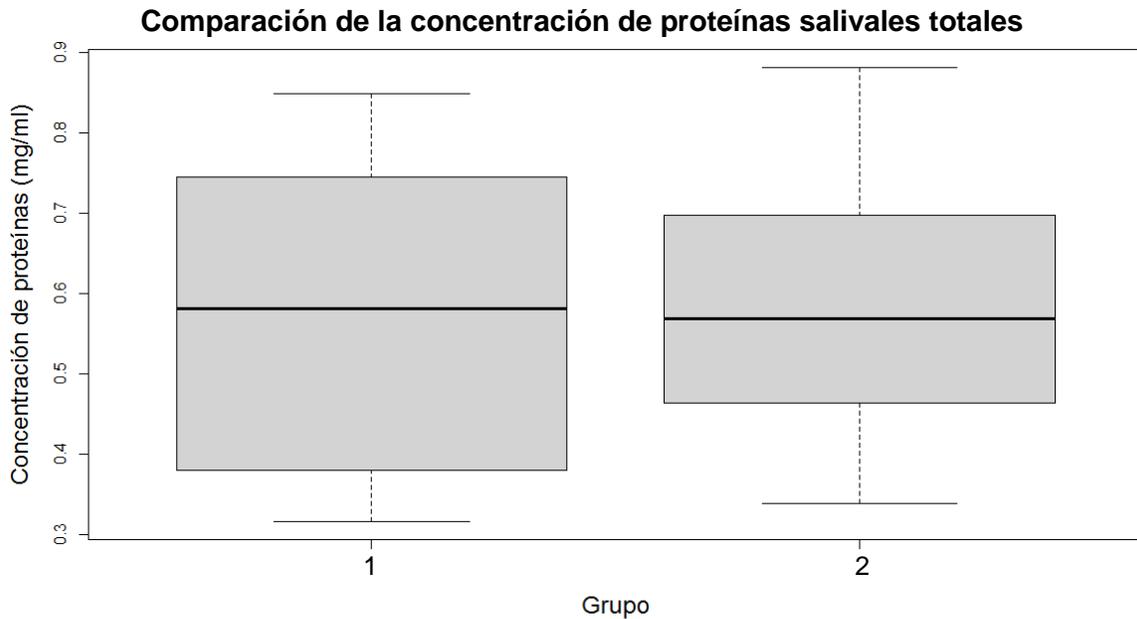


Figura 4.5. Diagramas de caja con la comparación de la concentración de proteínas totales (mg/ml) entre los grupos estudiados.

A su vez, lo anterior, se encuentra en conformidad con lo reportado por Bhuptani *et al.* [122] respecto a que la concentración permanece constante en los adultos, posiblemente, por el gran grupo de edad que ellos analizaron, que fue de 25 a 60 años de edad. Por lo cual, son necesarios mayores estudios al respecto.

4.1.4. Viscosidad

En el cuadro 4.5. se reportan los valores obtenidos mediante el ajuste de Bingham para los datos de la curva de aceleración de 300 a 1000 1/s. Para el grupo 1, la viscosidad promedio fue de 0.92 mPa·s (± 0.254) y para el grupo 2, se obtuvo una viscosidad promedio de 0.91 mPa·s (± 0.384).

En la figura 4.6. se observan los valores promedio de las tres repeticiones realizadas por participante, para obtener los valores de viscosidad aparente (η), a tasas de cizalladura de 300 a 1000 (1/s), con los datos ajustados al modelo de Bingham.

Evaluación comparativa de la viscosidad (mPa·s) en la aceleración entre grupos

	Grupo 1	Grupo 2
Promedio	0.92	0.91
Desviación estándar	0.254	0.384

Cuadro 4.5. Estadística descriptiva de la viscosidad salival (mPa·s) en la aceleración de 300 a 1000 (1/s) para cada grupo evaluado.

Promedio de viscosidad en la rampa ascendente por participante

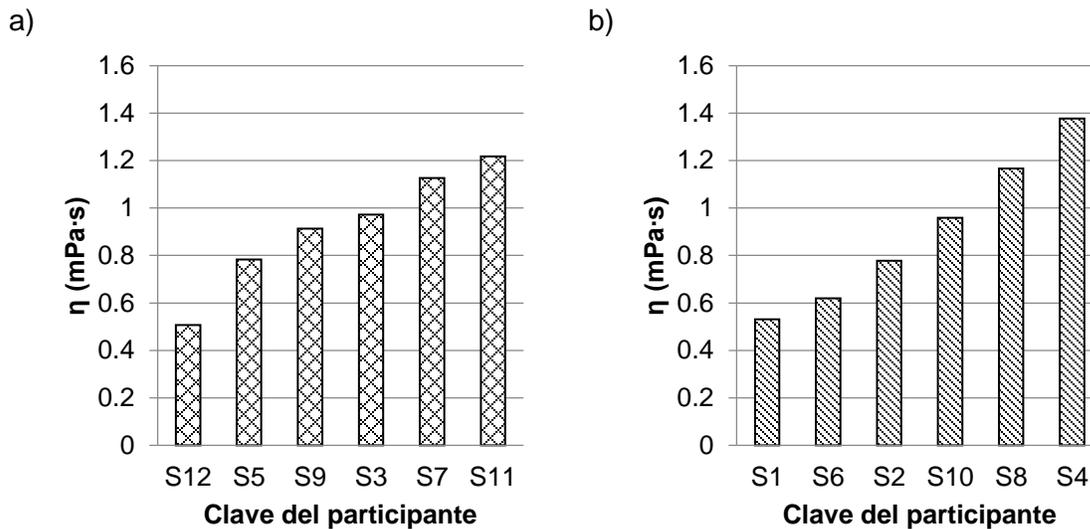


Figura 4.6. Distribución de las participantes de acuerdo a la viscosidad (mPa·s) en la aceleración obtenida al momento de la valoración para a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

Estos promedios grupales están por debajo de los reportados previamente por Silletti *et al.* [116] que analizaron un grupo de diez voluntarios sanos no medicados y encontraron una viscosidad de 1.18 (± 0.32) mPa·s. En la misma dirección están los resultados de Inoue *et al.* [105] quienes estudiaron un grupo de 51 adultos jóvenes sanos (26 varones y 25 mujeres) con una edad media de 25.2 (± 3.1) años y para quienes reportaron una viscosidad de 1.09 (± 0.11) mPa·s. Del mismo modo, Foglio-Bonda *et al.* [48] analizaron la saliva de un grupo de 68 estudiantes de ambos géneros, de entre 18 y 29 años de edad y para los que reportaron una viscosidad promedio de 1.40 (± 0.39) mPa·s. Estos valores son superiores a los que se encontraron en este trabajo, probablemente porque se evaluaron participantes de

ambos sexos. Gittings *et al.* [117] reportaron que la saliva de los varones presentaba una viscosidad más alta, no obstante, poco se sabe sobre el efecto del género en el aumento de la viscosidad de la saliva.

Como se mencionó en el capítulo anterior, las curvas de flujo de la aceleración y desaceleración se dividieron en dos rampas, la primera con un gradiente de velocidad de 0 a 300 1/s y la segunda de 300 a 1000 1/s. En la figura 4.7. se encuentran las curvas de flujo obtenidas para las tasas de corte de 0 a 300 1/s para cada grupo. Mientras que en el cuadro 4.6. se reportan los valores de ajuste lineal de las curvas de cada participante. Los datos se encuentran separados por grupo.

Ajuste de las curvas de flujo de 0 a 300 1/s

Grupo de estudio	Clave de la participante	R ²
G1	S03	0.990
	S05	0.990
	S07	0.981
	S09	0.975
	S11	0.959
	S12	0.961
G2	S01	0.948
	S02	0.990
	S04	0.974
	S06	0.991
	S08	0.962
	S10	0.971

Cuadro 4.6. Valores de ajuste lineal de los datos de viscosidad con en la aceleración. Reología a cizallamiento de aceleración constante (0-300 1/s).

En la figura 4.7. se aprecia que el esfuerzo de cizalla aumenta conforme aumenta la tasa de corte y, al ser el comportamiento de la saliva el de un material pseudoplástico, no fluye hasta alcanzar un esfuerzo de corte que supere el valor de cedencia, que sucede hasta aproximadamente un gradiente de velocidad de 100 1/s y, es en este punto cuando se observa de manera clara que la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación se vuelve lineal, esto se refleja en los valores de ajuste se encuentran reportados en el cuadro 4.6. En concordancia con lo previamente reportado, respecto a que la saliva muestra un comportamiento newtoniano a tasas de cizallamiento superiores a 90 1/s [48].

Curvas de flujo de la primera rampa de aceleración

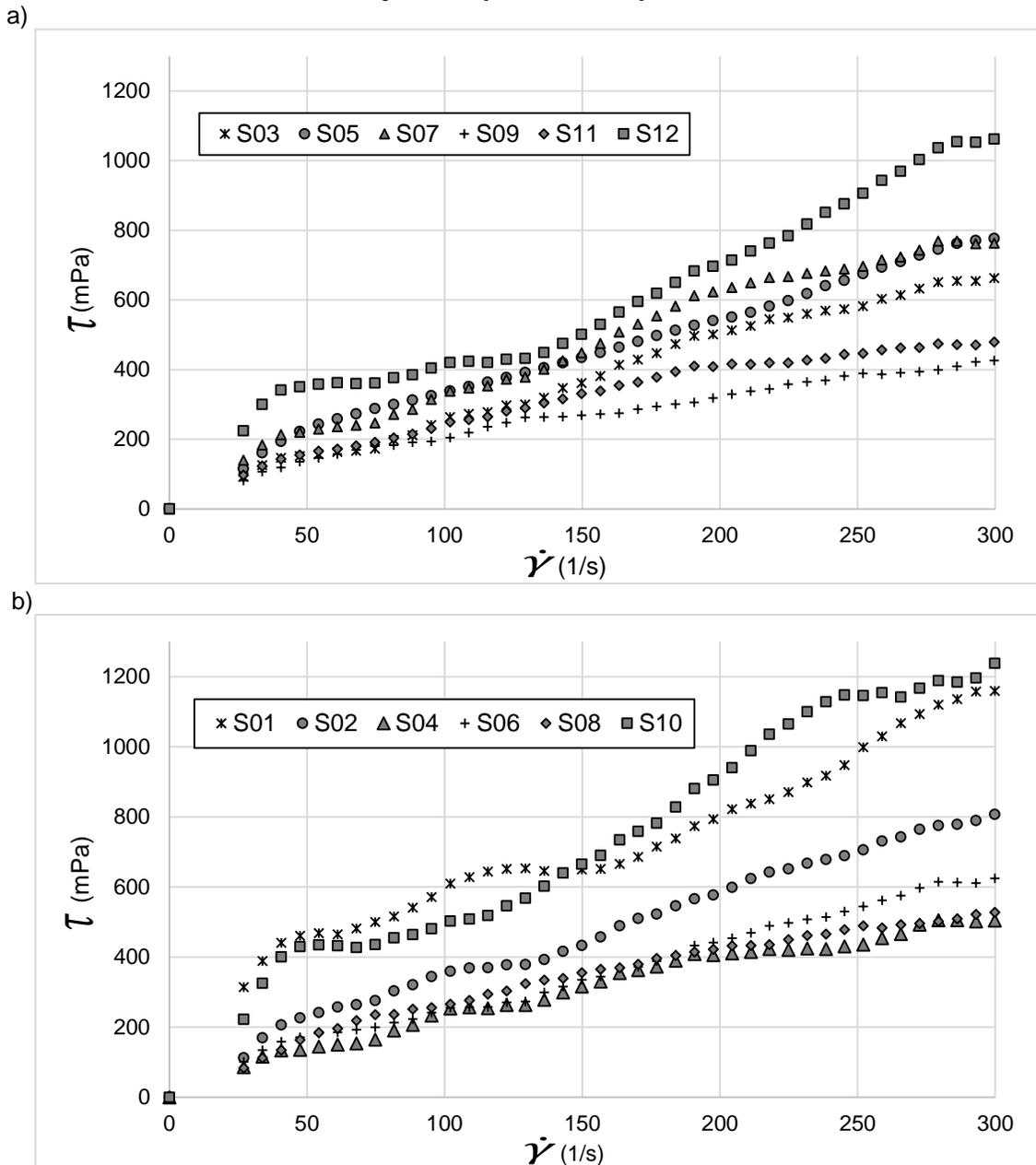


Figura 4.7. Curvas de flujo de las muestras de saliva para cada grupo, durante la rampa de aceleración constante de 0 a 300 1/s para a) grupo 1 y b) grupo 2.

En la vida cotidiana, las tasas de cizallamiento de 4 1/s corresponden al movimiento de partículas a través de la lengua, mientras que velocidades de 60 1/s y 160 1/s, a la ingestión y al habla respectivamente [117]. Mientras que las altas tasas de cizallamiento ocurren en la boca principalmente durante la alimentación y la deglución [104,137]. Tasas de entre 10 y 500 1/s imitarían el rango presente en la

boca durante la alimentación [117] y los resultados de esta velocidad de cizallamiento, se encuentran en la figura 4.8. Estos gradientes de velocidad ayudan a mantener un flujo constante desde que la saliva entra en la boca a través de las aberturas ductales, hasta que alcanza la parte posterior de la garganta, cuando se deglute [104].

Curvas de flujo de la segunda rampa de aceleración

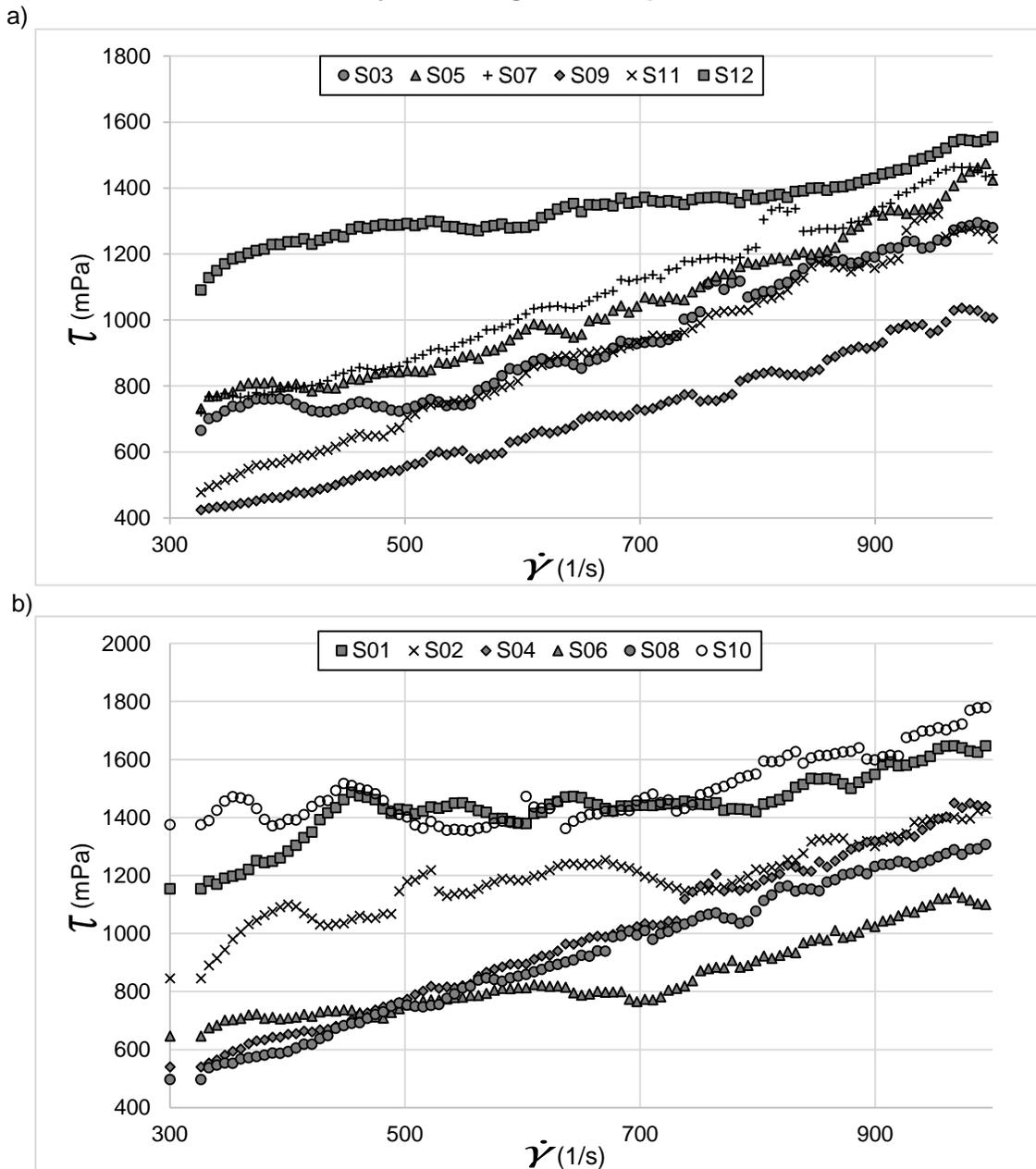


Figura 4.8. Curvas de flujo de las muestras de saliva para cada grupo, durante la rampa de aceleración constante de 300 a 1000 1/s para a) grupo 1 y b) grupo 2.

Dado que este comportamiento lineal no depende del tiempo de aplicación del esfuerzo, podríamos decir que la saliva, a altas velocidades de deformación es equivalente a un fluido newtoniano.

Lo anterior, se ve de manera gráfica en la figura 4.8., donde las curvas de flujo de 300 a 1000 1/s para ambos grupos presentan menor variabilidad que las de la curva de flujo de 0 a 300 1/s y tienen mejores valores de ajuste, es decir, tienen valores más cercanos a 1 (cuadro 4.7) en comparación con las rampas presentadas anteriormente en la figura 4.7.

Ajuste de las curvas de flujo, de 300 a 1000 1/s

Grupo de estudio	Clave de la participante	R ²
G1	S03	0.996
	S05	0.995
	S07	0.993
	S09	0.991
	S11	0.994
	S12	0.996
G2	S01	0.996
	S02	0.996
	S04	0.994
	S06	0.989
	S08	0.993
	S10	0.991

Cuadro 4.7. Valores de ajuste lineal de los datos de viscosidad con en la aceleración. Reología a cizallamiento de aceleración constante (300 a 1000 1/s).

Un ejemplo de fluido newtoniano con el que estamos en contacto de manera cotidiana es el agua y, curiosamente la saliva a pesar de estar compuesta 99% de agua, presenta su comportamiento no lineal a bajas tasas de corte, como se ve en la figura 4.9. donde se grafican los datos de las dos rampas de aceleración, es decir de 0 a 1000 1/s. y se pone de manifiesto su comportamiento no newtoniano [50,104].

Este comportamiento no newtoniano, es causado por el 1% restante de su composición que contiene una gran cantidad de componentes orgánicos [35,43,68], pues a medida que pasan unos junto a los otros, como sucede durante el flujo, a cada velocidad específica de corte cambian su alineación, forma y cohesión, y se puede requerir más fuerza para mantener el movimiento [111] hasta que se llega al

valor de cedencia. En la práctica, este comportamiento permite que la saliva cree la membrana que cubre y lubrica los tejidos blandos y duros que recubren la cavidad oral, manteniendo la homeostasis de la cavidad oral [35,104].

Además, en la figura 4.9., se puede apreciar que las participantes del grupo 2 parecen alcanzar mayores esfuerzos cortantes bajo las mismas condiciones de velocidad de deformación, por encima de los 1600 mPa a 1000 1/s.

Curvas de flujo en la aceleración

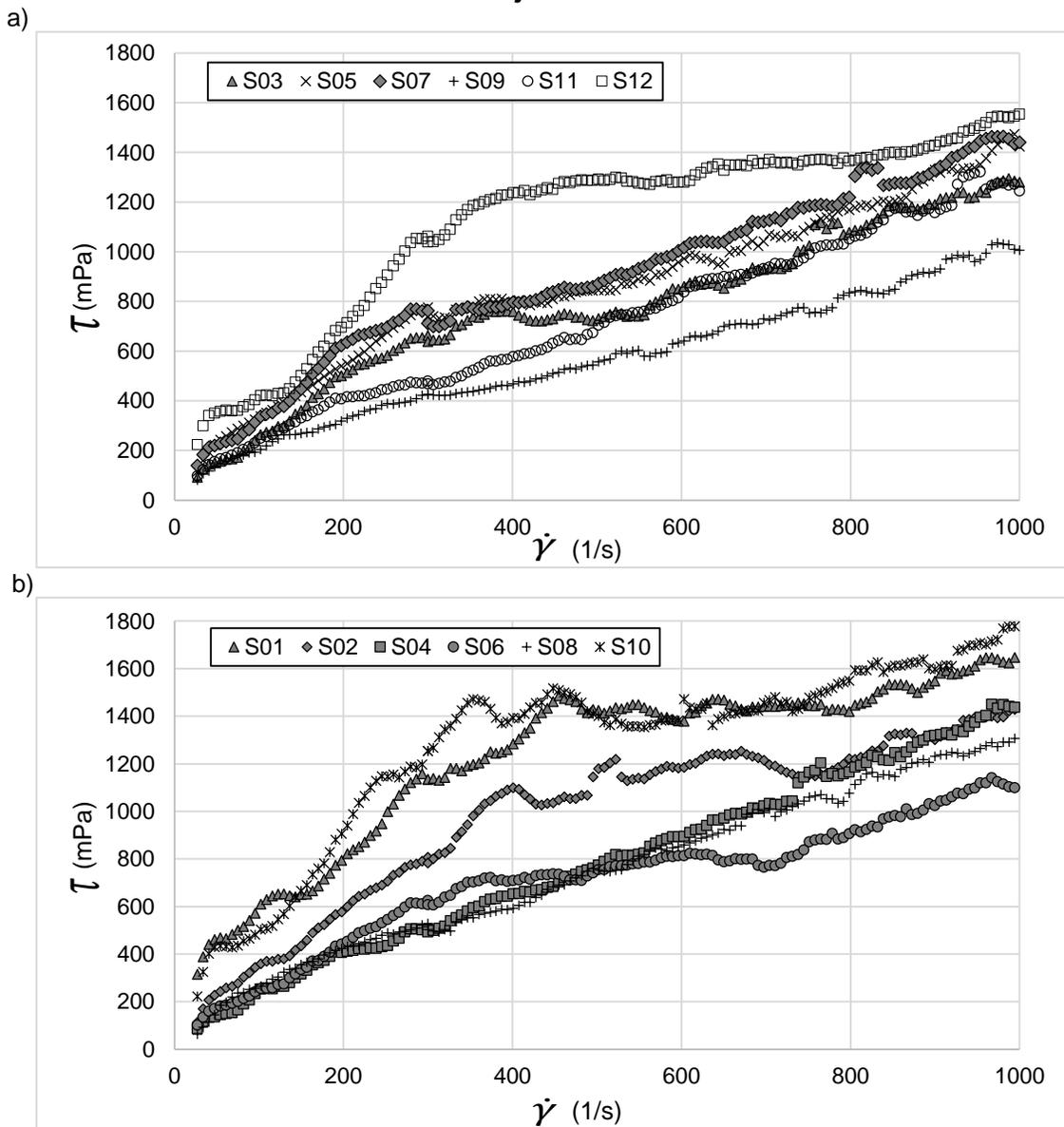


Figura 4.9. Curvas de flujo de las muestras de saliva para cada grupo, durante la rampa de aceleración constante de 0 a 1000 1/s para a) grupo 1 y b) grupo 2.

En este sentido, el movimiento constante de la saliva es importante para la eliminación de bacterias, para la estabilidad del pH, y la salud bucal en general [104]. Si la saliva se vuelve demasiado viscosa, puede inhibir su capacidad para lubricar la boca, y conducir a enfermedades orales como las caries o periodontitis [105]; y como se mencionó con relación al flujo salival, existe una relación entre las enfermedades periodontales y las neoplasias malignas, las enfermedades cardiovasculares y del sistema digestivo [131]. Por lo que, en concordancia con la hipótesis inicial de esta tesis, el grupo 2 parece presentar una viscosidad mayor a altas tasas de corte, según las gráficas de la figura 4.9.

En la figura 4.10. se encuentran las curvas de viscosidad, obtenidas al someter a la saliva a un aumento constante de la tasa de cizalladura de 0 a 1000 1/s. Estos resultados están en conformidad con lo hallado por Preetha y Banerjee [112] respecto al comportamiento pseudoplástico de la saliva y las viscosidades de entre 15.5 mPa·s a tasas bajas de corte y 2.8 mPa·s al aumentar la tasa de cizalladura hasta 95 1/s. Asimismo, los datos de Haward *et al.* [114] presentan una viscosidad de ~8 mPa·s a la tasa de cizallamiento más baja y una reducción a ~2 mPa·s a tasas de cizallamiento más altas. Esto en concordancia con los datos aquí obtenidos, donde a ~30 1/s se alcanzaban los 8 mPa·s y en los consecuentes aumentos de la tasa de cizallamiento, la viscosidad disminuye hasta valores entre 1 y 2 mPa·s. Del mismo modo, lo anterior concuerda con lo reportado por Stokes y Davies [115], quienes agregan que la saliva es un fluido relativamente inelástico con una viscosidad de cizallamiento infinito de alrededor de 1.0 mPa·s, marginalmente por encima de la viscosidad del agua de 0.77 mPa·s, que es afín con lo reportado en el cuadro 4.5. y cuadro 4.8., para las curvas ascendentes y descendentes respectivamente.

En el cuadro 4.8., se reportan los valores obtenidos con el ajuste de Bingham en la rampa de desaceleración, es decir, de 1000 a 300 (1/s). Para el grupo 1, se obtuvo una viscosidad promedio de 1.12 (± 0.220) mPa·s y para el grupo 2 un promedio de 1.20 (± 0.375) mPa·s.

Evaluación comparativa de la viscosidad (mPa·s) en la desaceleración entre grupos

	Grupo 1	Grupo 2
Promedio	1.12	1.20
Desviación estándar	0.220	0.177

Cuadro 4.8. Estadística descriptiva de la viscosidad salival (mPa·s) en la desaceleración de 1000 a 300 (1/s) para cada grupo evaluado.

Curvas de viscosidad en la aceleración

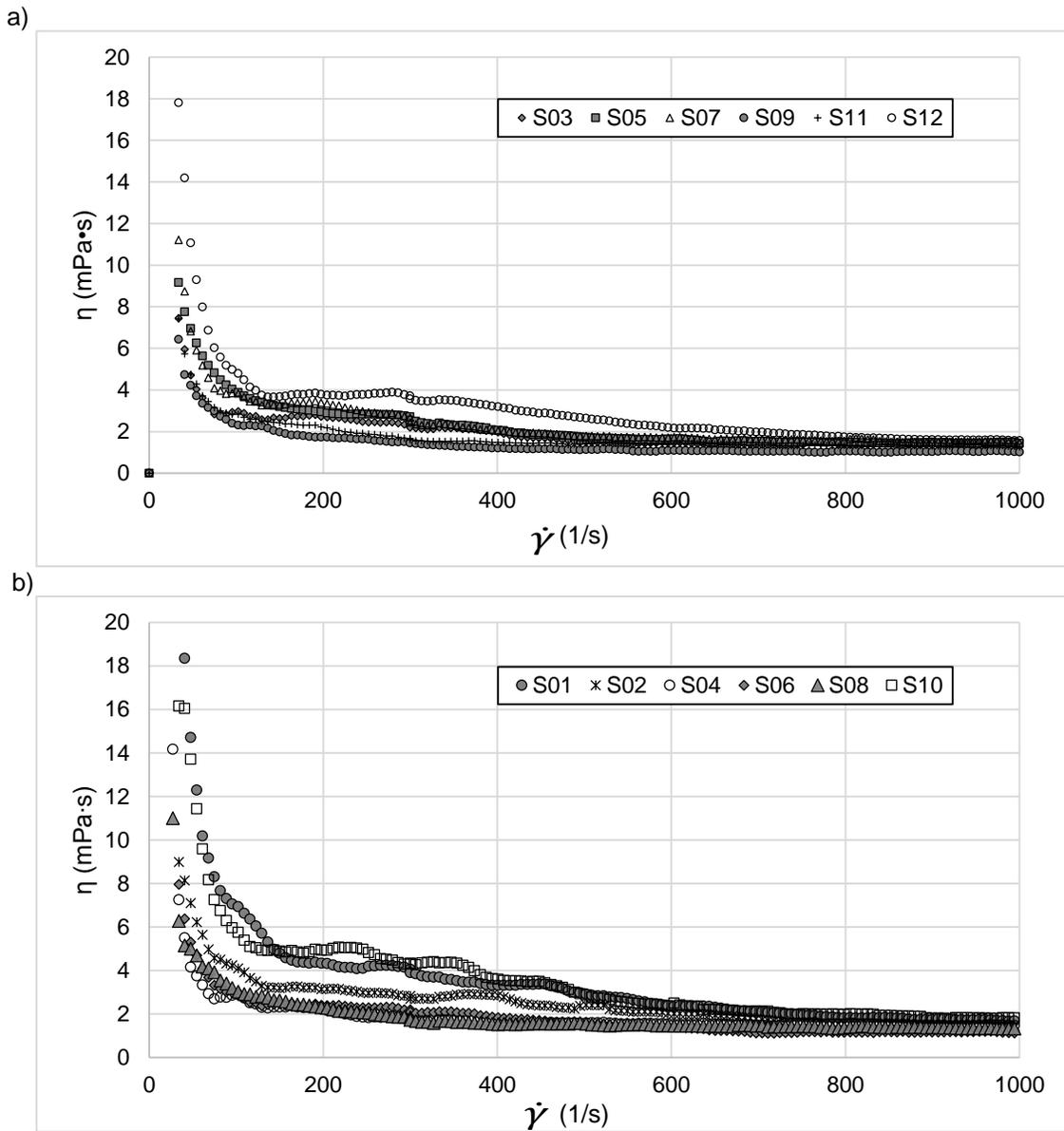


Figura 4.10. Curvas de viscosidad salival de las participantes del a) grupo 1 y b) grupo 2. Reología a cizallamiento de aumento constante (0–1000 1/s).

En contraste con lo mencionado para las curvas de aceleración, los datos presentados en el cuadro 4.8 están en concordancia con los valores antes mencionados reportados por Silletti *et al.* [116], Inoue *et al.* [105] y Foglio-Bonda *et al.* [48] para las curvas de aceleración, no obstante, ninguno de estos trabajos reporta los valores promedio de las rampas descendentes.

En la figura 4.11. se observan los valores promedio por participante de las tres repeticiones realizadas para obtener los valores de viscosidad aparente (η), a tasas de cizallamiento de 1000 a 300 (1/s), es decir, durante la desaceleración, con los datos ajustados al modelo de Bingham.

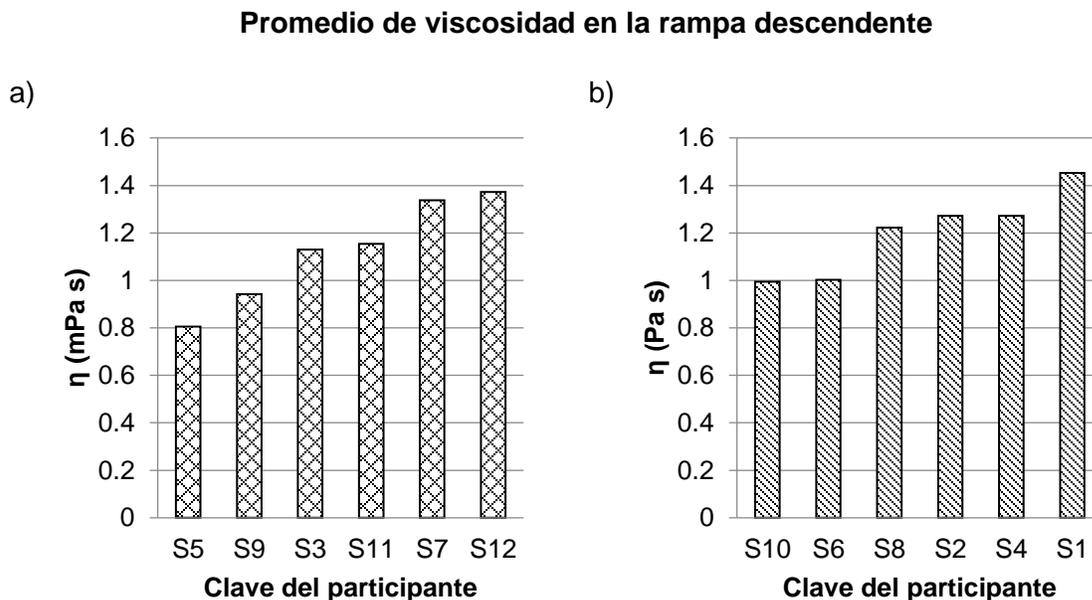


Figura 4.11. Distribución de las participantes de acuerdo a la viscosidad (mPa·s) en la desaceleración para el a) grupo 1 y b) grupo 2. Los valores están ordenados de menor a mayor.

En la figura 4.12. se encuentran representadas las curvas de flujo en la desaceleración, donde la relación lineal de la velocidad de corte con el esfuerzo, es aún más notoria. Esto se debe a que la saliva se considera una dispersión coloidal de biopolímeros altamente estructurados, como las mucinas salivales y las proteínas ricas en prolina [51,103,105,116,138]. Las mucinas gracias a su propiedad de auto-agregación pueden formar estructuras muy grandes, que contribuyen a la naturaleza viscosa de la saliva [104]. Se pueden imaginar cómo

largas cadenas que en condiciones de reposo se contraen para formar estructuras circulares que en los bordes se enredan entre sí. Al aplicar una tasa de corte, las estructuras circulares cambian su forma y se convierten en elipsoides. Esta deformación va de la mano con el aumento del desenmaraño de las moléculas. Al separarse, las moléculas individuales tienen menos resistencia al flujo que las superestructuras enredadas y dan como resultado el comportamiento de adelgazamiento por cizalla, presentando valores de viscosidad decrecientes a tasas de cizallamiento más elevadas, como podemos observar en la figura 4.12.

En la desaceleración, no se presenta un adelgazamiento de cizalla tan marcado, pues en la curva de aceleración se deforma la estructura interna del fluido y la saliva al ser un pseudoplástico, es un material sin memoria, es decir, una vez que se aplica la fuerza y la estructura se ve afectada, el material, en este caso, las proteínas, no recuperan su estructura anterior [111] y por lo tanto, su función. Esto tiene como resultado, una disminución de la viscosidad [139]. Otra causa del comportamiento mucho más lineal de la saliva en las rampas descendentes podría atribuirse a la destrucción de las redes de mucina dentro de las muestras de saliva que experimentan un deterioro irreversible por el cizallamiento [117]. Aunado a esto, la estabilidad de la muestra de saliva comienza a disminuir inmediatamente durante el procedimiento de recolección y sus propiedades se mantienen constantes sólo los primeros 5-8 minutos. La degradación de las proteínas ocurre dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección [48,103]. Debido a que las glucosidasas y las proteasas bacterianas descomponen la organización macromolecular de las mucinas, esto conduce a la precipitación de las proteínas, acompañado por una disminución de la viscosidad [139]. De este modo, el comportamiento reológico de la saliva en la curva de desaceleración podría encontrarse modificada, tanto por las tasas de cizallamiento como por el tiempo, pues la obtención de datos para la curva de aceleración toma aproximadamente 10 minutos.

Curvas de flujo en la desaceleración

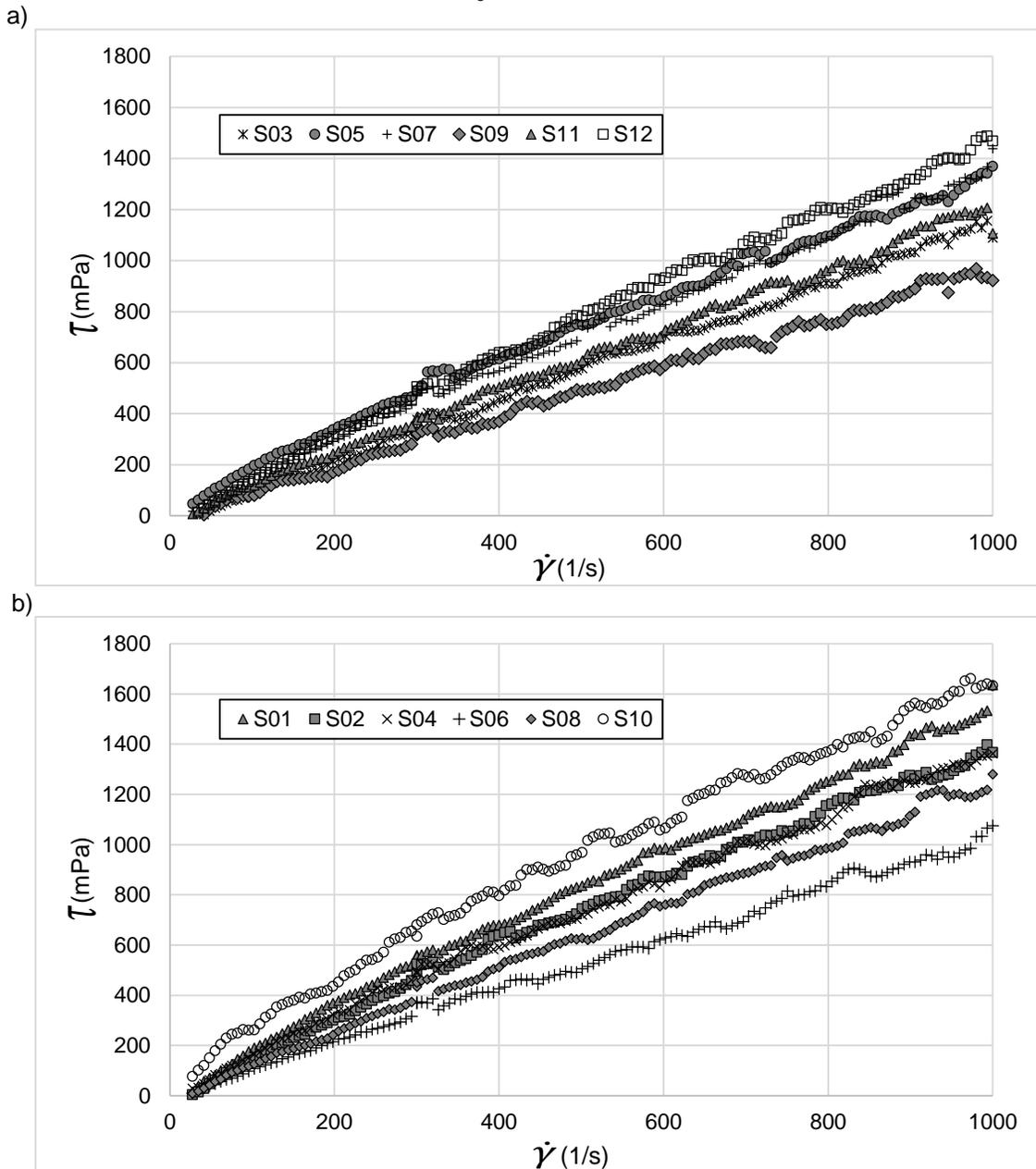


Figura 4.12. Curvas de flujo de las muestras de saliva para cada grupo, durante la rampa de desaceleración constante de 1000 a 0 1/s para a) grupo 1 y b) grupo 2.

Podemos notar, en contraste con lo reportado, que la viscosidad en la desaceleración aumentó ligeramente para ambos grupos. Siendo mayor para el grupo 2, por lo que una posible explicación podría ser un cambio en la disposición macromolecular de las cadenas de mucina debido a la acción mecánica, es decir,

la red polimérica de la saliva con su topología característica enredada podría estar alineándose a la dirección del flujo. Otra explicación podría ser la evaporación de parte de la muestra durante la toma de datos, pues la reducción del contenido de agua disminuye el grado de hidratación de la maraña de los polímeros de mucina y puede causar un aumento en la viscosidad [124] y esto determina críticamente las propiedades reológicas [140] de la saliva.

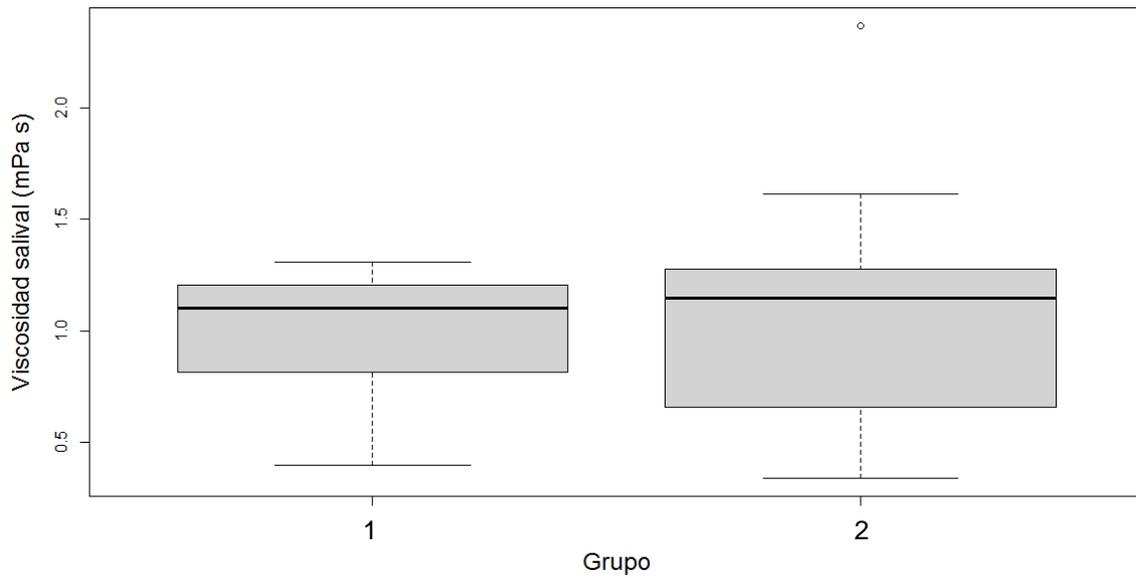
Los estudios consultados durante la revisión bibliográfica no reportan las curvas de desaceleración, por lo que no se pueden realizar inferencias certeras respecto a estos resultados. Por lo que podría ser importante continuar el estudio del comportamiento de la saliva en tasas de cizalla altas, para considerarlo durante el diseño de biosensores para el diagnóstico no invasivo de enfermedades.

Al realizar la prueba de t de *Student* pareada para la diferencia de medias, se pudo concluir con un 95% de confiabilidad, que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos para la viscosidad en la aceleración ($t = 0.445$), ni para la viscosidad en la desaceleración ($t = 1.697$), ya que ambos están dentro de los valores críticos de la distribución ($t < -2.201$ o $t > 2.201$). De manera gráfica, se observa lo anterior en la figura 4.13. mediante un diagrama de caja y bigotes.

Los resultados del presente trabajo difieren con lo reportado en la literatura, ya que las investigaciones sugieren que pueden ocurrir cambios en la viscoelasticidad de la saliva relacionados con el envejecimiento, particularmente en la saliva secretada en condiciones de reposo que contiene concentraciones relativamente altas de saliva producida por las glándulas submandibulares, sublinguales y palatinas, que contienen concentraciones altas de mucinas y de glicoproteínas [91,124]. Khaldoun *et al.* [119] y Zussman *et al.* [124] encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad. Reportaron un aumento en la viscosidad salival en adultos mayores, con un aumento del doble cuando se comparó con los otros grupos de edad. Asimismo, Gittings *et al.* [117] reportaron que la viscosidad de la saliva fue significativamente mayor para el grupo de edad 28 – 35 años en comparación con los participantes de 20–27 años.

a)

Comparación de la concentración de proteínas salivales totales en la aceleración



b)

Comparación de la concentración de proteínas salivales totales en la desaceleración

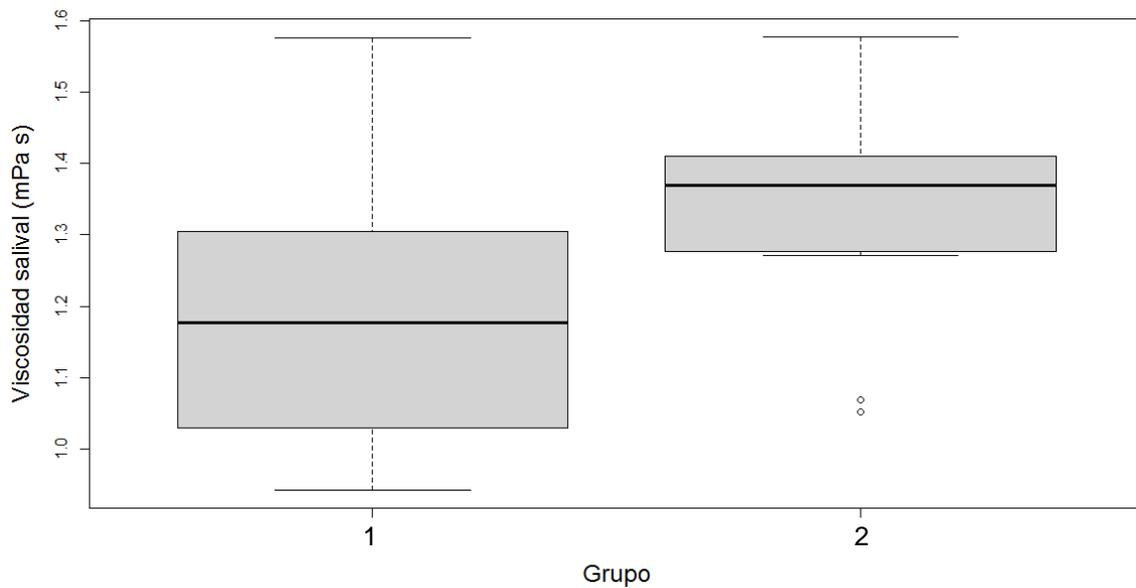


Figura 4.13. Diagramas de caja y bigotes con la comparación de la viscosidad (mPa·s) entre los grupos estudiados en a) la aceleración de 300 a 1000 1/s y, b) la desaceleración de 1000 a 300 1/s.

No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo están justificados, pues las participantes del grupo evaluado de mayor edad, se considerarían en la adultez

media (40 a 60 años), mientras que los participantes de los estudios antes mencionados eran adultos mayores (> 60 años).

4.1.5. Correlaciones

Finalmente, la figura 4.14. resume e ilustra el análisis de correlación utilizando el coeficiente de Pearson entre las variables analizadas para ambos grupos. Los valores que se observan en el diagrama de dispersión, ya sea de color azul o rojo, son los coeficientes de correlación r que miden la intensidad y la dirección de una relación lineal entre dos variables. De manera gráfica, se representan con óvalos.

Gráfico de correlación de Pearson

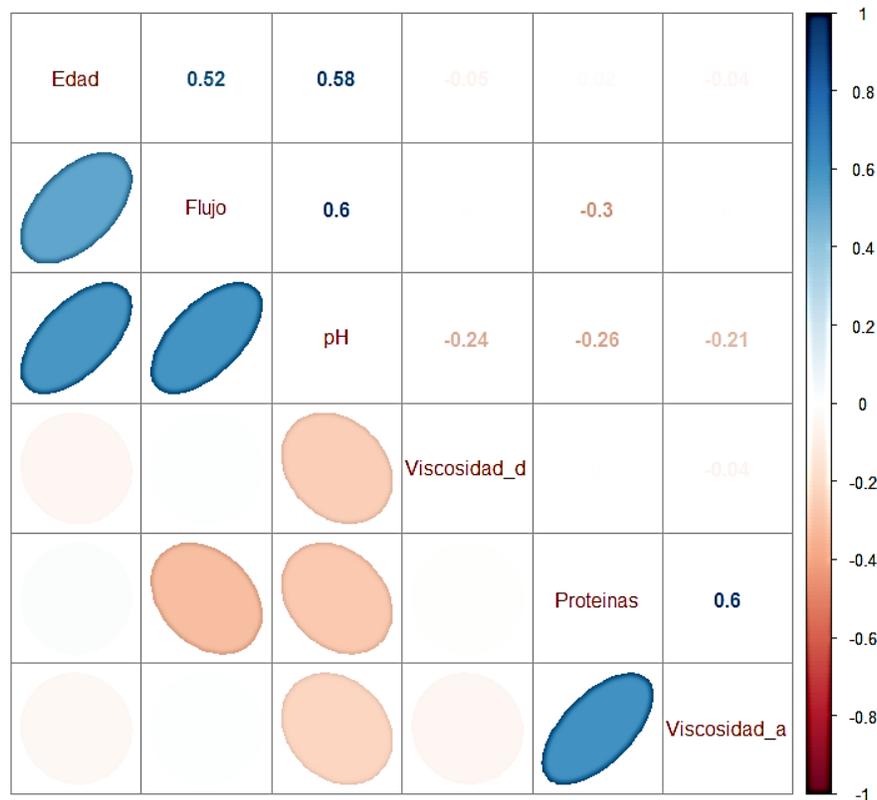


Figura 4.14. Diagrama de correlación de Pearson entre las variables analizadas para ambos grupos, donde se encuentran reportados los valores de r .

El valor de r se encuentra entre +1 y -1. Un valor cercano a 1, indica una fuerte relación entre las dos variables, en la escala de color, los valores cercanos a 1 presentan tonalidades más oscuras. Esto significa que los cambios en una variable están fuertemente correlacionados con los cambios en la segunda variable. Si el

valor es positivo, en la figura se encuentra representado de color azul y significa que a medida que una variable aumenta de valor, la segunda variable también aumenta de valor. De manera similar, un valor negativo, que en la figura se encuentra representado de color rojo, significa que a medida que una variable disminuye en valor, la segunda variable también disminuye en valor [141].

En cuadro 4.9. se reportan solo los valores p de la correlación de Pearson que mostraban relación moderada (>0.5) y también se reportan los valores p de la correlación de Kendall para los datos no paramétricos como el flujo salival y el pH.

Correlaciones de las variables evaluadas

Correlación	Pearson		Kendall	
	r	p	tau	p
Edad – Flujo salival	0.523	0.081	0.326	0.146
Edad – pH	0.583	0.047	0.445	0.087
Flujo salival – pH	0.596	0.041	0.479	0.062
Concentración de proteínas totales – Viscosidad en la aceleración	0.602	0.038*		

*estadísticamente significativo

Cuadro 4.9. Valores de la correlación para las variables evaluadas de ambos grupos.

De este modo, se encontró una moderada correlación positiva ($r = 0.602$), estadísticamente significativa entre la concentración de proteínas totales y la viscosidad promedio en la aceleración ($p = 0.038$). Esto en concordancia con lo reportado por Inoue *et al.* [105] quienes encontraron una correlación positiva entre la concentración total de proteínas y la viscosidad como efecto de la presencia de MUC5B. Este aumento de la viscosidad se relaciona con una mayor concentración de proteínas salivales, presumiblemente por la reducción en el contenido de agua en la saliva [124]. Esto es causado por la interacción entre el agua y las mucinas; la cantidad de agua es inversamente proporcional a la concentración de mucinas, que genera una consistencia salival más viscosa, especialmente cuando existe una reducción de la cantidad de agua, resultando en un aumento relativo de la concentración de mucinas [133]. En este sentido, Ueno *et al.* [51] encontraron que la viscosidad de la saliva está relacionada negativamente con la tasa de flujo de la saliva: a mayor viscosidad, menor tasa de flujo.

Respecto a las demás correlaciones, los resultados del trabajo actual fueron consistentes con los de Preoteasa *et al.* [96], pues mostraron que la viscosidad y el pH salival son dos parámetros independientes y sus cambios no tienen relación entre sí. Asimismo, Inoue *et al.* [105] no detectaron ninguna correlación entre la viscosidad y el flujo salival.

En contraste con los resultados obtenidos en este trabajo para la edad y la concentración total de proteínas ($r = 0.016$, $p = 0.96$), Vibhakar *et al.* [49] demostraron la existencia de una baja correlación positiva. No obstante, los grupos evaluados variaron de entre 11 años y más de 30 años de edad.

En conclusión, para revalidar cualquiera de los resultados reportados, es necesario aumentar el número de participantes.

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIONES

La evaluación de las tasas de flujo salival, el pH, la viscosidad y la concentración de proteínas totales son características que deben analizarse en poblaciones sanas para ser utilizados como referencia para evaluar cambios relacionados con el envejecimiento y la presencia de enfermedades. Esto enfocado al desarrollo de estrategias del cuidado de la salud y la mejora de la calidad de vida de la población, considerando el intenso proceso de envejecimiento demográfico que está ocurriendo en nuestro país.

Con los datos obtenidos en este trabajo, se puede concluir que se advierten diferencias estadísticamente significativas en el flujo salival y el pH. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de esta prueba piloto para las variables de concentración de proteínas y viscosidad tanto en la aceleración como en la desaceleración. Lo anterior, nos permiten aportar perspectivas de interés para el uso de las características salivales como biomarcadores en grupos jóvenes con factores de riesgo, relacionados con el estrés oxidativo.

Para el grupo 1, se obtuvo un flujo salival promedio de 0.18 (± 0.071) ml/min, mientras que para el grupo 2 fue de 0.33 (± 0.198) ml/min. Respecto a la determinación de pH, se obtuvo un pH promedio de 6.17 (± 0.408) para el grupo 1 y para el grupo 2 un promedio de 6.5 (± 0.548). El promedio de la concentración de proteínas totales salivales, hallado para el grupo 1 fue de 0.57 (± 0.200) mg/ml, mientras que para el grupo 2, el promedio fue de 0.61 (± 0.167) mg/ml. Por otro lado, la viscosidad en la aceleración fue de 0.92 mPa·s (± 0.254) para el grupo 1 y para el grupo 2 fue de 0.91 mPa·s (± 0.384). Mientras que en la desaceleración el valor promedio fue de 1.12 (± 0.220) mPa·s para el grupo 1 y, para el grupo 2 fue de 1.20 (± 0.375) mPa·s. Se encontró una correlación de Pearson moderadamente positiva y estadísticamente significativa entre la concentración de proteínas totales y la viscosidad promedio en la aceleración ($r = 0.602$, $p = 0.038$), mientras que para las

demás características evaluadas no se hallaron correlaciones estadísticamente significativas.

Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, pues las participantes del grupo 2 eran más jóvenes en comparación con los participantes de los estudios consultados durante la revisión bibliográfica, y además se encontraban libres de enfermedades sistémicas o locales; lo anterior esta aunado, al número de participantes evaluadas en este trabajo. Por lo tanto, se sugiere que se aumente el número de participantes para: fortalecer resultados, obtener mayor certeza estadística y explorar si existen o no diferencias en las características salivales con la edad además de disminuir las barras de error que se observan en los diagramas de cajas y bigotes.

Considerando las limitaciones inherentes a un estudio de corte transversal y el tamaño de muestra, los resultados obtenidos son significativos, pues estuvieron dentro del rango de lo previamente reportado, aún con las dificultades para comparar los resultados previos con los presentados en este trabajo, principalmente por la composición de los grupos que eran de edades mixtas, edades mayores o bien de ambos géneros.

En el presente estudio piloto se logró exitosamente desarrollar y ensayar el protocolo para la obtención y procesamiento de muestras de saliva, que demostró ser reproducible, pues se hace énfasis nuevamente, en que los valores concordaron con lo previamente reportado en la literatura.

Además, se optimizó el tiempo para evitar la degradación de muestras y no mantener a las participantes en el laboratorio más tiempo del estrictamente necesario. También permitió la identificación de posibles áreas problemáticas y deficiencias en el proyecto, así como en los instrumentos de investigación y detalles puntuales en el protocolo antes de su implementación en estudio posteriores.

Uno de los hallazgos más importantes dentro de la metodología, fue la evaporación de la muestra de saliva durante el análisis reológico, lo cual podría repercutir en el

manejo, el almacenamiento (si es necesario) y en el análisis de la muestra, pues no tenemos certeza de si las proteínas se concentran o sufren algún otro proceso.

Es destacable que el protocolo de este trabajo fue evaluado y autorizado previamente para su realización en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM), no obstante, fue llevado a la práctica en la Facultad de Ciencias de la UAEMéx. Por lo que el protocolo fue entregado para ser evaluado del mismo modo por el Comité de Ética de la Investigación del CICMED.

Cabe señalar, que en el presente trabajo se desarrolló una metodología útil para la caracterización de la saliva y los resultados pueden utilizarse como base de referencia para el planteamiento de estudios posteriores y el consiguiente desarrollo de nuevas tecnologías para mejorar el monitoreo del estado de salud de los pacientes, pues el uso de la saliva como biofluido de uso rutinario en la clínica ofrecerá la ventaja de realizar evaluaciones médicas en cualquier entorno clínico, a un bajo costo y de manera no invasiva. Con la emergente epidemia mundial de trastornos relacionados con la edad, este enfoque es de vital importancia al igual que el estudio de poblaciones jóvenes sanas.

CAPÍTULO 6.

PERSPECTIVAS

El uso cotidiano de fluidos orales en aplicaciones relacionadas con la biotecnología y la atención médica, especialmente en el campo del diagnóstico de enfermedades relacionadas con la edad, pronto será una realidad dadas todas sus ventajas.

En este sentido, el planteamiento del protocolo y su realización, permitieron identificar las fases de la metodología que son susceptibles a modificaciones para optimizar el proceso y mejorar la obtención de resultados.

Los puntos a resaltar son: 1) evitar la toma muestras durante periodos de evaluaciones finales; 2) considerar la evaluación del estado de salud oral por un odontólogo y la evaluación de salud general, por un médico, para no depender de la información subjetiva proporcionada en el cuestionario de evaluación, y 3) solicitar en el cuestionario un seguimiento de consumo de líquidos.

Respecto a la toma y manejo de muestras, se recomienda: 1) realizar la prueba de grado de hidratación en las participantes, según lo reportado por Jain *et al* [142] y 2) utilizar un vórtex para homogenizar la muestra de saliva con el reactivo de Bradford. Para la medición de pH: 1) hacer uso de un potenciómetro o en su defecto tiras diseñadas para su uso en muestras de saliva y 2) realizar la medición de capacidad de buffer a través del método de Ericsson.

Una perspectiva adicional, para etapas subsecuentes del proyecto, es efectuar el análisis superficial de películas de saliva utilizando un microscopio de fuerza atómica, con las muestras antes y después de ser sometidas al análisis reológico. Además, se pueden considerar diferentes tiempos de almacenamiento a temperatura ambiente y en hielo, como se recomienda en diversos protocolos, para conocer el cambio a nivel de estructura en la saliva.

Asimismo, se propone realizar estudios de cohortes prospectivos con las participantes evaluadas en este trabajo, determinando las características fisicoquímicas salivales mes con mes, durante un período de al menos seis meses.

Esta tesis es la base para el desarrollo de una metodología enfocada al manejo de muestras de saliva, su estandarización y a la descripción de los indicadores fisicoquímicos presentes en la saliva de mujeres sanas. De este modo, este estudio podría considerarse como referencia para estudios posteriores a largo plazo que incluirían mujeres diagnosticadas con cáncer de mama. Adicionalmente la caracterización sirve de referente en el diseño de biosensor ideado para el uso de fluidos orales.

CAPÍTULO 7.

ANEXOS

Anexo 7.1. Aval del Comité de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
COMISIÓN DE ÉTICA



Los Reyes Iztacala a 08/03/2018

Oficio: **CE/FESI/032018/1238**

DR. ROSALES IBAÑEZ RAUL

Presente:

En atención a su solicitud de aval, por la Comisión de Ética de esta facultad, para su proyecto denominado **Determinación de autoanticuerpos en líquido crevicular, saliva, sangre y mucosa oral para el posible diagnóstico temprano de cáncer de mama.** que va a someter a CONACYT.

Esta comisión acordó la siguiente opinión técnica:

Avalado sin recomendaciones

Sin otro particular por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración y aprovechamos la oportunidad para enviarle un atento saludo y nuestro respeto académico.

Atentamente

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido
Presidente



Anexo 7.2. Aval del Comité de Ética en Investigación del Centro de Investigación en Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma del Estado de México.



Universidad Autónoma del Estado de México
Centro de Investigación en Ciencias Médicas
Comité de Ética en Investigación

Toluca, México a 9 de abril de 2019.

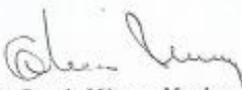
LIZETH DORANTES GÓMEZ
PRESENTE

Investigadora responsable del protocolo de tesis de licenciatura No. 2019P04 "*Caracterización fisicoquímica de saliva y propuesta de una metodología para la búsqueda de un biomarcador de detección temprana para cáncer de mama*", **aprobado** con el registro **2019/06** del CEI del CICMED. Hago de su conocimiento que usted, la Dra. Lorena Romero Salazar y el Dr. Raúl Rosales Ibáñez, **han adquirido los siguientes compromisos:**

1. Para realizar cualquier modificación del protocolo aprobado (incluyendo el título) deberá someter al Comité la ENMIENDA correspondiente para su análisis y en su caso aprobación.
2. Anualmente informar los avances del proyecto, resultados generales, así como de manera INMEDIATA la presencia de efectos adversos.
3. Deberá hacer llegar al término de la investigación un informe dirigido al Presidente del CEI, bajo el siguiente formato.
 - o Nombre del responsable del proyecto y tutores, con firma autógrafa.
 - o Fecha de aprobación y número de registro del CEI (anexar copia de la carta de aprobación).
 - o Productos obtenidos: libro, capítulo de libro, artículo, ponencias, tesis, etc (anexar copia de los documentos – portada, índice, primera página, acta de examen –).

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2019, Año del 75 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"

Comité de Ética en Investigación
Centro de Investigación en Ciencias Médicas


Dr. Octavio Márquez Mendoza
Presidente del CEI


M. en C.S. Julio Basilio Robles Navarro
Coordinador del CICMED

c.c.p. Dra. Lorena Romero Salazar. Tutor.
c.c.p. Dr. Raúl Rosales Ibáñez. Asesor.
c.c.p. Archivo

Av. Jesús Carranza n° 205,
Col. Universidad, Toluca, Méx.
C.P. 50130
Tels. (01722)212 80 27
219 41 72



CAPÍTULO 8.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Franceschi, P. Garagnani, C. Morsiani, M. Conte, A. Santoro, A. Grignolio, D. Monti, M. Capri, S. Salvioli, “*The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates*”, *Front. Med.* 5, 2018.
- [2] D. Belsky, A. Caspi, R. Houts, H. Cohen, D. Corcoran, A. Danese, H. Harrington, S. Israel, M. Levine, J. Schaefer, K. Sugden, B. Williams, A. Yashin, R. Poulton y T. Moffitt, “*Quantification of biological aging in young adults*”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, núm. 30, pp. E4104–E4110, 2015.
- [3] I. Pereira, C. Brasileiro, N. Kleperon, M. Abreu, T. da Silva, R. Mesquita y T. Amaral, “*Comparative study of oral and salivary parameters in patients with and without loss of bone mass*”, *Braz. Oral Res.*, vol. 32, pp. 1–7, 2018.
- [4] M. Tosato, V. Zamboni, A. Ferrini, y M. Cesari, “*The aging process and potential interventions to extend life expectancy*”, *Clin. Interv. Aging*, vol. 2, núm. 3, pp. 401–412, 2007.
- [5] M. Blagosklonny y M. Hall, “*Growth and aging: a common molecular mechanism*”, *Aging (Albany. NY)*, vol. 1, núm. 4, pp. 357–362, 2009.
- [6] K. Singh, “*Mitochondrial Dysfunction Is a Common Phenotype in Aging and Cancer*”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1019, núm. 1, pp. 260–264, 2004.
- [7] K. González, “*Envejecimiento demográfico en México: análisis comparativo entre las entidades federativas*”, en *La situación demográfica de México 2015*, Consejo Nacional de Población, pp. 113–129, 2015.
- [8] V. Myakotnykh, D. Berezina, T. Borovkova, y I. Gavrilov, “*Comparative biochemistry of aging process in men and women*”, *Adv. Gerontol.*, vol. 5, núm. 2, pp. 72–79, 2015.
- [9] M. Gubbels, “*Sex, the aging immune system, and chronic disease*”, *Cell. Immunol.*, vol. 294, núm. 2, pp. 102–110, 2015.
- [10] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, “*Mujeres y hombres en México 2015*”, Ciudad de México, 2015. [En línea]. Disponible en: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvini/inegi/productos/nueva_estruc/702825075019.pdf. [Consultado: 15-nov-2018].
- [11] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, “*Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido*”, Tabulados básicos, 2016. [En línea]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>. [Consultado: 15-nov-2018]. A. Aviv, “*Cardiovascular diseases, aging, and the gender gap in human longevity*”, *J. Am. Soc. Hypertens.*, vol. 1, núm. 3, pp. 185–188, 2007.
- [12] M. Javid, A. Ahmed, R. Durand y S. Tran, “*Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases*”, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* Vol. 6, pp. 67–76, 2016.
- [13] P. Sharma y S. Dwivedi, “*Prospects of Molecular Biotechnology in Diagnostics: Step Towards Precision Medicine*”, *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 32, núm. 2, pp. 121–123, 2017.
- [14] N. Neki, “*Saliva as a diagnostic tool*”, *IAIM*, vol. 3, 164–170, 2016.

- [15] I. Amarakoon, C. Hamilton, S. Mitchell, P. Tennant, y M. Roye, “*Biotechnology*”, en Pharmacognosy, S. Badal y R. Delgoda, Eds. Boston: Academic Press, pp. 549–563, 2017.
- [16] OECD, “*Biotechnology, single definition*”, Glossary of Statistical Terms, 2001. [En línea]. Disponible en: <https://stats.oecd.org/glossary/detail.asp?ID=219>. [Consultado: 21-oct-2018].
- [17] E. DaSilva, “*The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind*”, Electron. J. Biotechnol., vol. 7, núm. 3, 2012.
- [18] P. Pham, “*Medical Biotechnology: Techniques and Applications*”, en Omics Technologies and Bio-Engineering, D. Barh y V. Azevedo, Eds. Academic Press, pp. 449–469, 2018.
- [19] S. Schleidgen, C. Klingler, T. Bertram, W. Rogowski, y G. Marckmann, “*What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review.*”, BMC Med. Ethics, vol. 14, p. 55, 2013.
- [20] S. Amur, R. Becker, A. Chakravarty, D. Cho, O. Faris, S. Fitzpatrick, N. Hunter, I. Irony, S. Lababidi, C. Leptak, W. Mattes, E. Mishina, K. O’Callaghan, M. Pacanowski, E. Papadopoulos, V. Peiris, R. Puri, M. Robb, H. Rogers, R. Sherman, R. Sridhara, R. Temple, A. Trentacosti, P. Turfle, S. Wang, H. Hamilton, P. McInnes, L. McShane y M. Shah, “*Biomarker, BEST (Biomarkers, EndpointS, other Tools) Resour*”, 2016. Food and Drug Administration (US); [En línea] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338449/> Co-published by National Institutes of Health (US), Bethesda (MD). [Consultado: 21-oct-2018].
- [21] K. Jain, “*Introduction*”, en The Handbook of Biomarkers, K. K. Jain, Ed. Basel: Springer Science+Business Media, pp. 1–21, 2010.
- [22] K. Strimbu y J. Tavel, “*What are Biomarkers?*”, Curr Opin HIV AIDS, vol. 5, núm. 6, pp. 463–466, 2011.
- [23] J. Dai, S. Sun, J. Peng, H. Cao, N. Zheng, J. Fang, Q. Li, J. Jiang, Y. Zhang y Y. Hu, “*Exploration of Macro-Micro Biomarkers for Dampness-Heat Syndrome Differentiation in Different Diseases*”, Evidence-Based Complement. Altern. Med. pp. 1–9, 2013.
- [24] R. Mayeux, “*Biomarkers: Potential Uses and Limitations*”, NeuroRx. 1, pp. 182–188, 2004.
- [25] J. Schneider, M. Sidhu, C. Doucet, N. Kiss, R. Ohsfeldt y D. Chalfin, “*Economics of cancer biomarkers*”, Per. Med. vol. 9, pp. 829–837, 2012.
- [26] V. Kraus, B. Burnett, J. Coindreau, S. Cottrell, D. Eyre, M. Gendreau, J. Gardiner, P. Garnero, J. Hardin, Y. Henrotin, D. Heinegård, A. Ko, S. Lohmander, G. Matthews, J. Menetski, R. Moskowitz, S. Persiani, R. Poole, J. Rousseau y M. Todman, “*Application of Biomarkers in the Development of Drugs Intended for the Treatment of Osteoarthritis: OARSI FDA Osteoarthritis Biomarkers Working Group*”, Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, vol. 19, núm. 5. pp. 515–542, 2011.
- [27] E. Drucker y K. Krapfenbauer, “*Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine*”, EPMA J. vol. 4, núm. 7, 2013.
- [28] H. Kamel y H. Al-Amodi, “*Cancer Biomarkers*”, en: Role Biomarkers Med., M. Wang, F.A. Witzmann (Eds.), IntechOpen, 2016.
- [29] M. Pepe, Z. Feng, H. Janes, P. Bossuyt y J. Potter, “*Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: Standards for study design*”, J. Natl. Cancer Inst., vol. 100, pp. 1432–1438, 2008.
- [30] N. Gandur, “*Manejo del paciente oncológico*”, en: Man. Enfermería Oncológica, 1a ed., Instituto Nacional del Cáncer, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, pp. 10–12, 2014.

- [31] S. Arif, S. Qudsia, S. Urooj, N. Chaudry, A. Arshad, y S. Andleeb, “*Blueprint of quartz crystal microbalance biosensor for early detection of breast cancer through salivary autoantibodies against ATP6AP1*”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 65, pp. 62–70, 2015.
- [32] S. Chopra y S. Peter, “*Screening for coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus: An evidence-based review*”, *Indian J. Endocrinol. Metab.* vol. 16, núm. 94, 2012.
- [33] G. Dakubo, “*Liquid Biopsy and Cancer Biomarkers*”, en *Cancer Biomarkers in Body Fluids. Principles*, Cham: Springer International Publishing, pp. 75–102, 2016.
- [34] M. Feig, N. Jehmlich, U. Völker, y E. Hammer, “*Personalized proteomics of human biofluids for clinical applications*”, en *Advanced LC-MS applications for proteomics*, S. R. Pennington, Ed. Future Science, 2013.
- [35] S. Chojnowska, T. Baran, I. Wilińska, P. Sienicka, I. Cabaj-Wiater, y M. Knaś, “*Human saliva as a diagnostic material*”, *Adv. Med. Sci.*, vol. 63, núm. 1, pp. 185–191, 2018.
- [36] E. Porto, D. Assad, H. Chardin, D. Gozal, G. De Luca, A. Acevedo, y E. Guerra, “*Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review*”, *Crit. Rev. Oncol. / Hematol.*, vol. 110, pp. 62–73, 2017.
- [37] T. Dong y N. Pires, “*Immunodetection of salivary biomarkers by an optical microfluidic biosensor with polyethylenimine-modified polythiophene-C70organic photodetectors*”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 94, pp. 321–327, 2017.
- [38] A. Mohiti, A. Ghadiri-anari, y F. Entezary, “*Comparison of pH and viscosity of unstimulated saliva in Type 2 diabetic patients and control group*”, *J. Dent. Sch.*, vol. 35, núm. 3, pp. 89–92, 2017.
- [39] S. Williamson, C. Munro, R. Pickler, M. J. Grap, y R. K. Elswick, “*Comparison of Biomarkers in Blood and Saliva in Healthy Adults*”, *Nurs. Res. Pract.*, vol. 2012, pp. 1–4, 2012.
- [40] S. Al Kawas, Z. Rahim, y D. Ferguson, “*Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease*”, *Arch. Oral Biol.*, vol. 57, núm. 1, pp. 1–9, 2012.
- [41] K. Ngamchuea, K. Chaisiwamongkhol, C. Batchelor, y R. Compton, “*Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers-a tutorial review*”, *Analyst*, vol. 143, núm. 1, pp. 81–99, 2018.
- [42] G. Desai, “*Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance*”, *World J. Diabetes.* vol. 5, pp. 730–738, 2014.
- [43] B. Cuevas y J. Santiago, “*Saliva: A Fluid of Study for OMICS*”, *Omi. A J. Integr. Biol.*, vol. 18, núm. 2, pp. 87–97, 2014.
- [44] E. Kubala, P. Strzelecka, M. Grzegocka, D. Lietz-Kijak, H. Gronwald, P. Skomro, y E. Kijak, “*A Review of Selected Studies That Determine the Physical and Chemical Properties of Saliva in the Field of Dental Treatment*”, *Biomed Res. Int.*, pp. 1–14, 2018.
- [45] K. Kaczor, C. Carreras, K. Aro, M. Tu, F. Garcia, y D. Wong, “*Saliva diagnostics – Current views and directions*”, *Exp. Biol. Med.*, vol. 242, núm. 5, pp. 459–472, 2017.
- [46] R. Nagler y O. Hershkovich, “*Relationships between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile*”, *Arch. Oral Biol.*, vol. 50, núm. 1, pp. 7–16, 2005.
- [47] M. Navazesh y S. Kumar, “*Measuring salivary flow*”, *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 139, núm. May, p. 35S–40S, 2008.

- [48] A. Foglio-Bonda, F. Pattarino, y P. Foglio-Bonda, “*Kinematic viscosity of unstimulated whole saliva in healthy young adults*”, Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., vol. 18, núm. 20, pp. 2988–2994, 2014.
- [49] P. Vibhakar, S. Patankar, M. Yadav, y P. Vibhakar, “*Salivary Total Protein Levels and their correlation to Dental Caries*”, Int. J. oral Maxillofac. Pathol., vol. 4, núm. 3, pp. 13–16, 2013.
- [50] C. Alves, M. Brandão, J. Andion, y R. Menezes, “*Use of graduated syringes for measuring salivary flow rate: A pilot study*”, Braz. Dent. J., vol. 21, núm. 5, pp. 401–404, 2010.
- [51] M. Ueno, S. Takeuchi, S. Takehara, y Y. Kawaguchi, “*Saliva viscosity as a potential risk factor for oral malodor*”, Acta Odontol. Scand., vol. 72, núm. 8, pp. 1005–1009, 2014.
- [52] E. Sajewicz, “*Effect of saliva viscosity on tribological behaviour of tooth enamel*”, Tribol. Int., vol. 42, núm. 2, pp. 327–332, 2009.
- [53] M. Hussein, H. Elnazer, S. Shalaby, M. Makhlof, y T. Yosef, “*Salivary pH Changes in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma*”, EC Gastroenterol. Dig. Syst., vol. 1, núm. 3, pp. 99–106, 2016.
- [54] A. Justino, R. Teixeira, L. Peixoto, O. Jaramillo, y F. Espindola, “*Effect of saliva collection methods and oral hygiene on salivary biomarkers*”, Scand. J. Clin. Lab. Invest., vol. 77, núm. 6, pp. 415–422, 2017.
- [55] F.R. Vogenberg, C. Isaacson Barash y M. Pursel, “*Personalized medicine: part 1: evolution and development into theranostics*”. P T. vol. 35, pp. 560–576, 2010.
- [56] S. Su, T. Chuen, W. Poon y V. Thongboonkerd, “*Human Body Fluid*”, Biomed Res. Int. pp. 2–4, 2013.
- [57] A. Balfe, S. Barry, O. Blake, D. Cannon, M. Healy, M. Kilbane, P. McGing, R. O’Kelly y P. O’Shea, “*The Biochemistry of Body Fluids*”, pp. 17–19, 2009.
- [58] P. Lin, S. Yeh, W. Huang, H. Chen, C. Chen, J. Sheu, C. Lin y Y. Huang, “*Research performance of biomarkers from biofluids in periodontal disease publications*”, J. Dent. Sci. vol. 10, pp. 61–67, 2015.
- [59] D. Caprette, “*Components of Mammalian Blood*”, Experimental Biosciences, 2012.
- [60] E. Brujan, “*Non-Newtonian Fluids*”, en Cavitation in Non-Newtonian Fluids. With Biomedical and Bioengineering Applications, E. Brujan, Ed. Bucharest: Springer, pp. 1–48, 2011.
- [61] P. Lavříková y J. Fontana, “*Contents of Blood Plasma*”, en Functions of Cells and Human Body, 2015. [En línea]. Disponible en: <http://fblt.cz/en/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/2-slozky-krevni-plazmy/> [Consultado: 15-nov-2018].
- [62] S. Jadoon, S. Karim, M. Akram, A. Kalsoom Khan, M. Zia, A. Siddiqi, y G. Murtaza, “*Recent developments in sweat analysis and its applications*”, Int. J. Anal. Chem., 2015.
- [63] S. Al-Muhtaseb, “*Serum and saliva protein levels in females with breast cancer*”, Oncol. Lett., vol. 8, núm. 6, pp. 2752–2756, 2014.
- [64] P. Jornet, “*Fisiología salival*”, en Saliva y salud dental, J. M. A. Silla, Ed. Valencia: Promolibro, 1998.
- [65] N. Ghallab, “*Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence*”, Arch. Oral Biol., vol. 87, pp. 115–124, 2018.

- [66] Florida Center for Instructional Technology, “*Salivary glands*”, Salivary glands, 2018. [En línea]. Disponible en: http://etc.usf.edu/clipart/19900/19916/salivarygld_19916.htm. [Consultado: 15-nov-2018].
- [67] D. Lima, D. Diniz, S. Moimaz, D. Sumida, y A. Okamoto, “*Saliva: reflection of the body*”, *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 14, núm. 3, pp. 184–188, 2010.
- [68] J. Mystkowska, “*Physicochemical and Rheological Properties of Potential Additives for Synthetic Saliva Preparation*”, *Solid State Phenom.*, vol. 220–221, pp. 640–645, 2015.
- [69] C. Dawes, A. Pedersen, A. Villa, J. Ekström, G. Proctor, A. Vissink, D. Aframian, R. McGowan, A. Aliko, N. Narayana, Y. Sia, R. Joshi, S. Jensen, A. Kerr, y A. Wolff, “*The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI*”, *Arch. Oral Biol.*, vol. 60, núm. 6, pp. 863–874, 2015.
- [70] J. Ekström, N. Khosravani, M. Castagnola, y I. Messana, “*Saliva and the Control of Its Secretion*”, en *Dysphagia*, pp. 19–47, 2012.
- [71] M. Shaila, G. Pai, y P. Shetty, “*Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis*”, *Journal of Indian Society of Periodontology*, vol. 17, núm. 1. India, pp. 42–46, 2013.
- [72] S. Prasad, A. Tyagi, y B. Aggarwal, “*Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases*”, *Exp. Biol. Med.*, vol. 241, núm. 8, pp. 783–799, 2015.
- [73] S. Malathi, E. Rajesh, y N. Aravindha, “*Saliva as a diagnostic tool: a review*”, *Biomed. Pharmacol. J.*, vol. 9, núm. 1, pp. 9–14, 2016.
- [74] A. Roja, H. Nelakurthi, A. Sudarshan, “*Oral Fluid based Biosensors: A Novel Method for Rapid and Noninvasive Diagnosis*”, *Indian J. Dent. Sci.*, vol. 9, pp. 126–32, 2017.
- [75] M. Villiger, R. Stoop, T. Vetsch, E. Hohenauer, M. Pini, P. Clarys, F. Pereira, y R. Clijsen, “*Evaluation and review of body fluids saliva, sweat and tear compared to biochemical hydration assessment markers within blood and urine*”, *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 72, núm. 1, pp. 69–76, 2018.
- [76] E. Pernot, E. Cardis, y C. Badie, “*Usefulness of saliva samples for biomarker studies in radiation research*”, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 23, núm. 12, pp. 2673–2680, 2014.
- [77] Ó. Rapado, B. Majem, L. Muínelo, R. López, y M. Suarez, “*Cancer Salivary Biomarkers for Tumours Distant to the Oral Cavity*”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, núm. 9, p. 1531, 2016.
- [78] T. Nonaka y D. Wong, “*Saliva-Exosomics*” in *Cancer: Molecular Characterization of Cancer-Derived Exosomes in Saliva*, 1a ed., vol. 42. Elsevier Inc., 2017.
- [79] S. Yotsukura y H. Mamitsuka, “*Evaluation of serum-based cancer biomarkers: A brief review from a clinical and computational viewpoint*”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 93, núm. 2, pp. 103–115, 2015.
- [80] Early Detection Research Network, “*Early Detection Research Network. Application Guidelines*”, Application Guidelines, 2007. [En línea]. Disponible en: <https://edrn.nci.nih.gov/EDRN RFA guidelines-v4.pdf>. [Consultado: 13-feb-2019].
- [81] Early Detection Research Network, “*The Early Detection Research Network: Biomarker Reference Laboratories*”, Overview Information, 2009. [En línea]. Disponible en: <https://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/rfa-ca-09-019.html>. [Consultado: 13-feb-2019].

- [82] N. Henry y D. F. Hayes, "Cancer biomarkers", *Mol. Oncol.*, vol. 6, núm. 2, pp. 140–146, 2012.
- [83] C. Schafer, J. Schafer, M. Yakob, P. Lima, P. Camargo, y D. Wong, "Saliva diagnostics: Utilizing oral fluids to determine health status", *Saliva Secret. Funct.*, vol. 24, pp. 88–98, 2014.
- [84] R. Qin, A. Steel, y N. Fazel, "Oral mucosa biology and salivary biomarkers", *Clin. Dermatol.*, vol. 35, núm. 5, pp. 477–483, 2017.
- [85] L. Nunes y D. de Macedo, "Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: potential and limitations", *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 49, núm. 4, pp. 247–255, 2013.
- [86] A. Syrjälä, L. Raatikainen, K. Komulainen, M. Knuutila, P. Ruoppi, S. Hartikainen, R. Sulkava y P. Ylöstalo, "Salivary flow rate and periodontal infection - a study among subjects aged 75 years or older", *Oral Dis.*, vol. 17, núm. 4, pp. 387–392, 2011.
- [87] H. Flink, M. Bergdahl, Å. Tegelberg, A. Rosenblad, y F. Lagerlöf, "Prevalence of hyposalivation in relation to general health, body mass index and remaining teeth in different age groups of adults", *Community Dent. Oral Epidemiol.*, vol. 36, núm. 6, pp. 523–531, 2008.
- [88] C. Fenoll, J. Muñoz, V. Sanchiz, B. Herreros, V. Hernández, M. Mínguez y A. Benages, "Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers", *Rev. Española Enfermedades Dig.*, vol. 96, núm. 11, pp. 773–783, 2004.
- [89] D. Falcão, L. da Mota, A. Pires, y A. Bezerra, "Sialometria: Aspectos de interesse clínico", *Rev. Bras. Reumatol.*, vol. 53, núm. 6, pp. 525–531, 2013.
- [90] H. Whelton, "Introduction: the anatomy and physiology of salivary glands", en *Saliva and oral health*, Fourth edit., M. Edgar, C. Dawes, y D. O'Mullane, Eds. Stephen Hancocks Limited, pp. 1–16, 2015.
- [91] J. Burgess y A. Meyers, "Overview, Salivary Gland Anatomy, Salivation and Age", *Salivary Abnormalities in Dentistry*, 2015. [En línea]. Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/2091828-overview>. [Consultado: 12-nov-2018].
- [92] K. Takeuchi, M. Furuta, T. Takeshita, Y. Shibata, Y. Shimazaki, S. Akifusa, T. Ninomiya, Y. Kiyohara y Y. Yamashita, "Risk factors for reduced salivary flow rate in a Japanese population: The Hisayama study", *Biomed Res. Int.*, 2015.
- [93] L. Sánchez, L. Sáenz, I. Luengas, E. Camacho, Á. Raúl, Á. Castro, y E. Acosta, "Análisis del flujo salival estimulado y su relación con la caries dental. Seguimiento a seis años.", *ADM*, vol. 72, núm. 1, pp. 33–37, 2015.
- [94] H. Mese y R. Matsuo, "Salivary secretion, taste and hyposalivation", *J. Oral Rehabil.*, vol. 34, núm. 10, pp. 711–723, 2007.
- [95] R. Affoo, N. Foley, R. Garrick, W. Siqueira, y R. Martin, "Meta-analysis of salivary flow rates in young and older adults", *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 63, núm. 10, pp. 2142–2151, 2015.
- [96] E. Preoteasa, A. Tâncu, L. Losif, M. Melescanu, C. Murariu, y C. Preoteasa, "Salivary changes related to systemic diseases in the edentulous patients", *Journal of Medicine and Life*, vol. 7, núm. 4, pp. 577–580, 2014.
- [97] A. Ramya, D. Uppala, S. Majumdar, C. Surekha, y K. Deepak, "Are salivary amylase and pH – Prognostic indicators of cancers?", *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 5, núm. 2, pp. 81–85, 2015.
- [98] S. Baliga, S. Muglikar, y R. Kale, "Salivary pH: A diagnostic biomarker", *Journal of Indian Society of Periodontology*, vol. 17, núm. 4, India, pp. 461–465, 2013.

- [99] J. Choi, K. Lyons, J. Kieser, y N. Waddell, “*Diurnal variation of intraoral pH and temperature*”, *BDJ Open*, vol. 3, pp. 17015, 2017.
- [100] T. Pfaffe, J. Cooper, P. Beyerlein, K. Kostner, y C. Punyadeera, “*Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications*”, *Clin. Chem.*, vol. 57, núm. 5, pp. 675–687, 2011.
- [101] G. Proctor, “*The physiology of salivary secretion*”, *Periodontol. 2000*, vol. 70, núm. 1, pp. 11–25, 2016.
- [102] E. Naumova, T. Sandulescu, C. Bochnig, P. Al Khatib, W. Lee, S. Zimmer y W. Arnold, “*Dynamic changes in saliva after acute mental stress*”, *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–9, 2014.
- [103] C. Löfgren, D. Johansson, L. Bohlin, A. Sahlström, y C. Christersson, “*The challenge of measuring viscoelastic properties of human whole saliva to fit clinical purpose*”, *Int. J. Oral Dent. Heal.*, vol. 1, núm. 4, pp. 1–6, 2015.
- [104] G. Carpenter, “*The Secretion, Components, and Properties of Saliva*”, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 4, núm. 1, pp. 267–276, 2013.
- [105] H. Inoue, K. Ono, W. Masuda, T. Inagaki, M. Yokota, y K. Inenaga, “*Rheological Properties of Human Saliva and Salivary Mucins*”, *J. Oral Biosci.*, vol. 50, núm. 2, pp. 134–141, 2008.
- [106] J. Noble y M. Bailey, “*Quantitation of Protein*”, en *Methods in Enzymology*, 1a ed., vol. 463, núm. C, Elsevier Inc., pp. 73–95, 2009.
- [107] N. Kruger, “*The Bradford Method for Protein Quantitation*”, en *The Protein Protocols Handbook*, J. M. Walke, Ed. Totowa: Humana Press Inc., pp. 15–21, 2002.
- [108] F. He, “*Bradford Protein Assay*”, *Bio-protocol*, vol. 1, núm. 6, p. e45, 2011.
- [109] Universidad del País Vasco, “*Glosario de terminología reológica*”, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 3, núm. 2, pp. 55–77, 2002.
- [110] S. Patil y C. S. Magdum, “*Rheology and Methods of Analysis*”, *Pharm. Rev.*, vol. 4, núm. 3, 2006.
- [111] A. Björn, P. de La Monja, A. Karlsson, J. Ejlertsson, y B. Svensson, “*Rheological Characterization*”, en *Biogas*, S. Kumar, Ed. InTech, pp. 63–76, 2012.
- [112] A. Preetha y R. Banerjee, “*Comparison of Artificial Saliva Substitutes*”, *Trends Biomater. Artif. Organs.*, vol. 18, núm. 2, pp. 178–186, 2005.
- [113] H. Waterman, C. Blom, H. Holterman, y J. Mellema, “*Rheological properties of human saliva*”, *Arch. Oral Biol.*, vol. 33, núm. 8, pp. 589–596, 1988.
- [114] S. Haward, J. Odell, M. Berry, y T. Hall, “*Extensional rheology of human saliva*”, *Rheol. Acta*, vol. 50, núm. 11–12, pp. 869–879, 2011.
- [115] J. Stokes y G. Davies, “*Viscoelasticity of human whole saliva collected after acid and mechanical stimulation*”, *Biorheology*, vol. 44, pp. 141–160, 2007.
- [116] E. Silletti, M. Vingerhoeds, G. van Aken, y W. Norde, “*Rheological Behavior of Food Emulsions Mixed with Saliva: Effect of Oil Content, Salivary Protein Content, and Saliva Type*”, *Food Biophys.*, vol. 3, núm. 3, pp. 318–328, 2008.
- [117] S. Gittings, N. Turnbull, B. Henry, C. Roberts, y P. Gershkovich, “*Characterisation of human saliva as a platform for oral dissolution medium development*”, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 91, pp. 16–24, 2015.
- [118] D. Wong, “*Salivary Diagnostics*”. Wiley-Blackwell, 2008.

- [119] H. Al-tamimi y N. Al-rawi, “Age-Related Changes with Selected Salivary Physical Properties and Caries Experience among Healthy Adult Men”, *Int. J. Med. Res. Heal. Sci.*, vol. 7, núm. 9, pp. 52–58, 2018.
- [120] P. Saluja, V. Shetty, A. Dave, M. Arora, V. Hans, y A. Madan, “Comparative Evaluation of the Effect of Menstruation, Pregnancy and Menopause on Salivary Flow Rate, pH and Gustatory Function”, *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 8, núm. 10, pp. 81–85, 2014.
- [121] S. León, E. Castro, K. Arriagada, y R. Giacaman, “Flujo salival y caries radicular en adultos mayores autovalentes”, *Rev. Clínica Periodoncia, Implantol. y Rehabil. Oral*, vol. 9, núm. 3, pp. 253–258, 2016.
- [122] D. Bhuptani, S. Kumar, M. Vats, y R. Sagav, “Age and gender related changes of salivary total protein levels for forensic application”, *J. Forensic Odontostomatol.*, vol. 36, núm. 1, pp. 26–33, 2018.
- [123] A. Shekhar, S. Das, J. Bhattacharyya, P. Goel, S. Majumdar, y S. Ghosh, “A comparative analysis of salivary factors and maxillary denture retention in different arch forms: An in vivo study”, *J. Indian Prosthodont. Soc.*, vol. 18, pp. 53–60, 2018.
- [124] R. Zussman, E. Yarin y A. Nagles, “Age and Flow dependency of Salivary Viscoelasticity”, *J Dent Res*, vol. 86, núm. 3, pp. 281–285, 2007.
- [125] R. Walpole, R. Myers, S. Myers y K. Ye, *One- and Two-Sample Estimation Problems*, en: *Probab. Stat. Eng. Sci.*, pp. 265–317, 2012.
- [126] C. Queiroz, M. Hayacibara, C. Tabchoury, F. Marcondes, y J. Cury, “Relationship between stressful situations, salivary flow rate and oral volatile sulfur-containing compounds”, *Eur J Oral Sci.*, vol. 110, pp. 337–340, 2002.
- [127] N. Matos, M. Katsurayama, F. Makimoto, L. Santana, E. Paredes, M. d’Ávila, y M. Dos, “Psychological Stress and Its Influence on Salivary Flow Rate, Total Protein Concentration and IgA, IgG and IgM Titers”, *Neuroimmunomodulation*, vol. 17, núm. 6, pp. 396–404, 2010.
- [128] R. Srivastava y J. Batra, “Oxidative stress and psychological functioning among medical students”, *Ind. Psychiatry J.*, vol. 23, núm. 2, pp. 127–133, 2014.
- [129] K. Okabayashi, T. Narita, Y. Takahashi, y H. Sugiy, “Effect of Oxidative Stress on Secretory Function in Salivary Gland Cells”, en *Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants*, InTech, 2012.
- [130] R. Wiener, S. Morgan, L. Swager, C. DeBiase, y C. Lilly, “Stimulated Hyposalivary Flow Rates in Healthcare Students in an Interprofessional Awareness Educational Program Curriculum”, *J. Biomed. Educ.*, pp. 1–7, 2017.
- [131] B. Söder, M. Jakob, J. Meurman, L. Andersson, B. Klinge, y P. Söder, “Periodontal disease may associate with breast cancer”, *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 127, núm. 2, pp. 497–502, 2011.
- [132] M. Rabiei, M. Maddah, y M. Ghamgosar, “Correlation Assessment of unstimulated whole saliva flow rate with anthropometric indices”, *J. Islam. Dent. Assoc. IRAN*, vol. 28, núm. 4, pp. 134–141, 2016.
- [133] A. Hernández y C. Aránzazu, “Características y propiedades físico-químicas de la saliva: una revisión”, *Ustasalud*, vol. 11, pp. 101–111, 2012.

- [134] C. Méjean, M. Morzel, E. Neyraud, S. Issanchou, C. Martin, S. Bozonnet, C. Urbano, P. Schlich, S. Hercberg, P. Péneau y G. Feron, “*Salivary Composition Is Associated with Liking and Usual Nutrient Intake*”, PLoS One, vol. 10, núm. 9, 2015.
- [135] A. Milton y A. Bhambal, “*Sialochemical Analysis: A Portal for the Oral Diagnostician*”, J. Clin. diagnostic Res., vol. 8, núm. 5, pp. 43–48, 2014.
- [136] L. Öztürk, H. Furuncuoglu, M. Atala, O. Uluköylü, S. Akyüz, y A. Yarat, “*Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione, lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity*”, Braz J Med Biol Res, vol. 41, núm. 11, 2008.
- [137] H. Gibbins y G. Carpenter, “*Alternative Mechanisms of Astringency - What is the Role of Saliva?*”, J. Texture Stud., vol. 44, núm. 5, pp. 364–375, 2013.
- [138] N. Chaudhury, P. Shirlaw, R. Pramanik, G. Carpenter, y G. Proctor, “*Changes in saliva rheological properties and mucin glycosylation in dry mouth*”, J. Dent. Res., vol. 94, núm. 12, pp. 1660–1667, 2015.
- [139] R. Schipper, E. Silletti, y M. H. Vingerhoeds, “*Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects*”, Arch. Oral Biol., vol. 52, núm. 12, pp. 1114–1135, 2007.
- [140] A. Vijay, T. Inui, M. Dodds, G. Proctor, y G. Carpenter, “*Factors that influence the extensional rheological property of saliva*”, PLoS One, vol. 10, núm. 8, pp. 1–11, 2015.
- [141] Sin autor, “*How do I interpret data in SPSS for Pearson’s r and scatterplots?*”, 2008. [En línea]. Disponible en: http://statistics-help-for-students.com/How_do_I_interpret_data_in_SPSS_for_Pearsons_r_and_scatterplots.htm#.Xlhj0MIKjIW. [Consultado: 12-mar-2019].
- [142] S. Jain, K. Bansal, M. Marwaha, N. Sehrawat, y S. Singla, “*Effect of Diet Modification on Salivary Parameters and Oratest in High-carries-risk individuals*”, Int. J. Clin. Pediatr. Dent., vol. 11, núm. 1, pp. 34–39, 2018.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Carlos Arteaga Arcos, por su invaluable asesoría durante el desarrollo experimental de este trabajo escrito.

A Chayo y Gera por su ayuda con los primeros borradores y sus valiosas opiniones. Particularmente a Chayo, por todo su apoyo durante la parte experimental.

Al COMECyT, por el apoyo económico brindado a través de la beca con folio: 18BTL0052