

MANUAL DE MARCADORES SALIVALES DE RIESGO METABÓLICO en la infancia

Elaborado por:

Rivera Hernández Andrea Samara

Rayas Hernández Tadeo Maximiliano

Amezola Villegas Natalia Paola

Preciado Puga Mónica del Carmen

Ibarra Reynoso Lorena del Rocío

Julio 2024

Introducción

El presente manual se ha diseñado con la finalidad de proporcionar una guía completa y práctica sobre la recolección, análisis y almacenamiento de muestras de saliva para la detección de marcadores de riesgo metabólico en niños. La importancia de identificar y monitorear estos marcadores desde una edad temprana no puede ser subestimada, ya que permite la intervención oportuna y la prevención de complicaciones futuras asociadas con trastornos metabólicos.

La saliva es un fluido biológico accesible y no invasivo que ha demostrado ser una valiosa fuente de información sobre el estado de salud de un individuo. A diferencia de otros métodos de recolección de muestras, como la extracción de sangre, la obtención de saliva es sencilla, indolora y no causa estrés ni ansiedad en los pacientes, especialmente en los niños. Estas características hacen que la saliva sea un medio ideal para el monitoreo regular de la salud metabólica.

En este manual, se detallarán los procedimientos adecuados para la recolección de muestras de saliva, garantizando la obtención de datos precisos y fiables. También se proporcionarán instrucciones claras sobre el análisis de estas muestras, utilizando técnicas avanzadas para identificar y cuantificar los marcadores de riesgo metabólico. Además, se abordarán las mejores prácticas para el almacenamiento de las muestras, asegurando su integridad y validez a lo largo del tiempo.

Objetivo

El objetivo principal de este manual es proporcionar una herramienta científica y práctica para que los profesionales de la salud puedan conocer los niveles de referencia de los principales marcadores salivales y las unidades de medida utilizadas. Además, busca enseñar las técnicas adecuadas para la recolección de muestras en niños, garantizando la fiabilidad de los resultados. También se enfoca en la implementación de las mejores prácticas para el almacenamiento y manejo de las muestras de saliva, asegurando su integridad hasta el momento del análisis.

Marcador Salival	Valores de referencia		Unidades de medida	Técnica de toma de la muestra	Condiciones de almacenamiento de la muestra	Análisis
	Niños	Adultos				
Glucosa	<p>Media con peso normal: 2.90</p> <p>Media con sobrepeso/obesidad: 5.35 (Tvarijonaviciute et al., 2020)</p>	<p>Saludable: 4.61 \pm 2.58</p> <p>Diabetes tipo 2: 13.96 \pm 7.09 (Patel, Dave, Karmakar, Shah, & Sarvaiya, 2015).</p>	mg/dL	Se utilizó un hisopo de algodón dentro de un tubo de centrifugación estándar (Salivette; Sarstedt, Barcelona, España). Se recogieron por la mañana en ayunas (Tvarijonaviciute et al., 2020).	Todas las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta que se suministraron al laboratorio, en el cual se mantuvieron a 80°C hasta su análisis (Tvarijonaviciute et al., 2020).	Se determinó mediante un método basado en la hexoquinasa (Beckman Coulter Ireland Inc., Irlanda) (Tvarijonaviciute et al., 2020).
Alfa-amilasa	No han sido reportados	<p>Diabéticos descontrolados: 114.7</p> <p>Diabéticos controlados: 94.7</p> <p>Individuo sano: 85.7 (Shah, Pareikh, & Manjunatha, 2021).</p>	U/L	Se recolectó saliva entera no estimulada en un recipiente estéril. Se recogieron entre las 9 y las 11 de la mañana, para evitar variaciones diurnas (Shah, Pareikh, & Manjunatha, 2021).	Se almacenaron a 4°C hasta el análisis (Shah, Pareikh, & Manjunatha, 2021).	Cada muestra se centrifugo a 5000 rpm durante 5 minutos. Los niveles de amilasa se determinaron utilizando un analizador semiautomático con el método de sustrato directo (ensayo enzimático cinético) (Shah, Pareikh, & Manjunatha, 2021).

Resistina	No han sido reportados	Sanos: 1.69 Diabéticos obesos: 14.7 ± 2.8 Diabéticos no obesos: 14.4 ± 3.6 (Abdalla, 2021)	ng/mL	Se recolectó utilizando S-Monovette (Sarstedt, Alemania) durante 10 min. Los participantes enjuagaron su boca con agua antes de la recolección (Yin, Gao, Yang, Xu, & Li, 2012).	Después de la recolección, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 1100g. El suero sobrenadante se almacena a -80°C hasta su análisis (Yin, Gao, Yang, Xu, & Li, 2012).	Mediante inmunoensayo enzimático (EK-028-36, Phoenix Pharmaceuticals Inc., EE. UU.) (Yin, Gao, Yang, Xu, & Li, 2012).
Leptina	Media: 1.23 ± 1.1	Saludables: 33.80 Con síndrome metabólico: 34.88 (Thanakun, Watanabe, Thaweboon, & Izumi, 2014).	pg/mL	Se recolectó un promedio de 5ml de saliva no estimulada en ayunas mediante la técnica de babeo de cada sujeto. Se les pidió que se enjuagaran bien la boca con agua antes de la recolección. Se recogieron entre las 9:00 a.m. y 12:00 p.m. (Ibrahim Abdalla & Siew Choo, 2018).	Después de recogerlas se mantuvieron en hielo antes de centrifugarlas a 3000 rpm y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se dividió en alícuotas de 1 ml y se almacenó a -80°C hasta su análisis (Ibrahim Abdalla & Siew Choo, 2018).	Kit de ELISA (SEA084Hu, Cloud-Clone Corp., Houston, TX, EE. UU.) (Ibrahim Abdalla & Siew Choo, 2018).
Ácido Úrico	<2 años masculino 2,12 ± 0,98 (1,31–3,51) <2 años femenino 1,11 ± 0,68 (0,46–1,82) 2 a 5 años masculino	13 a 18 años masculino 1.98 ± 1.30 (0.096–3.81) 13 a 18 años femenino 1.51 ± 0.75 (0.80–2.72) ≥19 años masculino	mg/mL	Recolección de entre 1 y 1,8 ml de saliva completa no estimulada de cada miembro de la familia. Los participantes no podían haber comido, cepillado los dientes o bebido líquidos, aparte de agua, dentro de	Todas las muestras se transportaron en hielo seco, una vez en el laboratorio se mantuvieron a -80°C hasta su análisis. (Martínez et al., 2017).	Las muestras de saliva se analizaron por duplicado para detectar sUA utilizando un kit de reacción enzimática disponible comercialmente, diseñado específicamente

	<p>2.06 ± 1.35 (0.70–5.09) 2 a 5 años femenino 3.09 ± 1.09 (1.18–5.34) 6 a 12 años masculino 1.52 ± 1.03 (0.37–4.04) 6 a 12 años femenino 1.53 ± 1.12 (0.35–4.38) (Martínez et al., 2017).</p>	<p>3.10 ± 2.00 (0.81–7.86) ≥19 años femenino 2.17 ± 1.29 (0.41–5.45) (Martínez et al., 2017).</p>		<p>una hora de proporcionar la muestra. Los niños mayores de cinco años proporcionaron saliva completa utilizando la técnica de babeo pasivo, mientras que los niños menores de seis años se sentaron en el regazo de sus padres mientras el equipo de investigación sostenía un hisopo de saliva infantil en su boca durante 3 minutos. La saliva se expresó del hisopo con una jeringa sin aguja de 5 cc en un criovial de 2,0 ml en el sitio en un esfuerzo por asegurar que se donaran volúmenes de muestra suficientes. (Martínez et al., 2017).</p>		<p>para su uso con saliva (Salimetrics, Carlsbad, CA). El ensayo utilizó un volumen de prueba de 10 µl, tuvo un rango de sensibilidad de 0,78 a 25 mg/dl, los coeficientes de variación promedio inter e intraensayo fueron menores al 10% y 5%. (Martínez et al., 2017).</p>
--	---	---	--	---	--	---

Proteína C reactiva	<p>Media con peso y estatura normal: 2.04</p> <p>Media con sobrepeso/obesidad: 5.79 (Tvarijonaviciute et al., 2020).</p>	No han sido reportados	ng/mL	Se utilizó un hisopo de algodón dentro de un tubo de centrifugación estándar (Salivette; Sarstedt, Barcelona, España). Se recogieron por la mañana en ayunas. (Tvarijonaviciute et al., 2020).	Todas las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta que se suministraron al laboratorio, en el cual se mantuvieron a 80°C hasta su análisis. (Tvarijonaviciute et al., 2020).	La PCR se analizó utilizando un kit disponible comercialmente (MILLIPLEX MAP Human e CRP Assay; Life Science, Darmstadt, Alemania) según las indicaciones del fabricante. (Tvarijonaviciute et al., 2020).
Asprosina	No han sido reportados	<p>Sanos: 23.79 ± 10.27</p> <p>Diabéticos con Dx reciente: 45.85 ± 23.07</p> <p>Diabéticos con tratamiento (3 meses): 34.41 ± 19.02 (Farrag et al., 2023).</p>	ng/mL	Se recolectó muestra de saliva de 4 ml de la región ante cubital izquierda en el grupo de control sano y los pacientes con diagnóstico de DM en tubos que contenían aprotinina (inhibidor de proteasa). (Farrag et al., 2023).	Las muestras de saliva se transfirieron a tubos de aprotinina y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, luego colocados en tubos Eppendorf y almacenados a -80°C hasta la realización del estudio. (Farrag et al., 2023).	Método ELISA siguiendo las técnicas de trabajo mencionadas en los catálogos de los kits. Rango de medición del kit ELISA de asprosina humana: 1 a 300 ng/ml, intraensayo: valor de CV < 10 %, entre ensayos: valor de CV < 12 % y la sensibilidad fue de 0,756 ng/ml. Se usó una lavadora automática Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, EE. UU.) para los

						lavados de placas y el dispositivo ChroMate Micro-plate Reader P4300 (Awareness Technology Instruments, EE. UU.) para las lecturas de absorbancia. (Farrag et al., 2023).
Adiponectina	Media: 3.72 ± 1.12 (Alqaderi et al., 2022).	No han sido reportados	pg/mL	Se obtuvieron en las escuelas temprano en la mañana después de un ayuno nocturno (≥ 12 h) y antes del desayuno y se transfirieron al laboratorio en hielo dentro de una hora. (Alqaderi et al., 2022).	Las muestras de saliva se centrifugaron a 2.800 rpm durante 20 min a 4 °C, después de lo cual los sobrenadantes se transfirieron a tubos de almacenamiento con tapa de rosca y código de barras 2D (Thermo Scientific) y se congelaron a -80 °C. (Alqaderi et al., 2022).	Las muestras se descongelaron a 4°C por la noche y se mantuvieron en hielo, durante el ensayo, el cual consistió en 25 µl de muestras de saliva utilizando paneles de perlas magnéticas multiplex en un sistema Luminex 200™ (Luminex, Austin, TX). Los resultados se evaluaron utilizando Bio-Plex Manager™ (versión 5.0; Bio-Rad, Hercules, CA). (Alqaderi et al., 2022).

Interleucinas	IL-6	<p>Media con peso y estatura normal: 0.88</p> <p>Media con sobrepeso/obesidad: 0.88 (Tvarijonaviciute et al., 2020).</p>	<p>-Paciente sano: 0 – 15</p> <p>-Paciente con obesidad: 5-30</p> <p>-Paciente diabético: 10-50</p> <p>(Yip, Chan, & Tam, 2013)</p>	pg/mL	Se utilizó un hisopo de algodón dentro de un tubo de centrifugación estándar (Salivette; Sarstedt, Barcelona, España). Se recogieron por la mañana en ayunas. (Tvarijonaviciute et al., 2020).	Todas las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta que se suministraron al laboratorio, en el cual se mantuvieron a 80°C hasta su análisis. (Tvarijonaviciute et al., 2020).	Las interleucinas se analizaron utilizando kits disponibles comercialmente (MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 e Endocrine Multiplex Assay; Life Science, Darmstadt, Alemania) según las indicaciones del fabricante. (Tvarijonaviciute et al., 2020).
	IL1 β	<p>Media con peso y estatura normal: 6.52</p> <p>Media con sobrepeso/obesidad: 17 (Tvarijonaviciute et al., 2020).</p>	<p>-Paciente sano: 10 a 50</p> <p>-Paciente con obesidad: 20-100</p> <p>-Paciente con diabetes: 30-150 (Yip, Chan, & Tam, 2013)</p>				

	TNF- α	<p>Media con peso y estatura normal: 0.54</p> <p>Media con sobrepeso/obesidad: 0.99 (Tvarijonaviciute et al., 2020).</p>	<p>-Paciente sano: 0 a 10</p> <p>-Paciente con obesidad: 5-20</p> <p>-Paciente con diabetes: 10-30 (Engelbrechtsen et al., 2013)</p>				
	IL-8	<p>Media con peso y estatura normal: 39</p> <p>Media con sobrepeso/obesidad: 46 (Tvarijonaviciute et al., 2020).</p>	<p>-Paciente sano: 200 – 600</p> <p>-Paciente con obesidad: 300-800</p> <p>-Paciente con diabetes: 400-1000 (Rakchanok, Kawahara, Ide, & Inagaki, 2017)</p>				

Referencias

- Abdalla, M. M. I. (2021). Salivary resistin level and its association with insulin resistance in obese individuals. *World journal of diabetes*, 12(9), 1507–1517. <https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i9.1507>
- Alqaderi, H., Hegazi, F., Al-Mulla, F., Chiu, C. J., Kantarci, A., Al-Ozairi, E., Abu-Farha, M., Bin-Hasan, S., Alsumait, A., Abubaker, J., Devarajan, S., Goodson, J. M., Hasturk, H., & Tavares, M. (2022). Salivary biomarkers as predictors of obesity and intermediate hyperglycemia in adolescents. *Frontiers in Public Health*, 10, 800373. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.800373>.
- Engebretsen, K. A., Bagger-Skjøt, L., Johansen, J. D., & Thyssen, J. P. (2013). Salivary cytokine levels in patients with type 2 diabetes mellitus and their association with periodontal status. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 100(3), e35-e38. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.03.009>.
- Ibrahim Abdalla, M. M., & Siew Choo, S. (2018). Salivary Leptin Level in Young Adult Males and its Association with Anthropometric Measurements, Fat Distribution and Muscle Mass. *European endocrinology*, 14(2), 94–98. <https://doi.org/10.17925/EE.2018.14.2.94>
- Martínez, A. D., Ruelas, L., & Granger, D. A. (2017). Association between body mass index and salivary uric acid among Mexican-origin infants, youth, and adults: Gender and developmental differences. *Developmental Psychobiology*, 59(2), 225-234. <https://doi.org/10.1002/dev.21492>
- Patel, B. J., Dave, B., Dave, D., Karmakar, P., Shah, M., & Sarvaiya, B. (2015). Comparison and correlation of glucose levels in serum and saliva of both diabetic and non-diabetic patients. *Journal of international oral health : JIOH*, 7(8), 70–76.
- Rakchanok, N., Kawahara, R., Ide, M., & Inagaki, T. (2017). Salivary biomarkers in the context of type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(10), 1048-1061. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12792>
- Shah, V. S., Pareikh, D., & Manjunatha, B. S. (2021). Salivary alpha-amylase-biomarker for monitoring type II diabetes. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 25(3), 441–445. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_84_21
- Thanakun, S., Watanabe, H., Thaweboon, S., & Izumi, Y. (2014). Comparison of salivary and plasma adiponectin and leptin in patients with metabolic syndrome. *Diabetology & metabolic syndrome*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-19>
- Tvarijonaviciute, A., Martinez-Lozano, N., Rios, R., Marcilla de Teruel, M. C., Garaulet, M., & Cerón, J. J. (2020). Saliva as a non-invasive tool for assessment of metabolic and inflammatory biomarkers in children. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 39(8), 2471–2478. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.10.034>
- Yin, J., Gao, H., Yang, J., Xu, L., & Li, M. (2012). Measurement of salivary resistin level in patients with type 2 diabetes. *International journal of endocrinology*, 2012, 359724. <https://doi.org/10.1155/2012/359724>
- Yip, V. L., Chan, J. C., & Tam, L. S. (2013). Elevated levels of interleukin-6 in the saliva, but not serum, of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(3), 310-315. <https://doi.org/10.1111/jdi.12052>