



## **LA SALIVA COMO FLUIDO DIAGNÓSTICO.**

***Pilar M<sup>a</sup> Sánchez Martínez.***

*UGC Bioquímica Clínica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.*

### **INTRODUCCION**

El análisis de los componentes de la sangre ha sido el pilar fundamental en los procedimientos diagnósticos por el Laboratorio. Sin embargo, otros fluidos biológicos también se han usado con frecuencia, en el diagnóstico de laboratorio, como la orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc.

Es sorprendente, que hace más de dos mil años la medicina tradicional china refería que la saliva y la sangre son “hermanos” en el cuerpo y tienen el mismo origen; destacaban que los cambios en la saliva son indicativos del bienestar del paciente.

Desde finales del siglo XIX, se conocía la influencia de la saliva sobre la digestión, y a lo largo del siglo XX, se ha investigado sobre las propiedades y composición de la saliva pero no es hasta los últimos 40 años, cuando se comienza a indagar sobre el valor de la saliva como material de muestra en las determinaciones de laboratorio, y es principalmente a partir de 1999, cuando se desarrollan grandes iniciativas para la investigación de biomarcadores en saliva. El *National Institute of Dental & Craniofacial Research* (NIDCR) de USA, establece y financia diversos premios, con objeto de fomentar el desarrollo de sistemas de microfluidos y micro/nano-electromecánica (MEMS/NEMS) para el diagnóstico de biomarcadores en saliva.

Varios de estos proyectos se han focalizado en el desarrollo de tecnologías para medida de DNA, transcripción de genes (RNA<sub>m</sub>), proteínas, electrolitos y pequeñas moléculas presentes en saliva que puedan correlacionarse con el estado de salud y/o bienestar, con alta sensibilidad y especificidad.

La capacidad para monitorizar, ver cómo y cuando una enfermedad comienza, cómo progresa y observar el resultado del tratamiento a través de técnicas no invasivas es el fin más deseable en la promoción del estado de salud y bienestar. Se precisa:

1. Que existan biomarcadores específicos asociados al estado de salud o enfermedad,
2. Que estos biomarcadores se puedan detectar y monitorizar de forma no invasiva
3. Que existan tecnologías que discriminen estos biomarcadores.

El segundo requisito lo cumple a la perfección la saliva, y en el primer y tercer prerrequisito se focalizan los trabajos de investigación en saliva.

## DEFINICION DE SALIVA

La saliva es definida según el Diccionario de Términos Médicos de la Real Academia Nacional de Medicina (2011) como: "Líquido segregado por las glándulas salivales, de viscosidad variable, según el estado de hidratación y la fase digestiva; de composición parecida a la del plasma, contiene agua, iones, mucina, proteínas plasmáticas, leucocitos y detritos celulares. Sirve para lubricar los alimentos, facilitando su masticación y la formación del bolo alimenticio e inicia la digestión del almidón gracias a su contenido en  $\alpha$ -amilasa. Ejerce además un efecto de arrastre y limpieza de los dientes y la mucosa bucal.

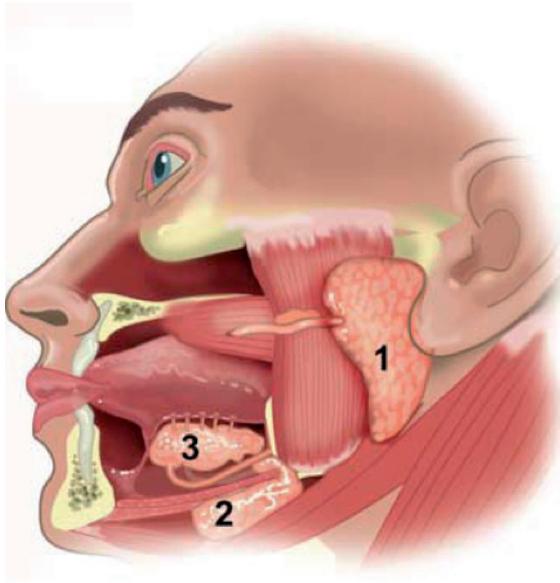
## FORMACION DE LA SALIVA

La saliva es producida por un grupo de glándulas exocrinas, las glándulas salivales, cada una de ellas interviene de modo diferente en la producción cualitativa y cuantitativa de la saliva.

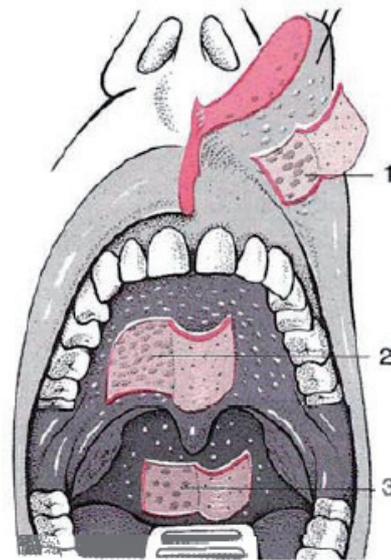
Las glándulas salivales se clasifican en: glándulas salivales mayores, responsables de la producción del 92 – 95 % de la saliva (Figura 1) y glándulas salivales menores, responsables de la producción del 5 – 8 % de la saliva (Figura 2). El término mayor y menor se refiere al tamaño anatómico de las glándulas. Se distinguen tres pares de glándulas salivales mayores:

- *Glándulas parótidas*, localizadas en la región parotídea, comunica con la cavidad oral a través del conducto de Stenon, son responsables del 30 % de la producción salival, histológicamente es una glándula serosa.
- *Glándulas submandibulares*, situadas bajo las mandíbulas inferiores, producen saliva que drena a través del conducto de Wharton, contribuye con un 55 – 65 % de la producción salival, es una glándula mixta.
- *Glándulas sublinguales*, están situadas en el suelo de la boca, drenan por múltiples conductos excretores, contribuye con un 5 % a la producción salival, glándula mixta, contiene principalmente células mucosas.

Además, existen unas 700 a 1000 glándulas salivales menores distribuidas por la boca, faringe, fosas y senos paranasales, laringe y mucosa traqueal, las principales son: glándulas labiales, glándulas bucales, glándulas faríngeas, glándulas palatinas, sus secreciones son mucosas.



**Figura 1.** Localización anatómica de las tres pares de glándulas salivales mayores: Glándulas parótidas (1) Glándulas submandibulares (2), y glándula sublingual (3).  
Adaptación de: De Nieuw Amerongen 2004.



**Figura 2.** Localización anatómica de las tres pares de glándulas salivales menores: Glándula labial (1), glándula Palatina (2) y glándula faríngea (3)  
Adaptación de: sepeap.org. Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria. Disponible en: <http://www.sepeap.org/archivos/libros/OTORRINO/7.pdf>.

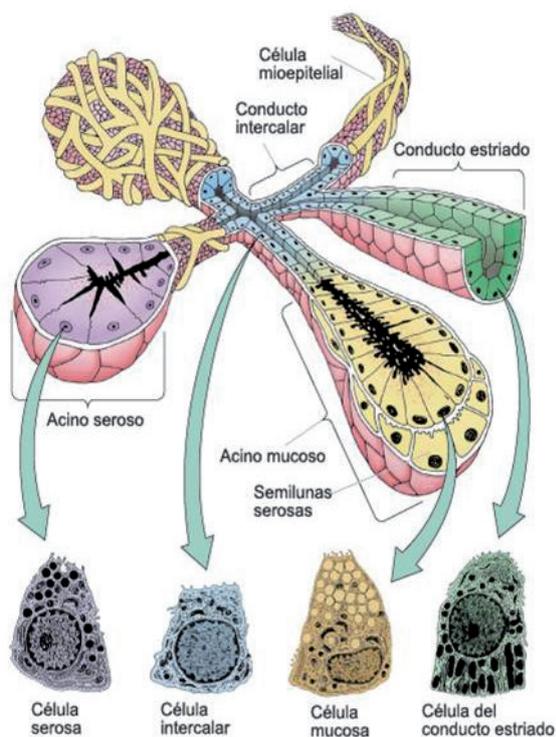
La secreción salival puede ser serosa, mucosa o mixta en función del tipo celular que forme la glándula salival. Las glándulas serosas están compuestas sólo por células serosas que secretan un líquido claro, albuminoso, desprovisto de moco, es lo que se conoce como *saliva de dilución*, contiene  $\alpha$ -amilasa o ptialina. Las glándulas mucosas están formadas por células mucosas y secretan lo que se conoce como *saliva de deslizamiento* que es viscosa, pegajosa y contiene mucina. Las glándulas mixtas contienen estructuras tanto serosas como mucosas.

Las glándulas salivales están constituidas por células de los ácinos, células del sistema de conductos o ductales y células mioepiteliales. En las células de acinos, se secreta la primera saliva y va a determinar el tipo de secreción producida. Las células de los conductos las diferenciamos en células de segmentos intercalares, estriados y excretor. Las células del segmento intercalar no están implicadas en la modificación de la composición de electrolitos, como sí lo están las células del resto de conductos. Las células mioepiteliales, se encuentran situadas entre la membrana basal y la porción basal de las células de los conductos intercalares y acinos. La contracción de la célula mioepitelial produce la salida de los gránulos secretorios de los acinos (Figura 3 y 4).

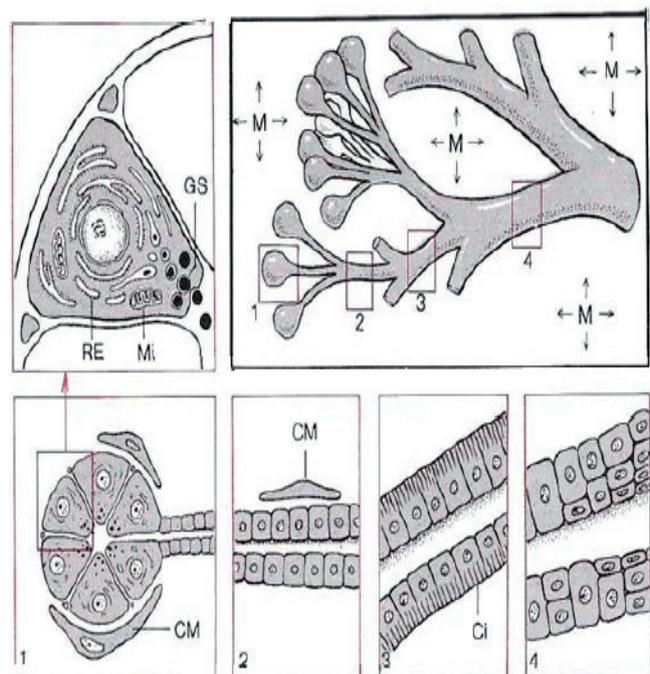
A través de las células acinares se produce ultrafiltración del plasma (Figura 5). El agua es el principal componente inorgánico de la saliva (98 %), deriva en gran medida del lecho capilar local por difusión intracelular, canales para el agua (ej: acuaporina 5) y rutas extracelulares. El ultrafiltrado se enriquece en iones bicarbonato, producido en las células de las glándulas salivales, como resultado de la acción de la anhidrasa carbónica sobre el dióxido de carbono

originado en los procesos metabólicos de las células. Excepto con tasas muy bajas de secreción salival, la concentración de iones bicarbonato es superior que la plasmática. El epitelio ductal es muy poco permeable al agua, por lo que la absorción neta de iones sodio y cloro reduce la osmolaridad de la saliva. Por ello, la saliva es siempre hipoosmótica con respecto al plasma. Sin embargo, la diferencia de osmolaridad se reduce con altas tasas de secreción, porque se acorta el tiempo disponible para la reabsorción de iones sodio y cloro en los ductos.

Las moléculas neutras pequeñas procedentes del suero penetran en las glándulas salivales por difusión pasiva desde los densos lechos de capilares que rodean y bañan las glándulas salivales. Los electrolitos entran en la saliva vía gradiente osmótico y son regulados por la velocidad de secreción, naturaleza del estímulo y nivel de mineralocorticoides en la circulación.



**Figura 3.** Esquema del acino, conductos y tipos de glándula salival: <http://es.scribd.com/>

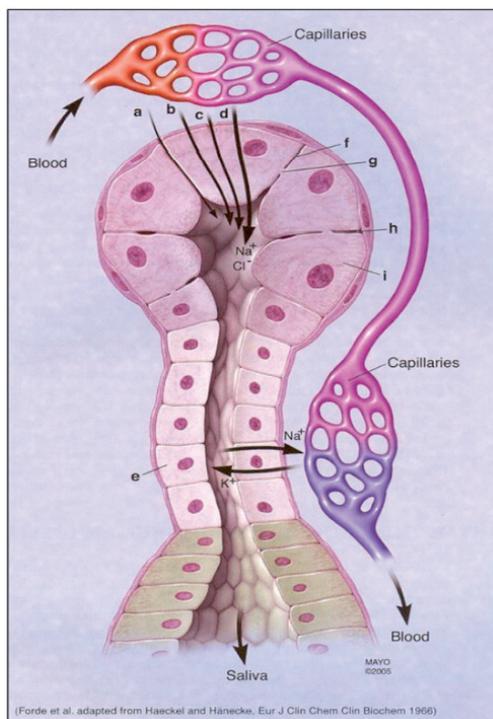


**Figura 4.** Estructura y organización de las glándulas salivales: CM, células mioepiteliales; GS, granulos de secreción; Mi, mitocondrias; RE, retículo endoplásmico; M, mesénquima; Ci, citomembrana; 1, acini) 2, segmento intercalar; 3, segmento estriado; 4, conducto excretor. Adaptación de: [sepeap.org](http://www.sepeap.org/). Disponible en: <http://www.sepeap.org/>

Los componentes orgánicos que encontramos en la saliva, derivan en gran medida de la síntesis protéica y son almacenados como gránulos en la célula del acino. Como los componentes séricos que encontramos en la saliva derivan principalmente de la vasculatura local, que se origina desde las arterias carótidas, la saliva es un fluido en el que encontramos casi las mismas moléculas que en la circulación sistémica, este hecho hace que la saliva sea un fluido potencialmente válido para el diagnóstico de enfermedades sistémicas.

Los mecanismos de transporte son diversos (Figura 5):

1. A través del espacio entre las células acinares (sólo moléculas con un peso molecular inferior a 1900 D).
2. Por filtración a través de los poros de membranas celulares (sólo moléculas con peso molecular inferior a 400 D como es el caso de agua y electrolitos).
3. Por un mecanismo selectivo a través de las membranas celulares:
  - a. Difusión pasiva de moléculas lipofílicas (como sucede con los esteroides).
  - b. Transporte activo de canales proteicos (como es el caso de péptidos).
4. Por pinocitosis (el caso de algunas enzimas).



**Figura 5.** Mecanismos de transporte desde el suero a los ductos de la glándula salival  
 Adaptación de: Segal, A. and Wong, D. T. 2008  
 a: Transporte activo.  
 b: Difusión pasiva de compuesto liposoluble.  
 c: Filtración simple.  
 d: Filtración activa de agua e iones.  
 e: Bomba Sodio-Potasio.  
 f: Membrana celular.  
 g: Poro de la membrana celular.  
 h: Espacio intracelular.  
 i: Célula del acino.

## CONTROL DE LA SECRECIÓN SALIVAL

El flujo salival se encuentra bajo el control del sistema nervioso autónomo, principalmente por el parasimpático. La inervación parasimpática de la glándula parótida se produce por el nervio glossofaríngeo (par craneal IX), vía ganglión ótico. El nervio facial (par craneal VII) proporciona la inervación parasimpática a las glándulas submandibular y sublingual, vía ganglión submandibular. La inervación de las glándulas menores es principalmente parasimpática con transmisión colinérgica; las glándulas salivales menores producen secreción de forma espontánea en ausencia de estímulos nerviosos permitiendo la protección de la mucosa oral durante todo el día. La estimulación parasimpática produce secreción salival abundante, acuosa y rica en iones bicarbonato, que persiste mientras las glándulas continúan siendo

estimuladas. El parasimpático posee además un efecto trófico sobre las glándulas salivales, que se atrofian si son desnervadas. Por el contrario, la desnervación simpática no produce atrofia. La estimulación simpática también aumenta la secreción, pero de manera transitoria y la saliva producida es viscosa (rica en  $\alpha$ -amilasa y mucina) y escasa. En general, en el adulto se produce de 500 - 1500 mL de saliva por día, con un flujo de 0.5 mL/min, si se produce estimulación, el flujo salival puede pasar a ser de 6 - 7 mL/min

La producción salival está también estimulada por factores físicos, químicos y/o psíquicos. Las hormonas y secreciones paracrinas tienen efectos de menor importancia sobre la secreción salival (Tabla 1)

**Tabla 1. Efecto de la estimulación simpática y parasimpática sobre la glándula salival**

Respuesta	Parasimpático	Simpático
Secreción salival	Copiosa	Escasa
Respuesta temporal	Sostenida	Transitoria
Composición	Pobre en proteínas	Rica en proteínas
	Alto iones potasio y bicarbonato	Bajo iones potasio y bicarbonato
Respuesta a la desnervación	Disminución de la secreción y atrofia	Disminución de la secreción

## FUNCION DE LA SALIVA

La saliva tiene múltiples funciones (Tabla 2):

- Función protectora de las mucosas de la cavidad oral y vías respiratorias superiores, mediante la limpieza mecánica y la acción defensiva inmunológica (péptidos antibacterianos, proteínas, lisozima, inmunoglobulinas sobre todo inmunoglobulina A). Protección de los dientes, ya que los componentes orgánicos e inorgánicos son importantes para la formación y conservación del cemento celular, actúa protegiendo a los dientes frente al crecimiento bacteriano.
- Función digestiva por la insalivación del bolo alimenticio y el inicio de la escisión del almidón (amilasa).
- Posibilita la excreción de sustancias propias y extrañas. La excreción de sustancias de grupo sanguíneo tiene gran importancia médico-legal.
- Función vehiculizadora de la sensación gustativa merced a la humidificación y lavado de los botones gustativos.

**Tabla 2. Funciones de los componentes de la saliva**

<b>Dientes</b>	Remineralización	Péptidos ricos en prolina, Estaterinas, Calcio, Fosfatos
	Inhibición de la desmineralización	Mucinas
	Lubricación	Mucinas y Péptidos ricos en prolina
	Efecto buffer	Bicarbonato, Fosfato, Proteínas
<b>Alimento</b>	Digestión	Lipasa, Amilasa, Proteasa
	Gusto	Zinc
	Bolo	Mucinas
<b>Microorganismos</b>	Antiviral	Mucinas, Cistatinas, Inmunoglobulinas
	Antifúngica	Inmunoglobulinas, Mucinas, Histatinas
	Antibacteriana	Mucinas, Histatinas, Cistatinas, Lactoferrina, Aglutininas, Lisozimas, Lactoperoxidasas

Modificada de: (Pink R 2009)

## COMPOSICIÓN DE LA SALIVA

La saliva está compuesta en un 95 – 98 % de agua, además de minerales, electrolitos, hormonas, enzimas, inmunoglobulinas, citoquinas y otros compuestos, dependiendo de la glándula de la que la obtengamos. Su pH es de 6.0 - 7.0.

*La saliva completa* es una mezcla de los fluidos orales procedentes de las glándulas salivales y contiene constituyentes de origen no salivar, incluido el fluido crevicular gingival, trasudado de las mucosas y lugares de inflamación, células epiteliales e inmunes, restos de alimentos y numerosos microorganismos. En general cuando hablamos de saliva, nos referimos a saliva completa.

La cantidad y composición de la saliva secretada va a depender de factores como: velocidad del flujo salival, ritmo circadiano, tipo y tamaño de la glándula salival, duración y tipo de estímulo, dieta, drogas, edad, sexo, estado fisiológico.

La saliva contiene moléculas que han sido transportadas a las glándulas salivales desde los vasos sanguíneos y moléculas que son producidas por la propia glándula. La mayor parte de los compuestos que encontramos en saliva, se encuentran en concentraciones muy bajas. No es así en el caso de fosfatos o de la  $\alpha$ -amilasa salival, cuya concentración en saliva es superior a la que encontramos en sangre.

En saliva, los esteroides son los analitos más determinados, gracias a la tecnología emer-

gente, un gran número de otros compuestos se están incorporando a las determinaciones en saliva. La identificación de proteínas y péptidos son importante en la investigación de enfermedades sistémicas.

Al comparar la composición de las proteínas encontradas en saliva con el bien establecido proteoma plasmático, encontramos que el 27 % de las proteínas de la saliva completa, se encuentran en plasma y cerca del 40 % de las proteínas que se sugieren como marcadores de cáncer, enfermedad cardiovascular, etc. se encuentran en la saliva completa, por lo que el análisis del proteoma salival puede ser de gran valor como biomarcador. Tras la identificación del proteoma, se estudia el transcriptoma salival (RNA<sub>m</sub>), es el precursor directo de proteínas, muy estables en saliva. Se han encontrado microRNAsalival con función conocida en el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, respuesta inmune, etc.

El *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (NIDCR) impulsó el proyecto del proteoma salival y los datos son accesibles para su consulta. Encontramos información, incluyendo la estratificación según la glándula de origen, con descripción de su estructura y función, en la página web (<http://www.hspp.ucla.edu>).

En este sitio web están unidos los datos de *Saliva Proteome Knowledge Base* (SPKB) y de *Salivary Proteome Wiki* (SPW), es la primera base de datos que centraliza los datos del proteoma salival.

La Tabla 3 recoge las principales proteínas encontradas en la saliva.

## **CARACTERISTICAS PREANALITICAS DE LA SALIVA**

La saliva como muestra posee una serie de ventajas y limitaciones con respecto a cualquier otro fluido biológico.

### **VENTAJAS:**

- Facilidad de obtención, almacenamiento y transporte de la muestra, bajo coste. En relación al paciente, es una muestra que se obtiene de forma no invasiva, por lo que se encuentra libre de estrés, no existen problemas para poder obtener muestras repetidas y poder monitorizar un analito seriado.
- La mayoría de los analitos son excepcionalmente estables en este tipo de muestra. Para los profesionales posee la ventaja de ser menos infecto-contagiosa que la sangre, cuando exponemos a un individuo sano a muestras de infectividad desconocida la mayoría de las veces.
- La saliva es más fácil de manejar para los procedimientos diagnósticos, no coagula y requiere menor manipulación.

### **LIMITACIONES:**

- La principal ha sido la tecnológica, debido a la falta de sensibilidad y especificidad de las técnicas, en relación a las concentraciones de los analitos en saliva.

**Tabla 3. Principales proteínas de la saliva humana**

Proteína: Porcentaje	Origen	Función
Péptidos ricos en Pro-lina PRP (37 %)	Parótida y Submandibular	Homeostasis mineral, neutralización de sustancias tóxicas, protección de tejidos frente a ataques proteolíticos de microorganismos
$\alpha$ -Amilasa (20 %)	Parótida (60-120 mg/dL) Submandibular ( $\approx$ 25 mg/dL)	Iniciar digestión, función antibacteriana en la boca, involucrada en lubricación de tejidos
Mucinas (20 %)	Submandibular Sublingual y glándulas menores	Protección de tejidos frente a ataques proteolíticos de microorganismos; citoprotección; lubricación; protección frente a deshidratación; mantenimiento de viscoelasticidad de la saliva
Cistatinas (8 %)	Parótida, Submandibular y Sublingual	Función antibacteriana y antivírica; regula metabolismo proteico; ayuda en la protección de tejidos frente a ataques proteolíticos de microorganismos; ayuda en la mineralización
Albúmina (6 %)	Parótida, Submandibular y Sublingual	Transporte de proteínas, buffer de pH
IgA secretora (3 %)	Parótida y Submandibular	Primera línea de respuesta Inmunitaria innata
IgG (2 %)	Parótida y Submandibular. Penetra en saliva vía fluido gingival crevicular	Respuesta inmune secundaria; asociada a múltiples patógenos, previene al organismo contra ellos
Staterinas (7 %)	Presente en la saliva Parótida	Inhibe el crecimiento de cristales de hidroxialpatita; ayuda en la protección de tejidos frente a ataques proteolíticos de microorganismos; citoprotección; lubricación, mantenimiento de la viscoelasticidad de la saliva
Histatinas	Presente en todos los tipos de glándulas	Función antimicrobiana y anticandida, Formación de la película de protección, participación en la mineralización dinámica de los fluidos orales, inhibición de la liberación de histamina desde los mastocitos, sugiriendo un papel de regulador de la inflamación oral
Catelicidinas (hCAP18)	Expresada por neutrófilos y células epiteliales de la cavidad oral	Función antimicrobiana, modula la respuesta inmune por sus propiedades quimiotácticas para monocitos, células T, neutrófilos, estimula liberación de histamina desde los mastocitos

Modificada de: Pfaffe T, et al 2011

- No todos los parámetros presentan una buena correlación sangre/saliva
- Las variaciones en el flujo salival van a influir en las concentraciones del analito en estudio, sobre todo, si se trata de compuestos de alto peso molecular, polar o iónico, transportado a la saliva de forma activa o secretado por exocitosis.

### ***Factores que afectan el flujo salival.***

- La hipersalivación se puede deber a alteraciones neurológicas, incluida la enfermedad de Parkinson, patología con reflujo gastro-esofágico, efecto secundario de diversos fármacos, sobre todo los que activan el sistema nervioso parasimpático (pilocarpina), miorelajantes, antiepilépticos, antipsicóticos (litio), hiperhidratación, envenenamiento con metales pesados
- La hiposalivación se puede deber a patologías como el síndrome de Sjögren's, fármacos que interfieren con la acción de Acetilcolina como anticolinérgicos, antihistamínicos, quimioterápicos, terapia de irradiación de cabeza y cuello, etc.

Las variaciones en el flujo salival, son importantes cuando la muestra de saliva se obtiene mediante estímulo. El estímulo más utilizado es la acción masticatoria con parafilm o aplicando 0.1 - 0.2 mol/L (aproximadamente una gota) de ácido cítrico en la lengua.

La muestra de saliva puede recogerse de una glándula específica, mediante succión o canulación (estos procedimientos son complejos, lentos, invasivos, requieren personal especializado), o ser una muestra de saliva completa (con o sin estímulo). La saliva completa sin estímulo es la muestra de preferencia. Se puede obtener dejando gotear o escupiendo la saliva en un tubo de muestra, pero este método tiene la desventaja de las barreras sociales, sobre todo en muestras de geriatría, y agravado si el paciente padece xerostomía. Existen comercializados una serie de dispositivos para la recogida de muestra, donde lo esencial es que no se vea afectada la concentración salival del analito a estudiar. El cristal (material de referencia), está completamente libre de absorción, pero no es un material útil para la toma de muestra, por su fragilidad. El material menos absorbente es el polipropileno ultra-puro, ya que en el propileno reciclado se produce absorción variable. El algodón y el polietileno absorben diferentes analitos. Se recomienda que el dispositivo utilizado para la toma de muestra de saliva esté validado respecto a la adsorción del analito en estudio.

La toma de muestra de saliva, ha de estar perfectamente protocolizada y estandarizada, para asegurar que las condiciones de recogida de la muestra, son óptimas para el analito en estudio. Disponemos de dispositivos comercializados por diversas compañías para la toma de muestras de saliva, <http://www.salimetrics.com>; <http://www.orasure.com>; <http://www.gbo.com>; <http://www.sarstedt.com>; entre otros.

## **METODOS ANALITICOS**

### ***Métodos inmunológicos:***

Los primeros inmunoensayos que se utilizaron fueron en su mayor parte adaptaciones para la matriz saliva de RIAs comerciales, pero han sido completamente reemplazados por técnicas ELISA ultrasensible, y técnicas de electroquimioluminiscencia. Son las más utilizadas en la determinación de esteroides, también se utilizan para determinaciones de péptidos y factores de

crecimiento, aunque se está trabajando con plataformas bio-micro-electromecánicas para la determinación de múltiples analitos.

#### **Métodos cromatográficos:**

En un principio se utilizó electroforesis bidimensional en gel combinado con espectrometría de masas para el estudio de péptidos. Se ha reemplazado por una técnica más sensible, mejorando la especificidad y la sensibilidad, la cromatografía líquida en dos dimensiones acoplada con espectrometría de masas (MS). Estos métodos cromatográficos se han aplicado para la detección de nuevos péptidos y proteínas. Con la cromatografía líquida-tandem MS se cuantifican hormonas esteroideas, péptidos y aminos con peso molecular inferior a 5 kD, como es la Ghrelina y la Melatonina.

#### **Técnicas de PCR:**

Gracias a técnicas de amplificación y con la colaboración potenciada por la Universidad de California Los Angeles (UCLA) entre *Collaborative Oral Fluid Diagnostic Research Center* y la *School of Engineering* de UCLA se han desarrollado plataformas capaces de detectar múltiples proteínas, RNA y biomarcadores en saliva a tiempo real de forma específica y sensible.

## **APLICACIONES DE BIOMARCADORES EN SALIVA**

Actualmente la determinación de cortisol en saliva, es la determinación más validada. Son múltiples las aplicaciones de la determinación de hormonas en saliva.

- **Estudio del síndrome de Cushing.** Desde el año 2008, se recomienda por parte de la Sociedad Europea de Endocrinología y por la Asociación Americana de Química Clínica, la determinación de cortisol en saliva a las 23 h, como técnica de cribado en el estudio del síndrome de Cushing. En el Síndrome de Cushing de cualquier origen se produce una pérdida del ritmo circadiano en la secreción adrenal. En los individuos sanos con ciclos convencionales vigilia-sueño, los niveles de cortisol comienzan a aumentar sobre las 3 – 4 h llegando al máximo entre las 7 – 9 h para ir disminuyendo a lo largo del día. La medida del cortisol a las 23 h es un método muy simple como cribado porque el paciente toma la muestra antes de acostarse, sin estrés, sin necesidad de hospitalización, y únicamente hay que seguir las indicaciones apropiadas de recogida de muestra.

Para una adecuada interpretación en los resultados de cortisol en saliva, es crucial conocer las fuentes de variabilidad que ejercen influencias sistemáticas sobre la muestra.

Podemos dividir las en:

- Variabilidad biológica por factores no modificables del sujeto en estudio (perfil diurno de cortisol salival, variación inter e intraindividuo, variación estacional, efectos de la edad y sexo).
- Variabilidad biológica por factores modificables del sujeto en estudio (estilo de vida, dieta, medicación, fumador, toma de alcohol, actividad física).

- Variabilidad metodológica relacionada con la muestra y su proceso de almacenaje (alguno frente a poliéster, congelación y/o mantenimiento a diferentes temperaturas).
- Variabilidad metodológica relacionada con las técnicas empleadas en el laboratorio para su determinación (método de medida, precisión del método).

Es imprescindible considerar los posibles sesgos que puedan afectar la evaluación del test (**tabaco, regaliz, trabajadores nocturnos, enfermos depresivos, ausencia de ritmo diurno**).

• **Seguimiento de la hiperplasia adrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa.** La forma más común de hiperplasia adrenal congénita es por déficit de 21 hidroxilasa y como consecuencia el precursor del cortisol 17-hidroxiprogesterona va a estar presente en concentraciones muy elevadas en sangre y en saliva. Los niños en general tienen miedo de la venopunción y la saliva es una alternativa en el seguimiento de esta patología. En este caso se recomienda la recogida de 3 muestras de saliva durante un día (por la mañana, al mediodía y por la noche), para la determinación de 17-hidroxiprogesterona, con lo que vamos a obtener información de la eficacia del régimen de supresión obtenido con los glucocorticoides utilizados en el tratamiento. Debido a la secreción adrenal aumentada de andrógenos, también se investiga en la saliva la androstenodiona como marcador directo, aunque la monitorización con este parámetro está menos extendida. Además de las 3 muestras se pueden recoger muestras con más frecuencia para evaluar la cinética de los glucocorticoides orales administrados permitiendo el ajuste de forma individualizada para optimizar la supresión de 17-hidroxiprogesterona. El mayor problema es el cumplimiento adecuado de las tomas de muestras, es indispensable que se recojan siempre poco antes de tomar la píldora de sustitución, así como un adecuado marcado de las distintas muestras, ya que en caso contrario la estimación de la calidad terapéutica será mala

• **Investigación de la fertilidad.** Debido a la pulsatilidad en la secreción tanto de estradiol como de progesterona o testosterona, se recomienda trabajar con una alícuota de 3 - 5 muestras recogidas en intervalos de 30 minutos a primera hora de la mañana, con objeto de minimizar las fluctuaciones de su secreción.

*El estradiol* es secretado por ovario, testículos, placenta, glándula adrenal o producido por conversión extraglandular de los precursores androgénicos secretados; hay que tener en cuenta que tanto en niñas prepúberes como en hombres o mujeres postmenopáusicas las concentraciones de estradiol no son cíclicas. La determinación de estradiol está especialmente indicada en estudios de pubertad precoz en niñas, ginecomastia en varones en los que los valores de estradiol en sangre no están muy elevados y en la fecundación in vitro, donde nos va a dar información sobre el crecimiento folicular, pudiendo monitorizar la ovulación de forma similar a las muestras de sangre. En estos programas se recomienda la muestra de saliva por la posibilidad de recogida en casa el día adecuado y seguimiento del ciclo ovulatorio.

*Progesterona:* producida principalmente como precursor de otros esteroides en la corteza de las glándulas suprarrenales en ambos sexos, siendo en la mujer la mayoría de la progesterona

producida por el cuerpo lúteo en los ovarios o por la placenta durante el embarazo. La muestra en saliva puede al igual que en suero ser medida para la determinación de la suficiencia del cuerpo lúteo, el estudio de trastornos del ciclo menstrual en mujeres en edad fértil y en la monitorización de tratamientos de reproducción asistida. La progesterona es una de las moléculas que más se absorben al material plástico de los dispositivos de toma de muestra.

*Testosterona:* La forma libre de la testosterona es la biológicamente activa. En saliva medimos la hormona libre. La globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) va a ligar el 60 % de la testosterona, la albúmina el 38 % y sólo el 1 – 2 % circula en forma libre, además la afinidad de la SHBG por la testosterona es 5 veces mayor que por el estradiol. Cualquier cambio de aumento o disminución de la SHBG va a repercutir en cambios en las concentraciones de hormonas libres testosterona y estradiol. Cuando su concentración aumenta va a aumentar el cociente estradiol libre/testosterona libre lo que favorece que aparezca en el hombre el síndrome de estrogenización. Múltiples condiciones actúan modificando la concentración de SHBG, aumenta en el hipertiroidismo, terapias estrogénicas, edad, cirrosis hepática y disminuye en el hipotiroidismo, aplicaciones de glucocorticoides, obesidad, síndrome nefrótico, etc.

Para la determinación de testosterona las condiciones de conservación de la muestra, tienen que ser más estrictas (a 4 °C aumenta si se mantiene más de una semana, sugiriendo crecimiento bacteriano, a -20 °C disminuye si se mantiene más de 6 meses, a -80 °C no se altera). Se deben analizar en 48 h las muestras guardadas a 4 °C tras la toma de muestra. El crecimiento bacteriano puede interferir en los resultados de testosterona pero no en cortisol, 17-hidroxi-progesterona o progesterona en 5 días a 4 °C.

- **Andrógenos adrenales.** La dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato son los andrógenos adrenales más importantes. DHEA al ser la hormona libre y biológicamente activa puede ser medida en saliva. Debido a la alta concentración que existe en sangre del sulfato de DHEA, su medida puede ser útil y es investigada para comprobar si existe contaminación en la muestra de saliva por sangre. DHEA se determina en patologías de insuficiencia adrenal, tumores de glándula adrenal, síndrome adrenogenital, diagnóstico diferencial del hirsutismo.

- **Medicina deportiva.** Debido a la posibilidad de toma de muestras durante la realización del deporte. Se ha usado el balance catabolismo/anabolismo con la determinación de cortisol/testosterona en hombres y determinando el cociente cortisol/DHEA en mujeres, en la investigación de sobre entrenamiento. También en los programas antidoping (la saliva es más fácil de recoger en presencia de testigos que las muestras de orina). Los andrógenos sintéticos o naturales están prohibidos como sustancias estimulantes. Los atletas lo toman para mejorar la masa muscular y reducir el dolor durante el ejercicio físico extremo. Se sospecha de dopaje por el aumento del cociente testosterona/epitestosterona, en general es 1. También si aparecen andrógenos sintéticos como tetrahydrogestrinona.

Péptidos exógenos que se utilizan en el dopaje incluyen la hormona del crecimiento y la eritropoyetina, aunque estos 2 péptidos no son secretados por la glándula salival. Mediante técnicas

recombinantes o de biología molecular se han producido estos péptidos etiquetados y se ha visto que en muy pequeña cantidad pueden aparecer en la saliva, por eso valores muy superiores a los de referencia o presencia de péptidos marcados son indicativos de dopaje.

- **Investigación del estrés y del comportamiento.** En el campo de la psicología (depresión), se investiga el cortisol con resultados contradictorios. En el estudio de estrés agudo, al ser las catecolaminas difíciles de investigar por su rápida degradación, se determina la cromogranina A.
- **Investigación de cronobiología.** Con la determinación de melatonina que es una amina producida por la glándula pineal durante la oscuridad, forma parte del regulador del ciclo circadiano, en el ritmo biológico normal los valores mayores se producen durante la oscuridad cayendo durante el día, aparece en saliva de forma similar a esteroides. El tiempo de adaptación de los ritmos circadianos en un vuelo desde Europa a Nueva York es de 6 días.
- **Aplicaciones en veterinaria.** En el estudio de la fertilidad, sobre todo en animales en peligro de extinción, en la investigación de los ciclos ovulatorios en mamíferos. La toma de muestra sólo es posible en animales custodiados o acostumbrados como son los que habitan en parques o zoológicos.

Otros compuestos identificados en saliva:

- Investigación para detección de drogas y tóxicos. En controles de tráfico, utilizan estos procedimientos, porque se pueden realizar in situ. El principal problema es que disponemos de escasa información en relación a la vida media, en saliva, en que son detectables estas drogas. Los tóxicos se pueden excretar como compuestos liposolubles no disociados, con lo que se vuelven a deglutir comenzando de nuevo su absorción, distribución, metabolismo y excreción.
- Indicador de exposición a metales pesados como el cadmio, plomo, cromo, mediante técnicas de absorción atómica en horno de grafito. Los contaminantes ambientales se investigan por la relación entre plasma y saliva.

Las proteínas y péptidos en saliva:

Pueden ser útiles en la investigación de enfermedades sistémicas, algunas con manifestaciones en la cavidad oral.

- **Síndrome de Sjogren (SS)**, en saliva los tres biomarcadores ( $\beta_2$ ,microglobulina, Catepsina D y  $\alpha$ -enolasa) y RNAm (antígeno de diferenciación nuclear de células mieloide, receptor IIIb de baja afinidad para el fragmento fijador de complemento de IgG y la proteína 2 de unión de guanilato) son los que mejor discriminan pacientes con SS, de individuos sanos o con lupus eritematoso sistémico.
- **Carcinoma oral de células escamosas**, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , Interleuquina 1, antígeno polipeptídico tisular, antígeno de cáncer 125, están más elevados en saliva que en suero de los pacientes con cáncer oral.
- **Cancer de mama**, el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano en saliva se correlaciona con mal pronóstico.

La concentración elevada de esta proteína se asocia con una forma especialmente agresiva de la enfermedad y con una mala o pobre respuesta a la quimioterapia tradicional. Por ello, este tipo de cáncer requiere de un tratamiento específico y diferente al resto.

- **Enfermedades cardiovasculares.** Se ha documentado la presencia de Troponina I cardiaca en saliva. La PCR está elevada en saliva en enfermedad cardiovascular, aunque también se encuentra elevada en caso de existir enfermedad periodontal, como reactante de fase aguda.
- **Infecciones sistémicas.** En saliva podemos identificar patógenos, ácidos nucleicos o anticuerpos frente a ellos. La determinación de anticuerpos frente a VIH en saliva posee una sensibilidad y especificidad similar al test en sangre. También pueden determinarse anticuerpos frente a virus de hepatitis con una sensibilidad aceptable.

## PERSPECTIVAS DE FUTURO

En el diagnóstico utilizando la saliva, la baja concentración de sus componentes ya no es un problema y, por lo tanto, la saliva no sólo puede ser una herramienta diagnóstica, sino que puede ser una forma fácil de monitorizar la salud y tener un alto potencial para revolucionar el futuro.

## BIBLIOGRAFIA

**Aps JK, Martens LC.** Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 2005;150:119–31.

**Eliasson L, Carlén A.** An update on minor salivary gland secretions. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 435–442.

**Farnaud SJ, Kosti O, Getting SJ, Renshaw D.** Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *ScientificWorldJournal.* 2010,10:434-56.

**Floriano PN, Christodoulides N, Miller CS, et al.** Use of saliva-based nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study. *Clin Chem.* 2009;55(8):1530–1538.

**Gröschl M.** Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem.* 2008;54(11):1759-69.

**Hansen AM, Garde AH, Persson R.** Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and their impact on measurement among healthy adults: A review. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* 2008;68:448–458.

**Hu, S, Jiang, J, and Wong, D T.** Proteomic analysis of saliva: 2D gel electrophoresis, LC-MS/MS, and Western blotting. *Methods Mol Biol* 2010; 666: 31-41.

**Lee JM, Garon E, Wong DT.** Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(3):206–211.

**Lee YH, Wong DT.** Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent* 2009; 22 (4): 241-248.

**Lewis JG.** Steroid analysis in saliva: an overview. *Clin Biochem Rev.* 2006;27:139–46. Miller C, Foley JD, Bailey AL et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med* 2010; 4 (1): 171-189.

**Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P et al.** Diagnostic potential of saliva: current state and future applications *Clin Chem* 2011; 57 (5): 675-687.

**Pink R, Simek J, Vondrakova J, et al.** Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009;153:103–10.

**Spielmann N, Wong DT.** Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* 2011;17(4):345-54.

The Wong Lab. University of California, Los Angeles (UCLA) School of Dentistry, Dental Research Institute. Disponible en: <http://www.skb.ucla.edu/wonglab/2012>.

## **EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN**

M. Rodríguez (*presidente*), D. Balsells, R. Deulofeu, M. Gassó, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, MC. Villà

ISSN 1887-6463 – Mayo 2013 (recibido para publicación julio 2012)