



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia
Departament d'Estomatologia

**Perfil metabólico salival en pacientes de
edad infantil y su relación con la caries
dental**

Programa de doctorado en Odontología

Código 3143

TESIS DOCTORAL

Doctorando:

Oscar Andrés Musalem Domínguez

Dirigida por:

Prof. Dr. D. José María Montiel Company

Prof. Dr. D. José Manuel Almerich Silla

Marzo-2024



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Dr. D. José María Montiel Company, Profesor Titular del Departamento d'Estomatologia de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, Dr. D. José Manuel Almerich Silla, Profesor Catedrático del Departamento d'Estomatologia de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título «Perfil metabólico salival en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental», ha sido realizada bajo su dirección por Don Oscar Andrés Musalem Domínguez, y que a su juicio reúne los requisitos para su lectura y obtención del Grado de Doctor en Odontología.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a diecinueve de febrero de dos mil veinticuatro.

Dr. José María Montiel Company

Dr. José Manuel Almerich Silla

Agradecimientos

En primer lugar, quiero destacar la significativa contribución del Dr. José María Montiel Company en esta investigación, agradeciéndole por abrirme las puertas y permitirme trabajar junto a él en un momento complejo de mi vida. Igualmente, me gustaría reconocer su dedicación y generosidad de compartir sus conocimientos para la realización exitosa de esta Tesis.

Asimismo, me gustaría demostrar mi gratitud al Dr. José Manuel Almerich Silla, por su interés en participar de este proyecto, así como por su entrega y aportación crítica y objetiva a esta investigación. Además, deseo valorar su experiencia, la cual, sin lugar a duda, ha enriquecido el trabajo final.

A mis compañeros de la asignatura de Odontología preventiva y comunitaria, por integrarme y hacerme sentir como uno más de ellos, sentimiento que valoraré y estaré siempre agradecido a cada uno, en especial a Anna y Teresa, que desde un comienzo me han invitado a participar en sus vidas.

Un eterno agradecimiento a mi familia, que a pesar de los más de 11.000 km de distancia, estos no fueron un obstáculo, permitiéndome sentir el apoyo incondicional que he tenido a lo largo de toda mi vida y que me ha facilitado llegar hasta este momento. Y por último, a Andrea le dedico el reconocimiento más profundo, a razón de que sin su apoyo, paciencia e inspiración no habría sido posible finalizar todo este trabajo.

A todos ustedes infinitas gracias.

*A todos los niños y niñas que han sufrido los
horrores de la guerra*

ÍNDICE

Índice

Introducción	1
Revisión de la literatura	5
Generalidades de la saliva	5
Anatomía y estructuras de las glándulas salivales	5
Mecanismo de regulación neuronal	9
Mecanismo de secreción y flujo salival	13
Componentes salivales y sus funciones	16
Métodos de recolección de saliva	19
Generalidades del <i>biofilm</i>	21
Etapas de formación del <i>Biofilm</i>	22
Estructura y composición	28
La era de las ciencias ómicas	31
Genómica	34
Transcriptómica	34
Proteómica	35
Metabolómica	36
La enfermedad de la caries dental	44
Metabolómica y caries	47
Objetivos	59
Objetivo General	59
Objetivos Específicos	59
Material y Método	63
Diseño del estudio	63
Muestra	63
Tamaño muestral	63
Selección de la muestra	64
Consentimiento informado	64
Trabajo de campo	65
Material utilizado	65
Recolección de datos y muestras	66
Formulario de exploración	67
Variables personales	67

Variables clínicas	68
Cuestionario de salud oral	74
Procesamiento y análisis de datos	75
Adquisición y procesamiento de los datos con RMN	75
Análisis estadístico	81
Resultados	85
Descriptiva de la muestra	85
Descriptiva caso y control	87
Análisis de diagnóstico de caries	90
Criterio de caries ICDAS	90
Análisis de índices de caries	91
Necesidad de tratamiento	92
Índice Periodontal Comunitario	94
Lesiones de mucosa oral	96
Fluorosis	96
Trauma dental	97
Hipomineralización incisivo molar (<i>MIH</i>) e Hipomineralización en segundos molares temporales (<i>HSPM</i>)	97
MIH en correspondencia con el grado de afectación	99
HSPM en correspondencia con el grado de afectación	100
Cuestionario de Salud	101
Análisis metabólico	109
Análisis de componentes principales	110
Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales	111
Discusión	123
Diseño del estudio	123
Metodología de la recolección salival	126
Resultados	129
Limitaciones del estudio	134
Conclusiones	139
Bibliografía	143
Anexos	171

Anexo I: Registro Clínico	171
Anexo II: Cuestionario de salud oral	175
Anexo III: Consentimiento informado Centro de Salud Malva-rosa	179
Anexo IV: Consentimiento informado Centro de Salud Nazaret	189
Anexo V: Informe del Comité de Ética de investigación en Humanos de la Universitat de València	199
Anexo VI: Informe del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia	200
Anexo VII: Recordatorio cita	201
Anexo VIII: Artículo	202
Anexo IX: Supplementary Summary	209

Abreviaturas y siglas

ACo	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
AUC	Área bajo la curva
Ca^{2+}	Calcio
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CH	Carbohidratos
Cl^{-}	Cloruro
CS	Centro de Salud
EADP	European Academy of Paediatric Dentistry
EM	Espectrometría de masas
ENT	Enfermedades no transmisibles
HGP	Proyecto del Genoma Humano
HMDB	Del inglés <i>The Human Metabolome Database</i>
HSPM	Hipomineralización en segundos molares temporales
Hz	Hercio o Hertz
IgA	Inmunoglobulina A
IPC	Índice Periodontal Comunitario
K^{+}	Potasio
MHz	Megahercio
MIH	Hipomineralización Inciso Molar
NA	Noradrenalina
Na^{+}	Sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Análisis de Componentes Principales
PLS-DA	Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROC	Del inglés <i>Receiver operating characteristic</i>
SAD	Sistema de Arginina Deiminasa
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SWS	Saliva total estimulada
UCN	Unidades de concentración normalizada
USD	Dólar estadounidense
UWS	Saliva total no estimulada
VIP	Del inglés <i>Variable Importance in Projection</i>
χ^2	Chi cuadrado

Índice de figuras

Figura 1. Estructura acinar y sistema ductal de la glándula salival.	7
Figura 2. Visión esquemática de la formación del <i>biofilm</i> .	27
Figura 3. Diagrama de flujo de las ciencias ómicas.	32
Figura 4. Esquema de la «cascada ómica».	38
Figura 5. Gráfica de la tendencia de la variable $\text{cod/CAOD} > 0(\%)$ en individuos de 5-6 años (temporal).	45
Figura 6. Gráfica de la tendencia de la variable $\text{cod/CAOD} > 0(\%)$ en individuos de 12 años.	45
Figura 7. Hipótesis de la placa ecológica y la prevención de la caries dental.	47
Figura 8. Espectrómetro de RMN Bruker Avance DRX 600 Mhz.	77
Figura 9. Representación del preprocesamiento de datos.	78
Figura 10. Visión general de la deconvolución de los espectros utilizando la base de datos Chenomx NMR Suite 8.1.	79
Figura 11. Esquema de flujo de trabajo.	80
Figura 12. Distribución porcentual de los Centros de Salud del total de la muestra.	85
Figura 13. Distribución porcentual según sexo del total de la muestra.	86
Figura 14. Distribución porcentual por edad del total de la muestra.	86
Figura 15. Representación porcentual de la clase social del total de la muestra.	87
Figura 16. Distribución porcentual de casos y controles.	88
Figura 17. Distribución porcentual de sexo según casos y controles.	89
Figura 18. Distribución porcentual de la clase social según casos y controles.	89
Figura 19. Descriptiva de necesidad de tratamiento por caso y control.	93
Figura 20. Distribución porcentual por grado del IPC del total de la muestra.	95
Figura 21. Prevalencia de sangrado de casos y controles.	96
Figura 22. Distribución porcentual de casos y controles según criterio de afectación de MIH.	99
Figura 23. Distribución porcentual de casos y controles según criterio de afectación de HSPM.	100
Figura 24. Distribución porcentual pregunta N.º 4. ¿Cuál fue la razón de la última visita al dentista de tu hijo/a?	103
Figura 25. Distribución porcentual de otros elementos auxiliares de higiene oral.	104
Figura 26. Representación del espectro de $^1\text{HNMR}$ de la saliva total de un control y caso.	109

Figura 27. Gráfico T2 de Hotelling/Residuals del PCA obtenido del total de las muestras.	110
Figura 28. Diagrama de cargas del PCA del total de las muestras, excluida la muestra outlier.	111
Figura 29. Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda variable latente (LV 1 y LV 2) del PLS-DA de las muestras de saliva analizadas.	112
Figura 30. Metabolitos que más contribuyen al modelo PLS-DA de las muestras de saliva con una puntuación VIP ≥ 1 ordenados por su contribución relativa.	113
Figura 31. Curva ROC otorgada por la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre casos y controles.	114

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de las ventajas y desventajas de la RMN en comparación con la EM en aplicaciones metabólicas.	43
Tabla 2. Descriptiva de la muestra según casos y controles.	88
Tabla 3. Análisis de códigos de caries ICDAS por superficie y dentición permanente, como también la media de dientes y superficies ausentes y obturadas por caries.	90
Tabla 4. Análisis de códigos de caries ICDAS por superficie y dentición temporal, como también la media de dientes y superficies ausentes y obturadas por caries.	91
Tabla 5. Análisis de indicadores de caries.	92
Tabla 6. Descriptiva de necesidad de tratamiento por caso y control.	93
Tabla 7. Descriptiva de la media del IPC, N.º de sextantes con sangrado y N.º de sextantes sanos.	94
Tabla 8. Prevalencia de sangrado en casos y controles en relación con el IPC.	95
Tabla 9. Frecuencia del estado de erupción, estado clínico y de extensión de la lesión, de los dientes índices según la clasificación de MIH otorgada por la EAPD.	98
Tabla 10. Frecuencia del estado de erupción, estado clínico y de extensión de la lesión, de los dientes índices según la clasificación de MIH otorgada por la EAPD.	98
Tabla 11. Descriptiva de la muestra caso y control según criterio de afectación de MIH.	99
Tabla 12. Descriptiva de la muestra caso y control de acuerdo con el criterio de afectación de HSPM.	100
Tabla 13. Pregunta N.º 1 ¿Cómo describirías la salud de los dientes y encías de tu hijo/a?	101
Tabla 14. Pregunta N.º 2 ¿Con qué frecuencia durante los últimos 12 meses tu hijo/a tuvo dolor de muelas o se sintió incómodo con sus dientes?	102
Tabla 15. Pregunta N.º 3. ¿Con qué frecuencia fue tu hijo/a al dentista durante los últimos 12 meses?	102
Tabla 16. Pregunta N.º 5. ¿qué tan frecuente se lava los dientes tu hijo/a?	103
Tabla 17. Pregunta N.º 6. ¿Utiliza tu hijo/a alguno de los siguientes para realizar su limpieza dental o de encías?	104
Tabla 18. Pregunta N.º 7. ¿Usa pasta de dientes para lavarse los dientes?/¿Utiliza pasta dental que contenga flúor?	105
Tabla 19. Pregunta N.º 8. Debido al estado de los dientes y boca, ¿su hijo/a ha experimentado alguno de los siguientes problemas durante el último año?	106

Tabla 20. Pregunta N.º 9. ¿Con qué frecuencia come o bebe alguno de los siguientes alimentos, incluso en pequeñas cantidades?	107
Tabla 21. Pregunta N.º 10. ¿Con qué frecuencia fuman los familiares convivientes del niño/a?	108
Tabla 22. Pregunta N.º 11 y 12. ¿Qué nivel de educación ha completado el padre/madre?	108
Tabla 23. Descriptiva de la media de las unidades de concentraciones normalizadas de los metabolitos analizados en el total de la muestra, excluida la muestra atípica. (ds) Desviación estándar. * p-valor significativo < 0,05	115
Tabla 24. Metabolitos estadísticamente significativos entre casos y controles, excluida la muestra atípica.	119
Tabla 25. Resumen de estudios que investigan el potencial de la metabolómica salival y su relación con la caries dental en pacientes infantiles.	133

RESUMEN

Resumen

Introducción: El avance de las ciencias básicas y aplicadas ha impulsado el desarrollo de las Ciencias Ómicas. Entre ellas, la metabolómica salival tiene un importante potencial en la comprensión de la caries dental (Fidalgo et al., 2013, 2015; Pereira et al., 2019), una de las enfermedades no transmisibles más prevalentes a nivel mundial (OMS, 2022), con importantes repercusiones económicas y en la calidad de vida de las personas. Por lo tanto, el estudio de la metabolómica salival y su relación con la caries dental es fundamental, proporcionando una comprensión profunda del proceso de caries que ayuda -a su vez- en el desarrollo de estrategias para prevenirla.

Objetivos: El objetivo principal del estudio fue determinar la capacidad predictiva de un modelo de caries basado en el perfil metabolómico salival en pacientes infantiles. Además, analizar los hábitos e higiene bucal de los sujetos y su relación con la caries dental. Adicionalmente, determinar la composición del perfil metabolómico e identificar los metabolitos con mayor potencial como biomarcadores predictivos de caries dental entre los grupos de estudio.

Material y método: Se diseñó un estudio de casos (n=31) y controles (n=37) en niños de entre 6 y 12 años (edad media de los casos= 8,9; controles= 8,7). Todos los niños asistieron a Centros de Salud de Valencia, España. Las exploraciones intraorales fueron realizadas por un solo examinador utilizando los criterios diagnósticos de ICDAS II. Las muestras de saliva total no estimulada se analizaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Resultados: El índice cod para los casos fue de 2.84 y para controles de 0.19 y el índice CAOD fue de 1.13 y 0.11, respectivamente. El modelo predictivo generado mediante el análisis multivariante PLS-DA proyecta en el diagrama de puntuaciones una separación entre casos y controles con una capacidad predictiva con un área

bajo la curva de 0.71. Los metabolitos que muestran mayor significancia en el modelo (p -valor $< 0,1$) son los siguientes: 3-metil-2-oxovalerato, 3-hidroxiбутирato, lactato, acetona, citrato, ornitina, etanolamina, taurina, prolina, glicina, manosa, glucosa, 1-6-anhidro- β -D-glucosa y citraconato. En los controles, la glicina (d de Cohen = 0,430) y la glucosa (d de Cohen = 0,546) presentan medias más elevadas en comparación con los casos. Por el contrario, la taurina (d de Cohen = 0,474) y la manosa (d de Cohen = 0,456) muestran medias más elevadas en los casos frente a los controles.

Conclusión: Nuestros hallazgos muestran una diferencia en los perfiles metabolómicos salivales, específicamente en los grupos de sacáridos y aminoácidos. Esta diferencia sugiere una asociación de estos con el nivel de riesgo de caries. En términos de significancia clínica, los resultados reportados en el presente estudio refuerzan el uso de la metabolómica salival como método de investigación para la búsqueda de biomarcadores salivales que permitan evaluar el riesgo de caries en los pacientes. Además, el estudio de estos biomarcadores acercará la odontología a la medicina personalizada de precisión, lo que ayudará, paralelamente, a desarrollar estrategias para prevenir la caries dental.

SUMMARY

Summary

Introduction: The advancement of basic and applied sciences has driven the development of the Omics Sciences. Among these, salivary metabolomics holds potential significance in understanding dental caries (Fidalgo et al., 2013, 2015; Pereira et al., 2019), one of the most prevalent non-communicable diseases worldwide (WHO, 2022) with substantial economic repercussions and impacts on people's quality of life. Thus, the study of salivary metabolomics and its relationship with dental caries is invaluable, providing a profound understanding of the caries process that help -in turn- in developing strategies to prevent dental caries.

Objectives: The main objective of the study was to determine the predictive capacity of a model of caries based on the salivary metabolomic profile in infant patients. Also, analyze the oral habits and hygiene of the subjects and their relationship with dental caries. Additionally, determine the composition of the metabolomic profile and identify the metabolites with the greatest potential as predictive biomarkers of dental caries among the study groups.

Methods: A study of cases (n=31) and controls (n=37) was designed for children aged between 6 and 12 (mean age of cases= 8.9; controls= 8.7). All children attended public health centers in Valencia, Spain. Intraoral examinations were performed by a single examiner using ICDAS II diagnostic criteria. Unstimulated total saliva samples were analyzed by NMR spectroscopy.

Results: The dft index for the reviewed cases was 2.84 while for the control group was 0.19; the DMFT index was 1.13 and 0.11, respectively. The predictive model generated by the multivariate PLS-DA analysis projects a separation between the cases and the controls on the score chart with a predictive capacity and generating an AUC of 0.71. The metabolites that show greater significance in the model (p-value < 0.1) are the following: 3-methyl-2-oxovalerate, 3-

hydroxybutyrate, lactate, acetone, citrate, ornithine, ethanolamine, taurine, proline, glycine, mannose, glucose, 1-6-Anhydro- β -D-glucose and citraconate. In the controls, glycine (Cohen's $d=0.430$) and glucose (Cohen's $d=0.546$) present higher means compared to the cases. On the contrary, taurine (Cohen's $d= -0.474$) and mannose (Cohen's $d= -0.456$) show higher means in cases compared to controls.

Conclusion: Our findings show a difference in salivary metabolomic profiles, specifically in the groups of saccharides and amino acids. This difference suggests an association of these with the level of caries risk. In terms of clinical significance, the results reported in the present study reinforce the use of salivary metabolomics as a research method for the search of salivary biomarkers that allow the evaluation of the caries risk in patients. Further, the study of these biomarkers will bring dentistry closer to personalized precision medicine, which will help -in turn- in developing strategies to prevent dental caries.

INTRODUCCIÓN

Introducción

La «era de las ciencias ómicas» comienza a finales del siglo XX, gracias a los avances en diversas áreas de las ciencias básicas y aplicadas, como la bioquímica, genética, biología molecular y bioinformática. Una de las etapas fundamentales que permitió dar comienzo a esta nueva era de investigación fue la secuenciación del genoma humano, poniendo la genómica a disposición como primer campo de investigación. A este campo le siguió la transcriptómica, proteómica y metabolómica.

Las ciencias ómicas proporcionan una visión global de múltiples grupos de moléculas que componen una célula, tejido u órgano de una persona, incluyendo las interacciones de estos grupos con factores externos como puede ser el ambiente. Su avance ha provocado un cambio de paradigma en la forma de plantear y solucionar los problemas biomédicos, pasando de investigaciones tradicionales que analizan de manera individual a los elementos que constituyen un sistema biológico (enfoque reduccionista), a una visión holística del sistema biológico (enfoque basado en la biología de sistema). De esta forma, la información derivada de estas ciencias tiene el potencial de caracterizar de forma íntegra a los organismos.

En conformidad con los principios de la biología molecular clásica y sus niveles organizacionales, la metabolómica se localizaría en el último escalón de la denominada «cascada ómica», convirtiéndose en la ciencia complementaria del estudio de los otros niveles funcionales -genoma, transcriptoma y proteoma-, por cuanto sus resultados aportan el retrato más directo del fenotipo biológico manifestado por un organismo.

Sobre este campo, la metabolómica salival permite observar el funcionamiento interno de un individuo por medio de la ejecución de sofisticadas técnicas analíticas, como es la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de

masas. Lo anterior, otorga la posibilidad de identificar una gran variedad de metabolitos que podrían ser potenciales biomarcadores de salud y enfermedad. De hecho, en la actualidad, se sugiere su uso en investigaciones relacionadas a enfermedades como el cáncer oral, autoinmunes, cardiovasculares, neurodegenerativas, entre otras.

Ahora bien, en la última década se han promovido las investigaciones de metabolómica salival y su relación con la caries dental debido a que esta enfermedad crónica no transmisible es una de las más prevalentes a nivel global. En efecto, reportes recientes informan que aproximadamente 2.000 millones de pacientes presentan caries en dientes permanentes sin tratar, mientras que alrededor de 500 millones de niños/as tienen caries no tratadas en dientes temporales (WHO, 2022), teniendo un impacto considerable en la calidad de vida de los niños y niñas. Asimismo, la caries dental tiene una importante carga económica para los sistemas sanitarios de los países, ya sea debido a sus costes directos o bien indirectos. Por consiguiente, la caries dental representa uno de los mayores problemas de salud mundial que requiere de acciones inmediatas.

El presente estudio nace así del inquebrantable impulso de comprender de forma holística a la caries dental en pacientes en edad infantil. Para ello, se busca identificar biomarcadores específicos de la enfermedad de la caries y determinar la capacidad de un modelo predictivo de la caries, basado en el perfil metabolómico salival del paciente.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Revisión de la literatura

Generalidades de la saliva

La comprensión de la fisiología salival en el ser humano comenzó a ser objeto de escrutinio científico a principio del siglo XX, con el desarrollo del primer sistema de recolección de saliva por parte de Carlson y Crittenden (1910), el cual consistía en la obtención de saliva secretada por la glándula parótida. Lo anterior, favoreció que en los años venideros continuarán los avances en esta materia y se reportarán estudios relacionados con el flujo salival (Becks and Wainwright, 1943), sistemas de recolección salival para las glándulas sublingual, submandibular (Schneyer, 1955) y glándulas menores (Dawes and Wood, 1973), así como también sobre la composición de la saliva (Thaysen et al., 1954), mecanismo de secreción salival, entre otros.

La saliva es un biofluido complejo, formado por elementos derivados de las mucosas orales, fluido crevicular, microorganismos y otros compuestos exógenos, proporcionando conocimiento sobre el hospedero y su relación con el medio ambiente (Ekström et al., 2019; Hemadi et al., 2017; Humphrey and Williamson, 2001; Llena-Puy, 2006; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Ahora bien, para una mejor comprensión sobre los componentes y la función de la saliva, se describirá a continuación las estructuras que permiten la formación y secreción de ésta.

Anatomía y estructuras de las glándulas salivales

Las glándulas salivales se conforman principalmente por dos elementos, el parénquima y el estroma. El parénquima o porción funcional está constituido por la unidad secretora de la glándula, denominado adenómero, y por el sistema de conductos excretores. El adenómero está compuesto por un conjunto de células secretoras de diversa morfología, que son las que determinarán el tipo de secreción

salival que va a ser producida, y a razón de eso se clasifican tres variedades de adenómeros: acinos serosos, mucosos y mixtos (Arriaga et al., 2019). Por otra parte, el sistema ductal de las glándulas mayores, representado en la figura 1, está agrupado en conductos intercalares, estriados y excretores. Los conductos intercalares conforman la primera red de conductos -se originan a partir de cada acino- y cumplen una función pasiva en el transporte de la saliva primaria. Posteriormente le siguen los conductos estriados, que se originan por la unión de dos o más conductos intercalares; en estos se observa una intervención activa de sus células, generándose intercambios iónicos que modifican la saliva primaria transformándola en saliva secundaria. El último segmento del sistema de conductos está asignado a los conductos excretores o colectores, que también ejercen un rol activo en la modificación de la saliva y son los que conducen finalmente a la saliva hacia la cavidad oral (Arriaga et al., 2019; Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018). En cuanto a las glándulas menores, generalmente se distinguen entre conductos intra y extralobulillares (Arriaga et al., 2019).

Adicionalmente, se encuentran dentro de la membrana basal de las distintas glándulas las células mioepiteliales, que abrazan a las células secretoras y en ocasiones a los conductos intercalados (Arriaga et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018). Estas tienen como principal función facilitar la expulsión de la secreción de las células acinares por medio de su contracción, que se efectúa a través de la estimulación mediada por el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) (Arriaga et al., 2019; Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Proctor, 2016).

Ahora bien, el estroma está conformado por tejido conectivo que divide, sostiene y encapsula al parénquima glandular. A través de este tejido de sostén se lleva a cabo la irrigación e inervación de las glándulas salivales. Asimismo, conforma tabiques que dividen al parénquima en lóbulos y lobulillos. En las glándulas menores este tejido conjuntivo se observa amalgamado con el tejido conectivo circundante y no hay una verdadera cápsula ni una arquitectura lóbulo-lobulillar (Arriaga et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Peydró Olaya and Carda Batalla, 2010).

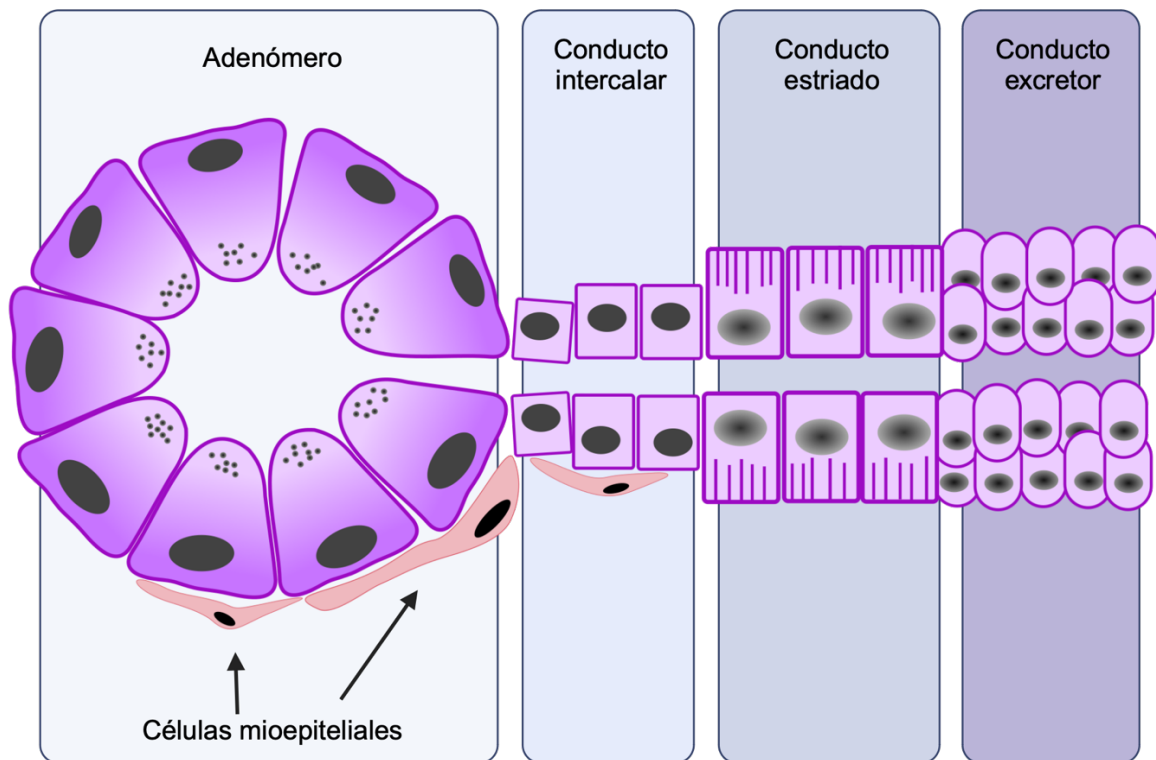


Figura 1. Estructura acinar y sistema ductal de la glándula salival.

Fuente: Elaboración propia.

Las glándulas salivales son de carácter exocrino, al igual que las glándulas sudoríparas, mamarias y sebáceas, y están clasificadas según su tamaño e importancia funcional como glándulas salivales mayores y menores (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016). Paralelamente, se pueden catalogar según el tipo de secreción que generen en base a su propia histología: glándulas serosas, mucosas y mixtas (Hernández and Taylor, 2020).

Las glándulas salivares mayores están conformadas por tres pares de glándulas bilaterales, que incluyen la glándula parótida, submandibular y sublingual (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hemadi et al., 2017; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018). Estas son las que más aportan en cuanto a electrolitos y volumen (aproximadamente 90%) a la saliva no estimulada (Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018).

La glándula parótida es la más grande en relación con las otras dos glándulas mayores, con un peso aproximado de 25 gramos. Sin embargo, genera tan solo el 20-25% de la saliva total no estimulada (UWS, por sus siglas en inglés) (Humphrey and Williamson, 2001). Las células acinares de ésta producen un tipo de secreción principalmente serosa, con muy poca o sin mucina, y rica en enzimas, convirtiéndola en una saliva de carácter acuosa (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016).

La glándula submandibular es la segunda más grande y contribuye con el 60% aproximadamente de la UWS (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001). Es una glándula de tipo mixta, es decir, contiene una población celular mixta de acinos que producen un fluido viscoso, rico en enzimas y mucinas (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016).

Por último, la glándula sublingual es de secreción mixta (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020), con predominio mucoso, tendiendo a ser más viscoelástica (Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016). Esta contribuye con un 5-10% de la UWS (Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018).

Por otra parte, las glándulas salivales menores, denominadas así por el tamaño que tienen, están ubicadas justo debajo de la superficie de la mucosa oral o submucosa y están distribuidas en diferentes zonas de la cavidad oral, tales como el labio inferior, lengua, paladar, mejillas, faringe y zona retromolar (Arriaga et al., 2019; Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Se calcula que son responsables de menos del 10% de la producción diaria de UWS, y a excepción de las glándulas linguales de Von Ebner -que son serosas- son consideradas de naturaleza mayoritariamente mucosa, producto de su secreción rica en mucina (Arriaga et al., 2019; Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

Finalmente, cabe destacar que algunas de estas glándulas salivales menores, son las principales responsables de producir componentes protectores, tales como, agentes antibacterianos y antimicrobianos (Hernández and Taylor, 2020). Además, suministran la mayoría de las sustancias sanguíneas encontrada en la saliva, como la proteína C-reactiva y ciertas inmunoglobulinas (Hernández and Taylor, 2020).

Mecanismo de regulación neuronal

La secreción salival y sus diferentes tipos celulares están íntimamente asociada a ambas divisiones funcionales del SNA, es decir, de su rama simpática y parasimpática (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Proctor, 2016). La activación y funcionamiento de ambas ramas del SNA resulta en una interacción sinérgica -no antagonista- que permiten satisfacer las demandas fisiológicas salivales (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020). Su regulación es a través de reflejos constituidos por una vía aferente, por los núcleos o centros de salivación y una vía eferente, que conducen a la activación de las células de las glándulas salivales (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Pedersen et al., 2018).

A nivel de la cavidad oral se encuentran una gran variedad de receptores sensoriales que se activan en respuesta a algún tipo de estímulo. Las papilas gustativas, ubicadas en diversas regiones, por ejemplo lengua, paladar blando, zonas vestibulares, etcétera, permiten identificar sabores, tales como el dulce, amargo, salado y ácido, estos dos últimos son los que generan mayor estimulación del reflejo gustativo-salival (Ekström et al., 2019).

Por otra parte, los mecanorreceptores ubicados en el ligamento periodontal y mucosa gingival se excitan al momento de la masticación, y activan el reflejo masticatorio-salival, que involucra preferentemente la estimulación de la inervación parasimpática, aumentando la secreción salival (Ekström et al., 2019). Adicionalmente, situados en la región del techo de la cavidad nasal, más específicamente en la lámina cribiforme, encontramos a los receptores olfativos, que

reaccionan a moléculas volátiles del flujo de aire nasal y retronasal (Ekström et al., 2019).

Los nociceptores también pueden activarse, por ejemplo, cuando hay ingesta de alimentos picantes, o bien, en casos de las disfunciones de la deglución que provocan dolor, y que en conjunto con los mecanorreceptores, aumentan la secreción salival (Ekström et al., 2019). Igualmente, los estímulos térmicos pueden influir en la estimulación de la secreción salival, siendo los líquidos más fríos lo que producen mayor volumen. De igual manera, la sequedad actúa como otro estímulo para aumentar la secreción salival (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018).

En cuanto al reflejo gustativo-salival, este envía señales aferentes del gusto, procedentes de la activación de quimiorreceptores ubicados en las papilas gustativa de la lengua, que se transmiten por el nervio facial, nervio glosofaríngeo y nervio vago hacia el núcleo del tracto solitario, y este remite interneuronas en dirección a los centros salivales superior e inferior (Bagán Sebastián, Gavalda Esteve, et al., 2010; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). La excitación por medio del gusto permite activar a ambas ramas del SNA (Ekström et al., 2019)

Por otro lado, el reflejo masticatorio-salival conduce los impulsos somatosensoriales, inducidos por la activación de los mecanorreceptores del ligamento periodontal, y los propioceptores y/o nociceptores de la mucosa oral. Estas señales son conducidas por el nervio trigémino hacia su núcleo trigeminal, el cual se comunica posteriormente con los centros salivales y con estructuras cerebrales superiores (Bagán Sebastián, Gavalda Esteve, et al., 2010; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

En resumen, los impulsos sensoriales aferentes se transmiten a los centros salivales y a estructuras cerebrales superiores, con la intención de enviar posteriormente proyecciones eferentes excitatorias o inhibitorias a los centros salivales (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018).

En relación con la vía eferente, ésta está formada por neuronas secretomotoras parasimpáticas y simpáticas, que inervan las glándulas salivales. Las estructuras secretoras de una glándula, es decir, los acinos, conductos y células mioepiteliales, están ricamente inervadas de forma regular por nervios parasimpáticos y de manera variable por la inervación simpática (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018).

Por un lado, la inervación parasimpática es responsable de la secreción de grandes volúmenes de saliva, mientras que la inervación simpática genera un flujo salival generalmente escaso (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Debido a lo anterior, se ve reflejada una mayor concentración de proteínas en la saliva simpática que en aquella parasimpática (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

Ahora bien, la rama parasimpática del SNA, controla a las glándulas salivales mediante sus centros salivales superior, inferior y su zona intermedia (Ekström et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020). El centro salival superior forma parte del nervio facial, que por medio de su rama intracraneal, llamada nervio cuerda del tímpano, se une con el nervio lingual, otorgándole fibras parasimpáticas eferentes al ganglio submandibular. Este último, a través de sus fibras nerviosas postganglionares brinda la inervación a las glándulas submandibular y sublingual (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016).

Por otro lado, el centro salival inferior, perteneciente a uno de los núcleos del nervio glossofaríngeo (IX par craneal), entrega mediante su rama del nervio timpánico, la inervación preganglionar parasimpática de la glándula parótida al ganglio ótico (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016). De igual forma, hay estudios que sugieren que también existen fibras nerviosas pertenecientes al nervio cuerda del tímpano, que contribuyen a la inervación preganglionar (Diamant and Wiberg, 1965; Reichert and Poth, 1933). Posteriormente, a través de sus fibras postganglionares, más específicamente a través del nervio auriculotemporal, es que

se inervará finalmente la glándula parótida (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016)

Las glándulas salivales menores son provistas de fibras nerviosas parasimpáticas eferentes de la rama bucal del nervio mandibular, inervando a las glándulas de las regiones molares, bucal y labial. De igual forma, por el nervio lingual, encargado de la inervación de las zonas de las glándulas linguales; por último, las regiones de las glándulas palatinas son inervadas por el nervio palatino (Ekström et al., 2019; Proctor, 2016).

Los centros de salivación simpáticos, ubicado en los segmentos torácicos superiores de la médula espinal (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Proctor, 2016), transmiten sus vías eferentes a través del tronco simpático paravertebral, que transporta las fibras preganglionares ascendentes desde el ganglio torácico hasta la sinapsis en el ganglio cervical superior (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Pedersen et al., 2018). Luego, las fibras postganglionares difunden ramas, que por medio del plexo de la arteria carótida externa y sus ramas, como la arteria facial, les permite alcanzar a los tres pares de las glándulas salivales mayores (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019).

Sin embargo, aún no está completamente determinada anatómicamente la inervación, pudiendo ser, por ejemplo, que la glándula parótida logre ser inervada por vía arteria carótida externa como intracraneal (Ekström et al., 2019). La discrepancia descrita con anterioridad es producto que en el ser humano aún no se conocen con exactitud las vías neuroanatómicas de las conexiones entre los centros de salivación y las estructuras del prosencéfalo, siendo mayormente conocimientos derivados de estudios de animales (Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018).

Mecanismo de secreción y flujo salival

La activación del proceso de secreción salival es mediada por neurotransmisores, principalmente por acetilcolina (ACo) y noradrenalina (NA), que dan respuestas de tipo colinérgicas y adrenérgicas, respectivamente (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020). Además, se encuentran otros neuropéptidos, por ejemplo el péptido intestinal vasoactivo, el óxido nítrico, neuroquinina A, neuropéptido Y, etcétera, que actúan como cotransmisores, teniendo efectos sobre los vasos sanguíneos y células acinares, induciendo por sí mismo la secreción o bien potenciando los efectos de los neurotransmisores clásicos. Lo anterior, se puede traducir en una modificación de la secreción de proteínas y/o fluidos (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018).

Los receptores sobre los que actúan los neurotransmisores se encuentran en la membrana celular de las células acinares, específicamente en su cara basolateral. La NA actúa sobre los receptores adrenérgicos subtipo $\alpha 1$ - y $\beta 1$ -, mientras que la ACo lo hace sobre los receptores muscarínicos, principalmente en los subtipos M1 y M3 (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

La secreción salival es un proceso activo, que en gran medida depende de energía, la cual posibilita la activación del transporte de fluidos y proteínas desde las células acinares. En el proceso de formación se pueden identificar dos estadios o fases: secreción salival primaria o inicial y secreción salival secundaria o final (Arriaga et al., 2019; Bagán Sebastián et al., 2010).

En cuanto al proceso inicial de secreción de saliva de la primera fase, se requiere de un aumento de concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular, que facilitará la activación de los mecanismos de transporte de iones. Esto se logra en respuesta a la estimulación de los receptores muscarínicos, especialmente M1 y M3, mediada por la ACo y la estimulación del receptor $\alpha 1$ adrenérgico, que evoca un mecanismo similar a la activación de los receptores M1 y M3, generando un aumento de Ca^{2+} intracelular (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Pedersen et al.,

2018; Proctor, 2016). La mayor parte de la producción del fluido salival es intermediada por la acetilcolina, que activa los receptores muscarínicos parasimpáticos (Pedersen et al., 2018).

El aumento de Ca^{2+} tras la estimulación de los receptores abre de forma inmediata los canales de cloruro (Cl^{-}) y de potasio (K^{+}) (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018), ubicados en la región luminal y basolateral de la célula acinar, respectivamente. Lo anterior consigue una salida de potasio, que conlleva a una hiperpolarización, ocasionando una fuerza que permite la salida de Cl^{-} hacia el lumen del acino. Asimismo, el aumento de la concentración de iones de cloruro intraluminal crea una diferencia de potencial negativo transepitelial, que impulsa el sodio (Na^{+}) en dirección al lumen por una vía paracelular (Ekström et al., 2019).

Ahora bien, la alta concentración intraluminal de cloruro de sodio resultante, provoca un movimiento osmótico de agua hacia el lumen por mecanismo transcelular, a través de los canales de agua -esencialmente la acuaporina 5-, como paracelular, por medio de transporte pasivo de ultrafiltración, permitiendo que el agua atravesase por entre las células (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Por el contrario, a nivel de los conductos la movilidad y permeabilidad del agua es muy escasa, producto de uniones estrechas entre las células ductales (Ekström et al., 2019; Proctor, 2016).

Simultáneamente, se produce una acidificación intracelular transitoria, causada por la descarga del ion bicarbonato hacia el lumen, el que contribuye con cierta cantidad a la formación de la saliva de primera fase. Sin embargo, son las células epiteliales de los conductos salivales quienes juegan un rol fundamental en el aporte de bicarbonato a la secreción salival (Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

Por otro lado, el proceso de secreción proteica, la cual es mayoritariamente producida y secretada por las células acinares, se realiza a través de dos formas. La primera y fundamental fuente de proteínas es gracias a un proceso de exocitosis de proteínas almacenadas en gránulos dentro de las células acinares. Este

procedimiento comienza cuando los neurotransmisores, por estimulación primordialmente simpática, actúan sobre los receptores α_1 y β_1 adrenérgicos, posibilitando la fusión de los gránulos con la membrana del lumen acinar, lo que provocará la liberación de las proteínas almacenadas hacia el lumen acinar. Además, se encuentra al receptor del péptido intestinal vasoactivo que a través de la activación parasimpática también puede actuar en el proceso de exocitosis (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

La segunda forma es lo que se llama una secreción constitutiva o vesicular, la que consiste en que, una vez sintetizadas las proteínas por el complejo de Golgi, éstas son liberadas hacia el lumen directamente por medio de una proteína transportadora que moviliza la proteína (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019). Aun cuando, la mayor parte de la secreción de proteínas se produce a nivel de los acinos, las células ductales también liberan diversas proteínas, como factores de crecimiento, inmunoglobulina y calicreína (Pedersen et al., 2018).

Referente a la segunda fase del proceso de formación de saliva, se produce principalmente una modificación en la saliva primaria. Este cambio se debe a que las células epiteliales del conducto expresan vías de transporte que favorecen la absorción de sodio y cloruro. El Na^+ es absorbido por una baja concentración de Na^+ intracelular desde el lumen ductal a través de canales de sodio localizados en la membrana apical. Luego este Na^+ absorbido es retirado de las células ductales hacia el intersticio, gracias a la bomba de sodio (Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). De forma simultánea, las proteínas transportadoras de iones de la membrana de las células ductales también absorben el Cl^- de la saliva inicial. El mecanismo, aún no resuelto completamente, considera la utilización de canales de cloruro que posibilitan la absorción y su salida por vías basolaterales hacia el intersticio (Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

En resumen, una vez estimulados los acinos, quienes son responsables de la producción del fluido y de gran parte de las proteínas, producen una secreción

salival primaria isotónica respecto al plasma, es decir, similar al plasma desde el punto de vista de componentes iónicos, que es acumulada en su lumen. Esta secreción inicial va modificando su composición a medida que avanza a través del sistema de conductos, finalizando a nivel de la cavidad oral con una saliva final que es hipotónica en comparación con el plasma.

Componentes salivales y sus funciones

La combinación de elementos que componen a la saliva total no estimulada es dinámica, dependiente e influenciada por un grupo de estímulos fisiológicos y hábitos o conductas del individuo (Hernández and Taylor, 2020; Tzimas and Pappa, 2023). A su vez, sus compuestos son multifuncionales y trabajan de forma conjunta para cumplir con las principales funciones salivales, que tiene dentro de sus objetivos la mantención de la salud oral y la creación de un equilibrio ecológico apropiado (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001).

La saliva posee una actividad antibacteriana y de inmunidad, al contener agentes inmunológicos como no inmunológicos que protegen a los dientes y las superficies mucosas. Uno de los elementos principales y de mayor concentración que se encuentra en la saliva total, es la inmunoglobulina A (IgA), la cual genera una gran protección y función inmunitaria frente a la entrada de agentes externos provenientes del medio ambiente. Esta actúa neutralizando los virus, así como también, sirve de anticuerpo frente a los antígenos bacterianos e incluso como agregador bacteriano, impidiendo la adhesión bacteriana a los tejidos del hospedero (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pappa et al., 2019). Otras inmunoglobulinas presentes en la saliva son la IgG o IgM, sin embargo, estas están en bajas concentraciones y probablemente provengan del fluido crevicular gingival (Humphrey and Williamson, 2001).

Por otra parte, se localizan componentes salivales antibacterianos no inmunológicos, que conceden una protección a los dientes y las mucosas. Uno de estos es la lactoferrina, que reacciona privando a las bacterias de los nutrientes, por

ejemplo del hierro, generando lo que se llama una inmunidad nutricional (Humphrey and Williamson, 2001). De igual forma, se encuentra la lisozima, estas destruyen e inhiben el crecimiento bacteriano producto de la división de la pared celular que generan; sumado a lo anterior, también promueven la eliminación de las bacterias a través de su función de agregación bacteriana. En esa misma línea, las mucinas presentes también tienen una función de modulación selectiva de microorganismos a la adhesión en los tejidos orales, controlando la colonización de bacterias y hongos (Humphrey and Williamson, 2001). Adicionalmente, las cistatinas expresadas ayudan a inhibir procesos de la patogénesis de la enfermedad periodontal. De manera similar, las peroxidasas, catalizan los subproductos metabólicos bacterianos y protegen a las mucosas de los efectos oxidantes del peróxido de hidrógeno producido por las bacterias (Humphrey and Williamson, 2001). Finalmente, las proteínas que se hallan en la saliva, tales como, las glicoproteínas, las estaterinas, las aglutininas, las proteínas ricas en histidina y las proteínas ricas en prolina, ejercen una función de agregación bacteriana, impidiendo que las bacterias se adhieran a las superficies de los tejidos intraorales duros y blandos (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001).

Otro componente importante dentro de la composición de la saliva es el factor de crecimiento epidérmico, que promueve la proliferación y la migración de células epiteliales favoreciendo a la cicatrización (Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018); de forma similar, se encuentra el factor de crecimiento de los fibroblastos que actúa como representante de la reparación de tejidos (Pedersen et al., 2018).

Desde otro ángulo, una labor distinta de la saliva es la acción amortiguadora. Esta acción *buffer* o tampón, es capaz de colaborar en la mantención de rangos neutros del pH salival, y también de promocionar y mantener una microbiota oral equilibrada. Este trabajo lo realiza por medio del aporte de los bicarbonatos, los fosfatos, la urea, y proteínas y enzimas anfóteras, que se presentan en la saliva (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018). El sistema tampón más importante es el atribuido a los bicarbonatos, que se difunde dentro del *biofilm* actuando como tampón neutralizador de ácidos. Estos

generan amoníaco que forman aminas, que ayudan de amortiguadoras al neutralizar los ácidos. Asimismo, como producto de la metabolización de la urea -por la ureasa proveniente del *biofilm*- se libera amoníaco, colaborando con su acción tampón a nivel de la placa dental (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Humphrey and Williamson, 2001). Si bien, frente a un estado de saliva total no estimulada, los sistemas tampón bicarbonato y fosfato, contribuyen en similares porcentajes, cuando se está presente en un estado de saliva total estimulada (SWS, por sus siglas en inglés), el sistema de bicarbonatos se convierte en el responsable de más del 90% de la capacidad *buffer* total (Pedersen et al., 2018). Por lo tanto, es probable que el fosfato sea importante solo durante un flujo salival no estimulado (Humphrey and Williamson, 2001).

Paralelamente, la saliva contribuye a la lubricación y protección de los tejidos mediante elementos como las mucinas, que proporcionan una gran lubricación, creando una película semejante a una barrera física de protección y lubricación contra el desgaste excesivo o bien frente a ataques ácidos, en particular esta última función se atribuye específicamente a la mucina del subtipo MG1. Al mismo tiempo, facilitan el habla, la masticación y la deglución (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001). De igual manera, la saliva desempeña un limitado e inicial papel en el proceso de la digestión, al comenzar la ruptura del almidón a través de la acción ejercida por la amilasa salival. A su vez, enzimas salivales, como la lipasa lingual, también inciden en el proceso digestivo, pero enfocado en las grasas. Dentro de estas mismas competencias, la saliva ayuda a la formación del bolo alimenticio, gracias a su propiedad humectante y a su capacidad de unión de las partículas de alimentos y, simultáneamente, facilita la deglución de este (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Humphrey and Williamson, 2001).

Por último, una de las facultades de mayor relevancia de la saliva es su participación dentro del proceso de desmineralización-rem mineralización dental. Las altas concentraciones de elementos como calcio y fosfato en la saliva se mantienen estables gracias a la estaterina, reduciendo la desmineralización del esmalte y favoreciendo la remineralización subsuperficial. Además, la estaterina en

colaboración con otras proteínas de la película protectora (histatinas, cistatinas y proteínas ricas en prolina), se unen a la hidroxiapatita ubicada en la superficie del esmalte permitiéndoles modular el crecimiento cristalino del esmalte a través del proceso de remineralización, consintiendo el ingreso y limitando la salida de los minerales, apoyando el equilibrio y mantención de la integridad del diente (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001).

Métodos de recolección de saliva

La obtención de muestras de saliva es razonablemente fácil, consistiendo en un procedimiento no invasivo, sin molestias para el paciente e ideal para pacientes que sufren ansiedad frente a procedimientos clínicos y para niños e individuos con discapacidad (Bellagambi et al., 2020; Duarte et al., 2020; Hyvärinen et al., 2021; Pappa et al., 2019; Priya and Prathibha, 2017). Se pueden obtener diferentes tipos de muestras salivales por medio de diversas técnicas, ya sea a partir de la saliva total o bien de glándulas salivales individuales, así como mediante estimulación o sin estimulación (Bellagambi et al., 2020; Navazesh, 1993; Priya and Prathibha, 2017).

La UWS, es decir, aquella que se encuentra libre de estímulos exógenos, es una mezcla de compuestos, incluyendo la secreción de todas las glándulas salivales, células epiteliales descamadas, microorganismos, fluido gingival crevicular, etcétera (Hernández and Taylor, 2020; López Jornet, 2010; Navazesh, 1993). La obtención de este tipo salival tiene como ventaja, por sobre la SWS, que minimiza la dilución de los niveles de metabolitos (Bellagambi et al., 2020), evita la contaminación por agentes externos capaces de distorsionar los resultados (Grootveld et al., 2022) y se considera que es más representativa del medio oral (Chiappin et al., 2007).

A continuación, se describen los principales métodos de recolección de saliva total:

- A. Método de drenaje: Técnica utilizada desde 1934, y considerada como el *gold standard* para las pruebas de UWS (Bellagambi et al., 2020; Padilla et al.,

2020). En este procedimiento el paciente se sienta tranquilamente en posición de reposo, luego inclina la cabeza levemente hacia adelante y abre los labios ligeramente posibilitando que caiga la saliva de forma pasiva en un tubo graduado estéril (López Jornet, 2010; Priya and Prathibha, 2017).

- B. Método de expectoración: Las instrucciones generales son similares a la técnica anterior, sin embargo, se le solicita al individuo que permanezca con los labios cerrados y acumule saliva en el piso de la boca, posteriormente se pide que escupa la saliva en un recipiente estéril y graduado cada 60 segundos (Bellagambi et al., 2020; López Jornet, 2010; Navazesh, 1993; Priya and Prathibha, 2017).
- C. Método de aspiración: El paciente acumula saliva en el piso de la boca y luego esta es aspirada continuamente por medio de micropipetas, jeringas, eyectores de saliva o un aspirador conectado a una bomba de vacío que lleva las secreciones a un tubo graduado (López Jornet, 2010; Navazesh, 1993; Priya and Prathibha, 2017).
- D. Método del hisopo: Para esta técnica se utiliza una almohadilla o hisopo de algodón o bien un material absorbente previamente pesado y elegido según la tolerancia del paciente. Este es posicionado en la salida de los conductos de las glándulas salivales mayores, para que se vaya empapando de saliva. Posteriormente, se retira la almohadilla y se guarda en un recipiente estéril para luego ser pesado (Bellagambi et al., 2020; López Jornet, 2010; Navazesh, 1993; Priya and Prathibha, 2017).

Generalidades del *biofilm*

La relevancia de la comprensión de los *biofilm* es debido a su gran implicancia en las infecciones bacterianas, la cual abarca aproximadamente un 65 % de estas (Dutta et al., 2021; Jamal et al., 2018). En Estados Unidos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), estima que las biopelículas son el agente etiológico del 60 % de todas las infecciones crónicas.

Se reporta una incidencia anual de las infecciones relacionadas con el *biofilm* de aproximadamente 2 millones de casos, provocando unas 268.000 muertes y generando una carga económica de más de USD 18.000 millones en gastos directos para el tratamiento de estas infecciones (Rumbaugh and Sauer, 2020), incluyendo enfermedades tales como caries dental, enfermedad periodontal, otitis media, prostatitis bacteriana, endocarditis valvular, entre otras.

A nivel de la cavidad oral, la primera descripción de microorganismos adheridos obtenidos de una muestra de placa dental fue en el siglo XVII, cuando Antonie van Leuwenhoek observó por medio de un microscopio básico algo que él retrató como *animalcules* (Costerton, 1999; Donlan and Costerton, 2002; Jamal et al., 2018). A lo largo del siglo XX, el progreso de la microbiología y sus tecnologías han impulsado el desarrollo de la comprensión de la formación y composición de la biopelícula. Por consiguiente, su definición ha evolucionado, considerando no tan solo las características observables microscópicamente, sino también las propiedades fisiológicas de estos microorganismos.

Actualmente, se puede definir a una biopelícula como una comunidad bacteriana de estructura tridimensional adherida de forma irreversible a un sustrato y/o bien entre sí, y que está inmersa en una matriz de exopolisacáridos que ella misma ha producido (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Larsen and Fiehn, 2017; Marsh, 2006; Socransky and Haffajee, 2002; Zijnga et al., 2010).

Etapas de formación del *Biofilm*

La formación de la biopelícula dental es descrita como un proceso cíclico, secuencial, altamente regulado y que considera al menos las siguientes etapas (figura 2).

Adhesión inicial a la superficie

Dentro de la boca encontramos una variedad de superficies, incluidos tejidos blandos, dientes, restauraciones, implantes, etcétera, al cual las bacterias se pueden unir (Kidd and Fejerskov, 2016; Socransky and Haffajee, 2002). Ahora bien, para la formación inicial de la biopelícula dental se debe comenzar necesariamente por la adhesión de un grupo pequeño de bacterias en estado planctónico a la superficie sólida del diente, la cual está precedida por la configuración de la denominada película adquirida, que está compuesta principalmente por elementos del hospedero, incluyendo proteínas salivales, lípidos, glicoproteínas, y otras macromoléculas (Bowen et al., 2018; Chawhuaveang et al., 2021).

La adhesión de los microorganismos -predominantemente bacterias del género *Streptococcus*- ocurre gracias a las estructuras denominadas fimbrias y fibrillas, que fortalecen la interacción entre las células microbianas y la superficie adherida (Dutta et al., 2021; Jamal et al., 2018; Larsen and Fiehn, 2017).

Las fimbrias son filamentos de 2-8 nm de diámetro compuesto por subunidades proteicas llamadas fimbrinillas y se pueden encontrar en bacterias orales, tales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, entre otras (Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002).

Por otro lado, las fibrillas son morfológicamente diferentes y más cortas que las fimbrias y tienen una distribución a nivel de la superficie celular no uniforme; algunas de las bacterias orales que poseen fibrillas son *S. salivarius*, el grupo *S. mitis*,

Prevotella intermedia, *Prevotella nigrescens* y *S. mutans* (Socransky and Haffajee, 2002).

A pesar, de que las fimbrias y fibrillas son importantes para la adhesión de ciertas especies bacterianas, también se encuentran otros factores que colaboran con la adherencia bacteriana. Ejemplos de ellos son las fuerzas físicas tipo van der Waals, la interfaz sólido-líquido, o bien la hidrofobicidad de la superficie, que permite el fortalecimiento de la unión, ya que disminuye la fuerza de repulsión entre las bacterias y la superficie (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018). Además, algunas especies expresan una motilidad activa gracias a la producción de flagelos, aumentando así el número de interacciones iniciales entre las bacterias y las superficies, logrando contrarrestar las fuerzas repulsivas generadas entre ambas. También, se observan ciertas enzimas proteolíticas ubicadas en las superficies celulares que facilitan la adhesión a superficies sólidas (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002). Por último, cabe señalar que existen diversos factores, como por ejemplo el tipo de superficie, la temperatura y la presión, que de igual forma pueden influir en la adhesión bacteriana (Gupta et al., 2016).

Posteriormente, las bacterias que logran asentarse y modificar su estado a un estado sésil, cambian su fenotipo y modifican genes específicos de adhesión, permitiéndoles sintetizar nuevo material para la matriz de exopolisacáridos y para la unión con otras células bacterianas. Asimismo, revelan una pérdida de expresión del gen del flagelo, evolucionando de una adhesión reversible a irreversible (Costerton, 1999; Rumbaugh and Sauer, 2020).

Formación de microcolonias

Una vez adheridos los microorganismos de forma irreversible a la superficie sólida, comienza la acumulación a través de la cohesión celular, otorgando estabilidad para el inicio del proceso de multiplicación y división de las células microbianas. Este procedimiento involucra a los mecanismos de señalización celular y a la matriz extracelular, que favorecerán la creación de microcolonias. Estas

últimas, son consideradas las unidades estructurales fundamentales del *biofilm*, ya que conceden una proximidad celular que otorga un ambiente propicio para la formación de gradientes nutricionales, de intercambio de genes y para la comunicación por *quorum sensing* (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Saini et al., 2011).

Maduración

La biopelícula les concede a las bacterias un ambiente cerrado, posibilitando la comunicación intercelular por medio de la concentración de moléculas de señalización química o auto-inductoras, que actúan regulando la expresión de genes específicos. Este mecanismo de comunicación es el denominado *quorum sensing*, que funciona por medio de la liberación de moléculas de señalización por parte de las bacterias (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Larsen and Fiehn, 2017; Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002). Por consiguiente, el *quorum sensing* les facilita añadir características propias a las biopelículas, tales como la protección frente a agresiones por terapias antibióticas, intervención en la estructura de las microcolonias -fomentando o desalentando el crecimiento de especies bacterianas- o bien modificando las propiedades fisiológicas de las bacterias (Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002). En el último tiempo, la evidencia sugiere que existe otra modalidad de comunicación aparte del *quorum sensing*, postulando a las señales eléctricas como colaboradoras en la comunicación entre las bacterias (Prindle et al., 2015).

Ahora bien, con el pasar de las horas se observa la formación de múltiples capas de microcolonias, que contienen diversas combinaciones bacterianas que estarán distribuidas desde colonizadores iniciales a secundarios. Las microcolonias se coordinarán entre sí beneficiándose de diferentes formas, como, por ejemplo, en el intercambio de sustratos, en la distribución de productos metabólicos y en la eliminación de productos metabólicos finales. Un ejemplo de esto sucede durante la degradación de materia orgánica en el transcurso de la digestión anaeróbica, convirtiéndose en dióxido de carbono y metano. En dicho proceso se contempla un mínimo de tres tipos de bacterias: las bacterias fermentadoras, que inician la

producción de alcoholes y ácidos a partir de los compuestos orgánicos; posteriormente, las bacterias acetogénicas consumen esos sustratos y los metanógenos, obtienen energía convirtiendo el acetato, el dióxido de carbono y el hidrógeno en metano (Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018). En otras palabras, lo anterior convierte al *biofilm* en un entorno que facilita la asociación de bacterias metabólicamente diferentes pero interdependientes nutricionalmente, utilizando sustratos de otros para sus fines energéticos, es decir, favorece la asociación sintrófica (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Saini et al., 2011).

Posterior a la formación de las microcolonias y mediante *quorum sensing*, se expresan ciertos productos genéticos importantes para la configuración y maduración de la estructura tridimensional de la biopelícula -conformada principalmente por la matriz extracelular-. Adicionalmente, a medida que la biopelícula madura, se va observando en su arquitectura canales entre las microcolonias que actúan en la distribución de nutrientes y en la eliminación de desechos de las formadas comunidades bacterianas, operando como un sistema «circulatorio» primitivo (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Jamal et al., 2018; Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002).

Desprendimiento o dispersión de la biopelícula

Finalmente, ocurre una fase de dispersión o desprendimiento del *biofilm*, en el cual las bacterias adheridas se diseminan conduciendo a la translocación y colonización de nuevas superficies. Se reconocen mecanismos físicos y/o químicos implicados en esta etapa (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Rumbaugh and Sauer, 2020).

El desprendimiento consiste en la liberación pasiva de células microbianas producto de fuerzas de cizallamiento (deformación en la estructura de una sustancia producida por la presión) o tensión mecánica. Dentro de este mecanismo encontramos diferentes procesos, incluyendo el *grazing* o «pastoreo», que consiste en un tipo de depredación bacteriana; la abrasión, que es causada por la colisión de células de la biopelícula con partículas del ambiente; la erosión y la «descamación»,

que se deben a la pérdida de estructura del *biofilm*, ya sea de forma parcial o completa, producto de la fricción generada por los fluidos (Flemming et al., 2016; Jamal et al., 2018; Rumbaugh and Sauer, 2020).

Por otra parte, la dispersión consiste en la liberación activa de las células sésiles pertenecientes a la biopelícula. Se observan dos formas de desencadenamiento de este proceso: por inductores de dispersión nativos y por inductores de dispersión del medio ambiente. El primero se produce en respuesta a moléculas de señalización auto-sintetizadas por las comunidades bacterianas; mientras que el segundo, es desencadenado por la exposición a factores que están presentes en el entorno o por las condiciones cambiantes del ambiente. Ahora bien, ambos mecanismos rara vez implican más del 80% de la remoción total de la biomasa del *biofilm* (Flemming et al., 2016; Jamal et al., 2018; Rumbaugh and Sauer, 2020).

Por último, cabe señalar que en esta etapa de desprendimiento y/o dispersión, las bacterias se ayudan aumentando la expresión de proteínas relacionadas con la formación de flagelos, concediéndoles la oportunidad de dirigirse a un nuevo sitio de colonización, facilitando la expansión y el inicio de un nuevo ciclo de formación de la biopelícula (Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018).

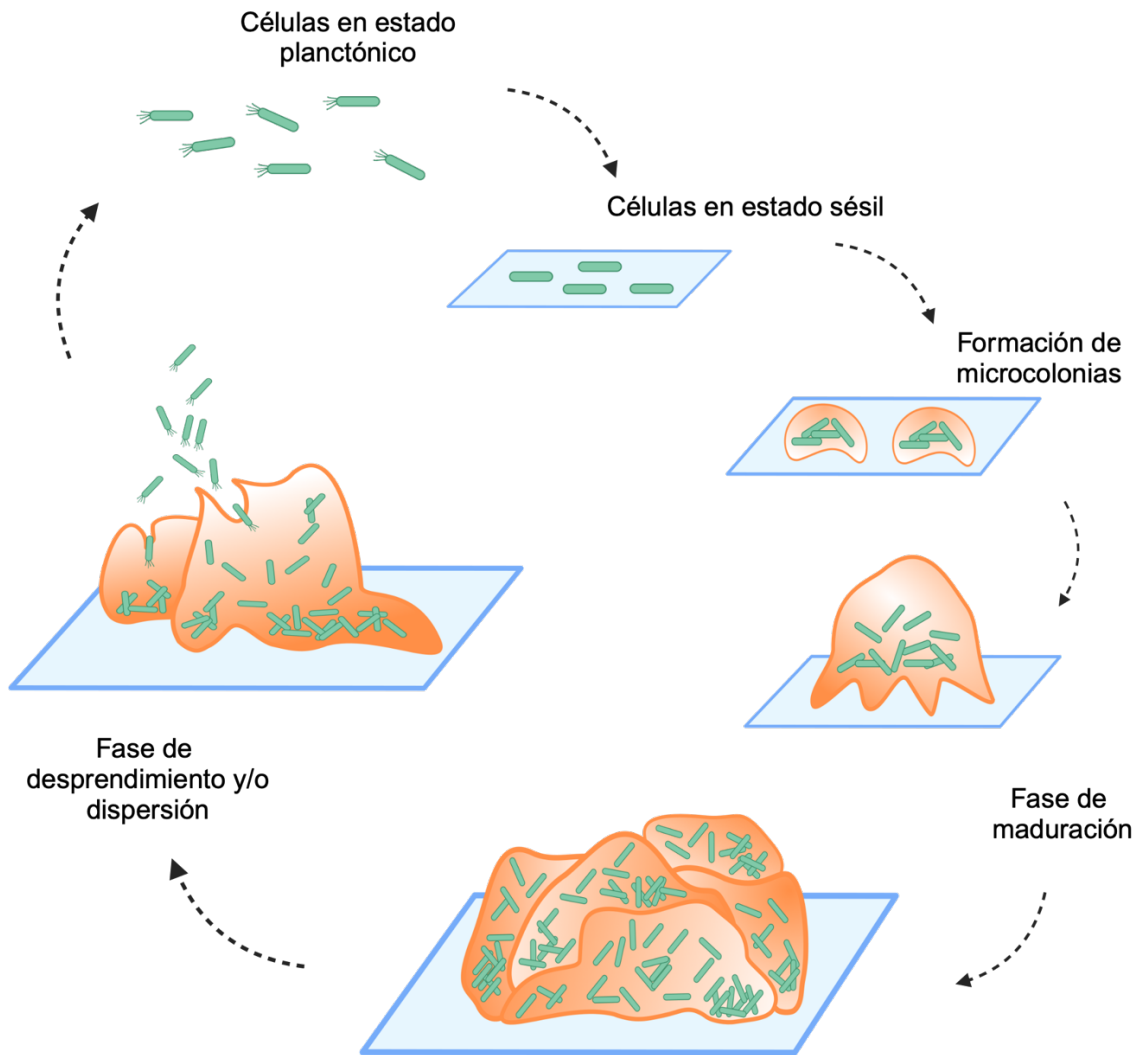


Figura 2. Visión esquemática de la formación del *biofilm*.
Fuente: Elaboración propia.

Ahora bien, recientemente un estudio multicéntrico propone un cambio de paradigma sobre la formación inicial de la biopelícula, a partir del análisis de la estructura y composición de la comunidad microbiana salival. Se postula que las bacterias que comienzan el ciclo de formación del *biofilm* están presentes principalmente en forma de agregados y no libres, como se ha considerado hasta la fecha, y que luego estos agregados actúan como núcleos de crecimiento que se expanden por la superficie, construyendo la biopelícula. Lo anterior, no considera la existencia de una sucesión bacteriana secuencial y ordenada, dado que el análisis filogenético realizado en la investigación, reveló que estos complejos estaban compuestos de una combinación de consorcios aerobios y anaerobios en los que se

encuentran mezcladas bacterias tradicionalmente consideradas como colonizadoras tempranas y tardías (Simon-Soro et al., 2022).

Estructura y composición

La biomasa del *biofilm* está compuesta principalmente por una matriz extracelular, correspondiente entre el 65 al 95% del volumen total de la biopelícula, mientras que el porcentaje restante lo componen los microorganismos (Dutta et al., 2021; Jamal et al., 2018; Saini et al., 2011).

La investigación pionera sobre la formación de glicocáliz o matriz en las bacterias fue realizada en el *Forsyth Dental Center*, por Ronald J. Gibbons, en un estudio sobre las *S. mutans* a mediados del siglo xx (Costerton et al., 1978). La formación de la matriz, comprendida por las bacterias de la biopelícula, es dinámica y dependiente de la disponibilidad de nutrientes, de la síntesis y secreción de material extracelular, del estrés de cizallamiento, y de la competencia social y nutricional (Bowen et al., 2018; Flemming et al., 2016). Asimismo, la producción de la matriz implica un coste energético considerable, sin embargo, se justifica debido a la importancia estructural y fisicoquímica en la formación y función de la biopelícula, otorgándole finalmente propiedades beneficiosas propias al *biofilm* (Bowen et al., 2018; Flemming et al., 2016).

La matriz posibilita que se generen diferentes gradientes químicos y de nutrientes, favoreciendo la creación de microambientes dentro de la biopelícula. En los microambientes se producirán interacciones cooperativas y antagónicas en un entorno heterogéneo, que ayudará a la formación de nichos con diferentes potenciales patógenos (Bowen et al., 2018).

Al analizar la composición de la matriz encontramos diversos componentes. Se incluyen el agua (97%), las proteínas (>2%), los polisacáridos (1-2%), y otros elementos en porcentajes menores al 1%, tales como ADN extracelular, ARN, entre otros (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Jamal et al., 2018).

Las sustancias poliméricas extracelulares o exopolisacáridos, sintetizadas por los microorganismos del *biofilm*, determinan y condicionan directamente las propiedades mecánicas de la matriz y la actividad fisiológica de los organismos dentro de la biopelícula (Flemming et al., 2016). Además, contribuyen en el mantenimiento de la integridad de la biopelícula. Particularmente, el ADN extracelular es considerado de gran importancia, ya que provee de integridad estructural a la matriz y por consiguiente al *biofilm* (Bowen et al., 2018; Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016; Saini et al., 2011). De igual modo, los polímeros forman un andamiaje que también le conceden estabilidad a la biopelícula (Bowen et al., 2018; Gupta et al., 2016). Adicionalmente, el desarrollo de la matriz polimérica aumenta la fuerza de adhesión a la superficie, la cohesión y la formación de microcolonias (Bowen et al., 2018).

Por otra parte, en algunos casos, la matriz, actúa como hidrogel reteniendo agua, confiriéndole a la biopelícula tolerancia a la desecación. Conjuntamente, las capas superiores de las sustancias poliméricas extracelulares forman una barrera que responde de manera eficaz a la evaporación. También, suministra nutrientes esenciales, que crean un entorno local que favorece a determinados microorganismos (Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002).

Por último, cabe destacar que todos los *biofilms* contienen exopolisacáridos, sin embargo, su composición bacteriana y matriz extracelular puede ser diversa. Ahora bien, una singularidad de la biopelícula oral es que gran parte de los microorganismos que la componen pueden tanto sintetizar como degradar exopolisacáridos (Socransky and Haffajee, 2002).

En resumen, la biopelícula es una manera primitiva de supervivencia para las bacterias que están inmersa en ella en comparación con sus homólogas planctónicas, expresando propiedades sobresalientes, como la resistencia innata a las defensas inmunitarias del hospedero, una mayor tolerancia a situaciones de estrés, captura de recursos por sorción, retención de enzimas que otorgan capacidades digestivas, formación de interacciones sociales, una mayor tasa de intercambio de genes y una habilidad a la tolerancia y/o resistencia a los antibióticos

(Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016). Además, la estructura viscoelástica de la biopelícula s permite el movimiento de las células dentro de la matriz y también le confiere resistencia a la tensión mecánica (Bowen et al., 2018; Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016).

La era de las ciencias ómicas

El término *gen* fue utilizado por primera vez a principio del siglo pasado por W. Ludvig Johannsen, quien lo definió como una unidad física y funcional de la herencia biológica. Sin embargo, no fue sino hasta la descripción de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) por Watson y Crick (1953), lo que marcó el inicio de una nueva área en la biología: la disciplina de la biología molecular. Esta rama tiene como principal objetivo de estudio las moléculas biológicamente significativas, como es el ADN, explorando en profundidad tanto sus estructuras como sus funciones.

Este hito indicó el comienzo de una vertiginosa carrera en el ámbito de la biología molecular. Después de cinco décadas y numerosos avances tecnológicos, en 2001 (Kandpal et al., 2009), se desencadenó un conflicto entre dos influyentes agrupaciones científicas que lideraban el desarrollo de tecnologías relacionadas con el genoma humano. Por un lado, el Proyecto del Genoma Humano (HGP, por sus siglas en inglés), desarrollado por un consorcio internacional, y por el otro lado, la iniciativa dirigida por Craig Venter y la empresa Celera, de carácter privado. En virtud de un acuerdo entre las partes, ambas entidades publicaron simultáneamente los primeros borradores de la secuenciación del ADN humano (Craig Venter et al., 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), dando inicio a lo que posteriormente se denominaría la «era postgenómica». En el 2004, el trabajo del HGP culminó con la publicación de una secuencia del genoma humano de gran precisión que incluía el ~99% del genoma eucromático, en otras palabras, una secuenciación casi completa (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

A partir de aquí, la información que se ha podido obtener es de gran magnitud, sobrepasando las capacidades humanas para su análisis. Por consiguiente, fue necesario la creación de técnicas estadísticas e informáticas que ayuden a la interpretación de los resultados obtenidos, convirtiendo a la

bioinformática en una herramienta imprescindible para integración de datos en el ámbito de las ciencias biológicas.

En cuanto a la era de las ciencias ómicas, esta inicia a final del siglo xx, con la aparición de nuevas tecnologías y avances relacionadas con diversas áreas de las ciencias básicas y aplicadas, como es la bioquímica, la genética, la biología molecular y la biotecnología (Vailati-Riboni et al., 2017). No obstante, la determinación de la secuencia completa del genoma humano fue un paso trascendental en el inicio del campo de las ciencias ómicas, introduciendo a la genómica como una sus primeras áreas de desarrollo (figura 3) (Cheng and Pohl, 2007; Narad and Kirthanashri, 2018).

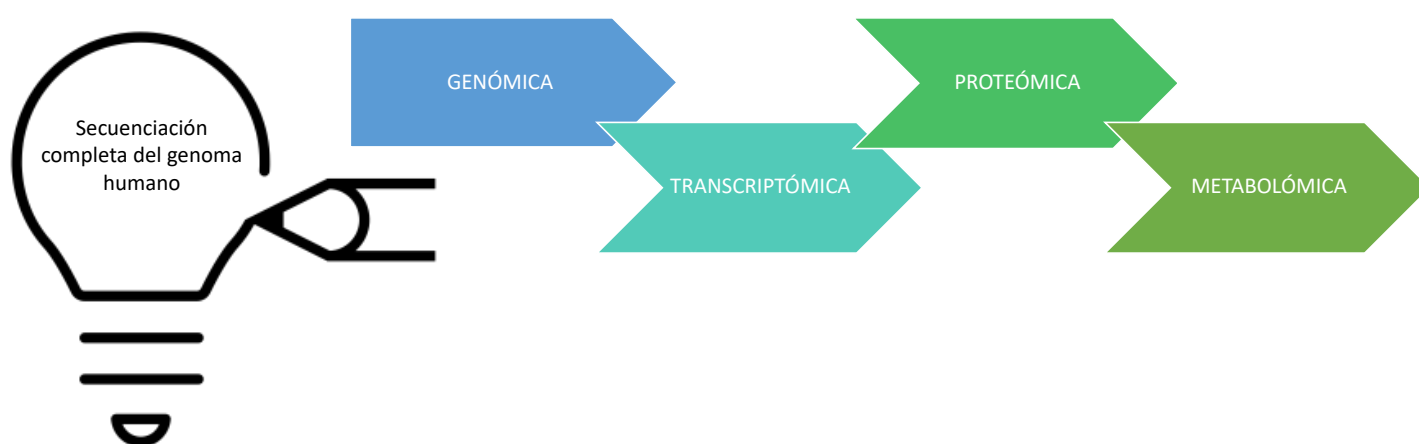


Figura 3. Diagrama de flujo de las ciencias ómicas.
Fuente: Elaboración propia.

El término *ómica* es un neologismo proveniente del inglés (*omics*), que en biología molecular se utiliza como sufijo para hacer referencia a un campo de estudio que, de acuerdo a lo señalado por Orfao *et al.* (2019), comprende a «*un conjunto de tecnologías que posibilitan el estudio a nivel molecular de los distintos elementos que integran a los sistemas biológicos (células, tejidos, individuos) en toda su complejidad, incluyendo el resultado de las interacciones y relaciones que se producen entre los componentes internos del individuo y los elementos externos al mismo con los que interactúa*». Este término engloba diferentes áreas del

conocimiento, incluyendo fundamentalmente a la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica (Franco-Martínez et al., 2020; Uwiera et al., 2017).

Por lo tanto, las ciencias ómicas en su conjunto permiten obtener una caracterización de forma completa e integrada de los procesos biológicos normales y patológicos, como también facilitan el descubrimiento de biomarcadores que ayudan a la detección, diagnóstico, pronóstico y monitoreo de enfermedades, aportando al desarrollo de la medicina personalizada de precisión (Narad and Kirthanashri, 2018; Orfao et al., 2019; Plaza et al., 2017). Asimismo, el avance y las características intrínsecas de las ciencias ómicas han impulsado a un cambio de paradigma en la forma de abordar y resolver problemas biomédicos. De tal forma que colaboran con el traspaso de un enfoque clásico reduccionista, es decir, de analizar a las partes de un sistema biológico por separado, a un enfoque basado en la biología de sistemas, el cual entrega una visión y comprensión holística de los sistemas biológicos (Antonio et al., 2019; Dunn et al., 2011; Orfao et al., 2019).

En cuanto a los biomarcadores, cabe indicar que el marco del Programa Interinstitucional para la Gestión Racional de los Productos Químicos, patrocinado por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, la Organización Internacional del Trabajo y la Organización Mundial de la Salud (OMS), los define como *«cualquier sustancia, estructura o proceso que puede medirse en el organismo o en sus productos y que influye o predice la incidencia de un resultado o enfermedad»* (WHO International Programme on Chemical Safety, 2001). De igual forma, un grupo de trabajo del *National Institutes of Health* en el 2001 establece que los biomarcadores son una *«característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica»* (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

Por lo tanto, los biomarcadores son signos médicos objetivos, cuantificables y reproducibles, detectables en tejidos, en la sangre, en la linfa, en la saliva, en la orina, etcétera, que permiten demostrar una interacción entre un sistema biológico y enfermedad, factor de riesgo o a un tratamiento farmacológico, y su evaluación

describe una respuesta de un estado biológico normal o anormal de un organismo (IOM (Institute of Medicine), 2012; Strimbu and Tavel, 2010; WHO International Programme on Chemical Safety, 1993).

Genómica

La genómica, término acuñado por Tom Roderick en 1986 (Narad and Kirthanashri, 2018), se refiere al estudio completo de la estructura, la organización, las funciones y evolución del genoma -palabra derivada de la conjunción «gen» y «cromosoma»- y en cómo estas características determinan los rasgos y la expresión del fenotipo (Franco-Martínez et al., 2020; Orfao et al., 2019; Vailati-Riboni et al., 2017).

Las ramas investigadas bajo la genómica incluyen la genómica estructural, orientada a la caracterización y localización de las secuencias que conforman el ADN, y la genómica funcional, conducente a asignar las funciones correspondientes a los genes identificados. Por consiguiente, estas conceden la oportunidad de conocer la heterogeneidad del genoma en sus diferentes niveles (Bernal Ruiz, 2015; Orfao et al., 2019; Singh and Datta, 2018).

Su objetivo principal es identificar la asociación entre un determinado rasgo o fenotipo y un marcador genético específico. Un ejemplo de esto es en los pacientes con cáncer, en los cuales se estudia el ADN tumoral circulante en los fluidos corporales, permitiendo controlar la carga tumoral a lo largo del proceso (Franco-Martínez et al., 2020).

Transcriptómica

La transcriptómica es la ciencia que estudia cuantitativa y cualitativamente los marcadores de ARN (Ácido ribonucleico) total existente en una célula, tejido u órgano, ofreciendo principalmente información de un momento y ambiente determinado sobre la actividad de los genes (Franco-Martínez et al., 2020; Orfao et al., 2019; Vailati-Riboni et al., 2017). En otros términos, esta disciplina facilita la

compresión y análisis de los cambios de la expresión genética por medio del estudio del ARN, especialmente en respuesta a diferentes condiciones.

En la actualidad, la saliva es ampliamente utilizada para realizar análisis transcriptómicos, dado que a través de diferentes fuentes, como las glándulas salivales, el fluido crevicular gingival, la descamación de células epiteliales, etc., hace ingreso a la cavidad oral el ARN mensajero y el microARN (Franco-Martínez et al., 2020), permitiendo así que se efectúen por medio de diferentes técnicas, tales como Northern-Blot, *Retro Transcriptase-Polimerase Chain Reaction* y Microarrays de ADN, la transcriptómica salival (Mata et al., 2010). Respecto a su uso, hoy en día se describen un buen número de biomarcadores para la detección de enfermedades, tales como el cáncer de ovario (Lee et al., 2012), el virus Zika (Hu et al., 2010), Síndrome de Sjögren (Hu et al., 2010), entre otras.

Proteómica

Las proteínas desempeñan un rol fundamental para la estructura, función y regulación de los organismos vivos, constituyéndose como uno de los elementos trascendentales de las rutas metabólicas de las células (Bernal Ruiz, 2015).

El término proteoma, acuñado por Marc Wilkins en 1994, se define como la caracterización del conjunto de proteínas expresada por una célula, tejido u organismo, incluidas sus modificaciones postraduccionales (Bernal Ruiz, 2015; IOM (Institute of Medicine), 2012; Vailati-Riboni et al., 2017). Por otra parte, la proteómica hace referencia al estudio que permite conocer las funciones, la expresión y la interacción de las proteínas en los sistemas biológicos (Barallobre-barreiro et al., 2013; Bernal Ruiz, 2015; Franco-Martínez et al., 2020; Narad and Kirthanashri, 2018; Orfao et al., 2019).

Hoy en día, una de las técnicas más utilizada para el desarrollo y consolidación de la proteómica es la espectrometría de masas (EM), que consiste en que todos los compuestos químicos de una muestra se ionizan y las moléculas cargadas resultantes -iones- se analizan según su relación masa-carga (m/z),

permitiendo una evaluación cualitativa y cuantitativa de las proteínas de una muestra (Franco-Martínez et al., 2020; Vailati-Riboni et al., 2017).

En la proteómica podemos diferenciar tres ramas, la proteómica de expresión, encargada de estudiar de forma cualitativa y cuantitativamente la expresión de proteínas; la proteómica estructural, que tiene como objetivo la caracterización de la estructura tridimensional de las proteínas; y por último, la proteómica funcional, que es la que desempeña el papel de la localización y distribución subcelular de proteínas y de las interacciones que se producen entre las proteínas y otras moléculas con el fin de determinar su función (Bernal Ruiz, 2015; Orfao et al., 2019).

Ahora bien, la aplicación y análisis de la proteómica en términos generales es la identificación de proteínas, que dependiendo de su presencia, ausencia, o bien alteración, permitirá diagnosticar y/o pronosticar la evolución de una enfermedad. Su actual empleabilidad clínica está enfocada en diferentes tipos de cáncer (Bernal Ruiz, 2015) y en investigaciones relacionadas con enfermedades metabólicas (Cabras et al., 2010; Pappa et al., 2018).

Metabolómica

El metabolismo humano es controlado por reguladores bioquímicos derivados de los procesos metabólicos, denominados metabolitos. Los metabolitos son elementos de bajo peso molecular -del rango de masa de 50 a 1500 daltons- tales como lípidos, azúcares, aminoácidos, entre otros, que actúan como elemento reactivo, intermediario o bien como producto de las reacciones bioquímicas mediadas por enzimas (Dunn et al., 2011; Tzimas and Pappa, 2023). Estos están presentes en diferentes tipos de muestras biológicas, por ejemplo orina, saliva y plasma (Bernal Ruiz, 2015; Orfao et al., 2019; Sengupta and Narad, 2018; Vailati-Riboni et al., 2017).

Ahora bien, el sufijo -oma deriva del latín y significa «conjunto o masa», y se utiliza para referirse a los campos de estudio de las distintas ciencias ómicas. En

particular, el metaboloma representa al conjunto de metabolitos en determinadas condiciones genéticas y ambientales de un sistema biológico en un tiempo específico. Su tamaño y composición depende del organismo y del tipo de muestra seleccionada (Dunn et al., 2011; EMBL-EBI, 2020c; Haug et al., 2013; Sengupta and Narad, 2018).

De acuerdo con los principios de la biología molecular clásica y sus niveles de organización, se ha considerado tradicionalmente al metaboloma que constituye el último nivel de la llamada «cascada ómica» (figura 4). Lo anterior, en vista de que la información fluye desde el genoma al transcriptoma, pasando luego al proteoma y terminando «aguas abajo» con el metaboloma, el cual termina reflejando el efecto combinado de los demás niveles moleculares que lo anteceden, entregando un retrato más directo del fenotipo biológico expresado por un organismo (Dunn et al., 2011; Lay et al., 2006; Teng, 2013; Vailati-Riboni et al., 2017).

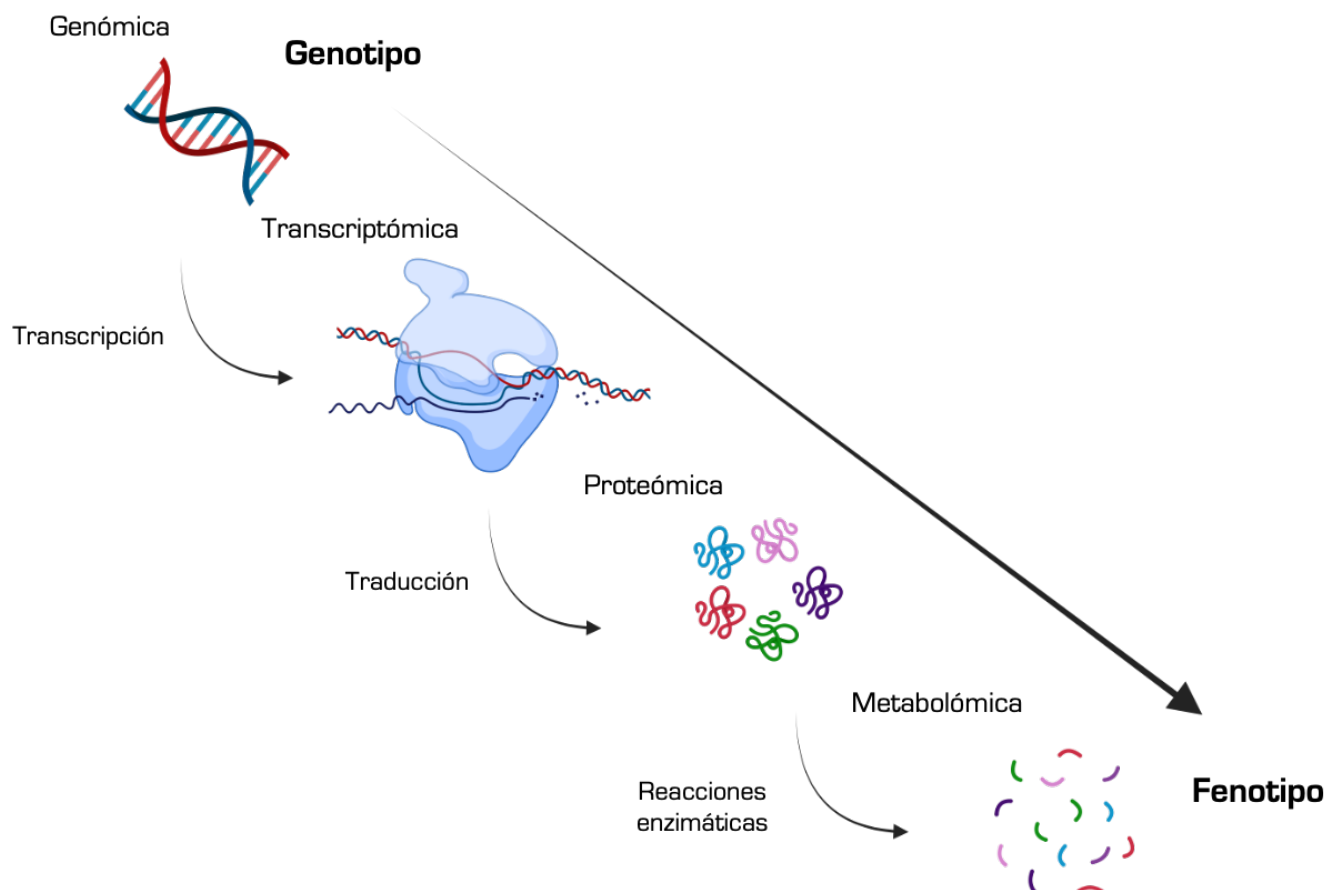


Figura 4. Esquema de la «cascada ómica».
Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a la metabolómica propiamente tal, esta es una rama reciente de la bioquímica analítica, que desde la «era postgenómica» cumple un rol fundamental, convirtiéndose en la ciencia complementaria del estudio de los otros niveles funcionales -genoma, transcriptoma y proteoma- (Dunn et al., 2011). Esta ciencia ómica permite a través de sofisticadas técnicas analíticas, como es la resonancia magnética nuclear (RMN) o la espectrometría de masas, obtener una imagen instantánea de los metabolitos presentes en un sistema biológico (Dunn et al., 2011; Franco-Martínez et al., 2020; Haug et al., 2013; Markley et al., 2017; Wishart, 2016).

Hoy en día, como Sengupta y Narad (2018) exponen «*la metabolómica ha convertido a los metabolitos obtenidos de muestras biológicas en biomarcadores ideales al hacerlos visibles en la mayoría de las bases de datos biológicas y médicas*», permitiéndoles ser aplicables en diversas áreas de la biomedicina. En efecto, su

empleabilidad la hallamos en la prevención (Takis et al., 2019; Wang et al., 2011), en el diagnóstico de enfermedades (Long et al., 2018), en el estudio de los efectos de un fármaco (Kaddurah-Daouk and Weinshilboum, 2015), como también, controlando los tratamientos de salud y seguimiento de una condición específica (Putri et al., 2013; Wishart, 2016).

Ahora bien, los estudios metabolómicos ofrecen dos enfoques alternativos, los cuales dependerán principalmente de los objetivos de la investigación que se pretende realizar. Por tal razón, si se busca determinar un perfil metabolómico global, se escogerá una estrategia denominada no dirigida o *untargeted*. Esta tiene una orientación destinada hacia la formulación de nuevas hipótesis o ideas, tales como el descubrimiento de nuevos biomarcadores que distingan entre casos y controles. Lo anterior, se logra por medio de la detección y cuantificación de una amplia cantidad de metabolitos presentes en una muestra, ya sean previamente identificados o aún desconocidos (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018; Vinayavekhin and Saghatelian, 2010; Zhang et al., 2016). Dentro de sus principales ventajas se encuentra que no es necesario estar en conocimiento previo de la composición del metaboloma de la muestra, así como también, la preparación de la muestra para ser analizada suele ser sencilla, garantizando una menor pérdida de metabolitos que podrían ser identificados. Además, sus resultados otorgan información que sirve de sustento para posteriores estudios que precisen de datos previamente validados, tal como en investigaciones de gran escala en que se requiera una mayor financiación (Dunn et al., 2011). Sin embargo, presenta algunas limitaciones, por ejemplo con la intención de asegurar la detección de un mayor número de metabolitos, la precisión y exactitud se ve comprometida, así como también la cuantificación absoluta de los metabolitos (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018). Asimismo, debido a su naturaleza intrínseca de abordar un gran conjunto de datos, se requiere de mayor tiempo para procesar y analizar la información, demandando el uso de técnicas quimiométricas que faciliten su ejecución y, del mismo modo, ofrece un mayor desafío para identificar y caracterizar las moléculas desconocidas (Roberts et al., 2012).

En contraposición, si se desea medir un conjunto predefinido de metabolitos específicos conocidos que respondan a una hipótesis específica, se optará por un enfoque designado como dirigido o *targeted*. Esta aproximación tiene como ventaja la entrega de conocimiento absoluto de los metabolitos seleccionados, proporcionando sus concentraciones cuantitativas con gran especificidad, precisión y exactitud, lo que facilita la posterior comparación interlaboratorio y/o interdía. Así como también, posibilita el descubrimiento de nuevas asociaciones entre metabolitos en un determinado contexto fisiológico (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018; Roberts et al., 2012; Vinayavekhin and Saghatelian, 2010). Ahora bien, dentro de sus desventajas se observa que demanda el conocimiento previo de los metabolitos a examinar, reduciendo la cobertura del análisis de metabolitos, lo que aumenta el riesgo de ignorar una respuesta metabolómica de interés y, adicionalmente, limita el número de moléculas que puedan ser posteriormente comparadas. Además, la preparación de la muestra es más compleja, debido a que se deben separar los metabolitos seleccionados del resto que se encuentran en la muestra (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018; Roberts et al., 2012; Vinayavekhin and Saghatelian, 2010; Zhang et al., 2016). Por consiguiente, el enfoque del análisis al cual serán sometidas las muestras deberá ser seleccionado durante el diseño y planificación de la investigación.

Por otra parte, en los últimos años con el crecimiento y desarrollo de la metabolómica, se ha impulsado la creación de bases de datos y librerías de referencia de metabolómica, potenciando y favoreciendo las investigaciones en esta área. Estas brindan a los investigadores contenido variado, permitiendo comparar, contrastar y hacer inferencias a partir de los resultados obtenidos de sus investigaciones.

Una de las bases de datos de metabolitos más grandes, exhaustivas, y ampliamente utilizada, gracias a su acceso abierto y gratuito, es *The Human Metabolome Database* (HMDB) (Alonso et al., 2015; Sengupta and Narad, 2018). Desde su creación en 2007, identificando tan solo 2180 metabolitos (Wishart et al., 2007) se ha ido mejorando e incorporando información en los últimos 15 años, convirtiéndola no tan solo en una base de datos con más de 217.920 metabolitos,

sino que también en una enciclopedia *online*, conteniendo información sobre las estructuras químicas, nombres e identificadores, taxonomía química, funciones biológicas, asociaciones con enfermedades, asociaciones genéticas, rutas metabólicas, entre otros, de los metabolitos y metabolismo humano (Wishart et al., 2022).

Entre otras opciones adicionales, se hallan entre las más consultadas Chenomx NMR Suite, *Birmingham Metabolite Library*, COLMAR, BMRB (Alonso et al., 2015; Heude et al., 2017; Klassen et al., 2017). De manera complementaria a las bases de datos en línea, se dispone también de publicaciones científicas como fuentes de referencias que facilitan el acceso a datos de excelente calidad.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Una de las diferencias significativas que se encuentra entre el genoma, proteoma y metaboloma, recae en la disparidad química, en particular, en la cantidad de elementos a analizar mediante técnicas automatizadas de alto rendimiento. En concreto, localizamos que hay solo cuatro diferentes bases en el genoma, veinte aminoácidos en el caso del proteoma, y cientos de miles de compuestos en la metaboloma (Wishart, 2011). Producto de lo anterior, es que la metabolómica requiere de tecnologías de alta gama para lograr abarcar al conjunto de metabolitos presentes en las muestras.

Actualmente existen dos principales herramientas que permiten identificar y cuantificar perfiles metabolómicos, la EM y la RMN (Bernal Ruiz, 2015; Clish, 2015; Sengupta and Narad, 2018; Vailati-Riboni et al., 2017). Estas proporcionan una medida ampliada y dinámica de los cambios resultantes de los procesos en los que intervienen el genoma, el transcriptoma, el proteoma y el medio ambiente, reflejando directamente la actividad bioquímica subyacente y el estado de las células y tejidos, entregando una representación del fenotipo a nivel molecular (Haug et al., 2020; Sengupta and Narad, 2018).

Referente a la espectroscopía de RMN, esta juega un rol fundamental en la comprensión del metabolismo y de los procesos metabólicos desde 1974, convirtiéndose hoy en día en una de las técnicas que ofrece una visión única y simultánea del conjunto de moléculas de una muestra biológica (EMBL-EBI, 2020b; Wishart, 2019). Esta técnica busca medir señales de resonancia específica resultantes de los protones emitidos de moléculas excitadas dentro de un campo magnético, logrando determinar un amplio espectro de moléculas, incluyendo péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos orgánicos, etcétera (Barallobre-barreiro et al., 2013; EMBL-EBI, 2020b; Putri et al., 2013). Del mismo modo, la intensidad de la señal expresada por dicha molécula estará relacionada con su concentración relativa en la muestra biológica y con la cantidad de protones presentes en la molécula (Takis et al., 2019).

Dentro de las ventajas del uso de la espectroscopia de RMN se incluye ser una técnica no invasiva ni destructiva, permitiendo que una misma muestra pueda ser analizada en más de una oportunidad. Igualmente, posee entre sus propiedades fundamentales una alta reproducibilidad y automaticidad, así como también un tiempo de análisis rápido, lo que hace que los estudios a gran escala sean más factibles que con EM. Por lo demás, es intrínsecamente cuantitativa, la preparación de la muestra es simple, permite la identificación de nuevos compuestos y es adecuada para la caracterización de compuestos menos susceptibles de análisis por espectrometría de masas, como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, entre otros. Por último, cabe destacar que es la herramienta más indicada para análisis metabolómicos de enfoque no dirigido (Dunn et al., 2011; EMBL-EBI, 2020b; Emwas et al., 2019; Markley et al., 2017; Putri et al., 2013; Wishart, 2011, 2019).

Ahora bien, varios autores exponen que una de sus principales y mayores desventajas es su baja sensibilidad, pudiendo identificar y cuantificar de forma confiable solo metabolitos en concentraciones relativamente altas, resultando en un menor número de metabolitos detectados por muestra, incluso puede llegar a ser entre 10 y 100 veces menos sensible que la EM (Dunn et al., 2011; Emwas et al., 2019; Markley et al., 2017; Putri et al., 2013; Wishart, 2011). De igual forma, David Wishart (2011, 2019) agrega que se requieren de tamaños muestrales

relativamente grandes (~500 µl) y un instrumental y mantención de mayor coste. Además, añade que demanda de un gran espacio para su instalación, y las bases de datos existentes son más pequeñas en relación con las encontradas para la espectrometría de masas (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las ventajas y desventajas de la RMN en comparación con la EM en aplicaciones metabolómicas.

	RMN	EM
Sensibilidad	Baja	Alta
Preparación de la muestra	Simple	Compleja
Reproducibilidad	Muy alta	Media
Análisis con enfoque dirigido	No óptimo	Óptimo
Tiempo de análisis	Menor	Mayor
Recuperación de la muestra	Técnica no destructiva	Técnica destructiva
Coste de los instrumentos	Alto coste	Menor coste
Coste por muestra	Bajo	Alto
Cantidad de metabolitos detectables	< 200	300 – 1000+

La enfermedad de la caries dental

La Organización Mundial de la Salud define a la salud oral como «*el estado de la boca, los dientes y las estructuras orofaciales que permite a las personas realizar funciones esenciales, como comer, respirar y hablar, y abarca dimensiones psicosociales, como la autoestima, el bienestar y la capacidad de socializar y trabajar sin dolor, molestias ni vergüenza*» (WHO, 2022). Por consiguiente, la salud oral ejerce un rol importante en la calidad de vida de las personas, comprendiendo su integración social y laboral o educativa del individuo.

Reportes actuales informan que la salud oral es un problema significativo de salud de la población a nivel mundial que requiere de acciones inmediatas. Se han registrado alrededor de 3.500 millones de casos con afecciones bucodentales, convirtiéndola en una de las condiciones que más afecta a la población, superando incluso en unos mil millones a la suma total de casos de pacientes con enfermedades mentales, cardiovasculares, diabetes mellitus, enfermedades crónicas respiratorias y cánceres (Bernabe et al., 2020; WHO, 2022). Del total de estos casos de patologías orales se estima a nivel global que aproximadamente 2.000 millones de casos presentan lesiones de caries en dientes permanentes, calculándose una prevalencia media del 29%, mientras que cerca de 500 millones de casos entre 1-9 años de edad expresan lesiones de caries en dientes primarios, en correspondencia a una prevalencia media del 43% (WHO, 2022).

A nivel Nacional, los indicadores de la última Encuesta de Salud Oral en España 2020 reporta que la prevalencia de caries en dentición temporal en niños de 5-6 años es del 35,5% (figura 5) con un índice cod de 1,28 y a los 12 años una prevalencia de caries del 28,6% (figura 6) con un índice CAOD de 0,58 (Bravo Pérez et al., 2020). De igual forma, en la Comunidad Valenciana en 2018 las cifras de prevalencia de caries presentan valores similares a la edad de 5-6 años con un 37,4% y un índice cod de 1,23, y a los 12 años una prevalencia de caries del 30,1% y un índice CAOD de 0,66 (Almerich-Torres et al., 2020).

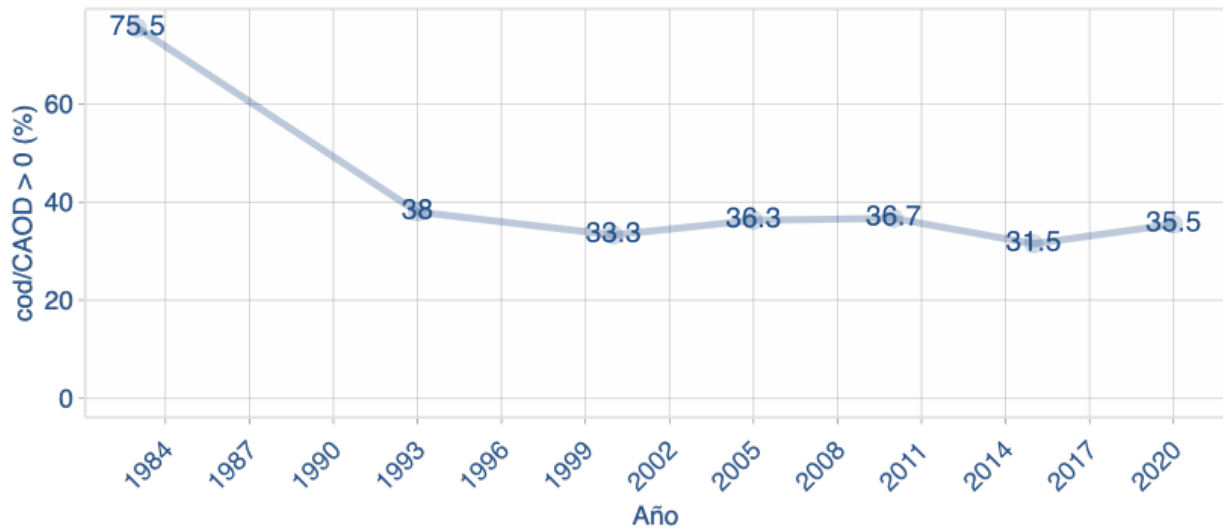


Figura 5. Gráfica de la tendencia de la variable $\text{cod/CAOD} > 0(\%)$ en individuos de 5-6 años (temporal).
Fuente: Extraído de Montiel-Company et al., 2023.

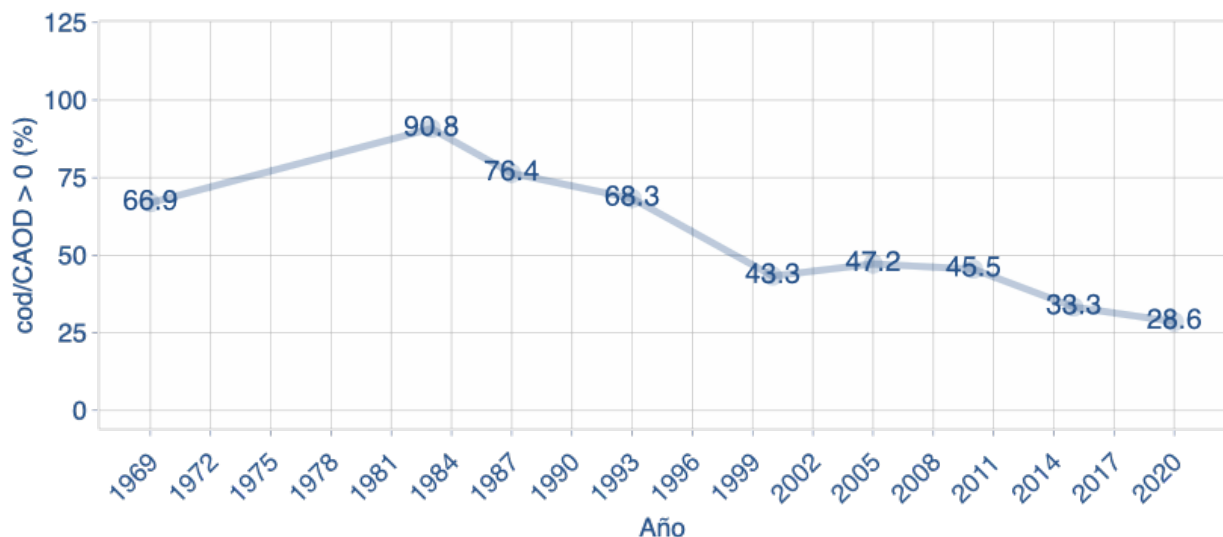


Figura 6. Gráfica de la tendencia de la variable $\text{cod/CAOD} > 0(\%)$ en individuos de 12 años.
Fuente: Extraído de Montiel-Company et al., 2023.

Actualmente, el concepto de caries más aceptado es la acordado por un grupo de expertos que la definieron de la siguiente manera: «es una enfermedad dinámica, no transmisible, multifactorial, mediada por biopelícula y modulada por la dieta, que provoca una pérdida neta de minerales en los tejidos dentales duros. Está determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. Como consecuencia de este proceso, se desarrolla una lesión de caries» (Machiulskiene et al., 2020). Adicionalmente, hoy en día se concibe dentro del grupo de enfermedades no

transmisibles (ENT), debido a la multidimensionalidad que envuelve a su concepto actual, por las características generales que comparte con las otras ENT, así como también, por los factores de riesgo comunes que existen entre estas, por ejemplo una dieta poco saludable, una mala higiene, o bien por los determinantes sociales y comerciales subyacentes (FDI & IADR, 2022; Giacaman et al., 2022; WHO, 2020, 2021; Wolf et al., 2021).

En cuanto a la manifestación de la lesión de caries, esta puede ocurrir a temprana edad, y su evolución, si no es tratada a tiempo, puede presumir un reto para la salud general, provocando alteraciones alimenticias, del sueño, dolor, maloclusiones, como también, afectar la salud mental, y la calidad de vida inmediata y al largo plazo de los niños y niñas (Chaffee et al., 2017; Peres et al., 2019; Ramos-Jorge et al., 2015). Asimismo, la enfermedad de caries significa una gran carga económica para los sistemas de salud de todos los países y para las familias (Peres et al., 2019). En 2015, se evaluó que el coste a nivel mundial de las enfermedades dentales llegaba a USD 544.410 millones (Righolt et al., 2018). En correspondencia con lo anterior, se puede estimar que el 45% del total de la carga mundial de enfermedades dentales es atribuible directa o indirectamente a las lesiones de caries no tratadas, valorándose en aproximadamente USD 245.000 millones (Vujicic and Listl, 2020). Lo anterior, comprende tanto el coste directo, es decir aquellos relacionados con el tratamiento de la enfermedad; el coste indirecto, asociado a la pérdida de productividad por ausentismo laboral y escolar, y costes intangibles, involucrados en actividades sociales y familiares, tales como el dolor, problemas para morder, masticar y comer, entre otros (Peres et al., 2019).

Respecto a la etiología de la caries dental, una de las hipótesis más aceptada es la propuesta en 1994 por Philip Marsh denominada hipótesis de la placa ecológica (figura 7). Esta describe al proceso como una enfermedad de naturaleza polimicrobiana, que es consecuencia de una disbiosis ecológica, es decir, de un desequilibrio o desbalance microbiano originado por un cambio ambiental, producto de una exposición a una frecuencia y cantidad de azúcares elevada, por consiguiente, el *biofilm* se ve expuesto en un ambiente más ácido, generando una

modificación de bacterias comensales en patógenas, las que eventualmente pueden causar la enfermedad (Marsh, 1994, 2003, 2006).

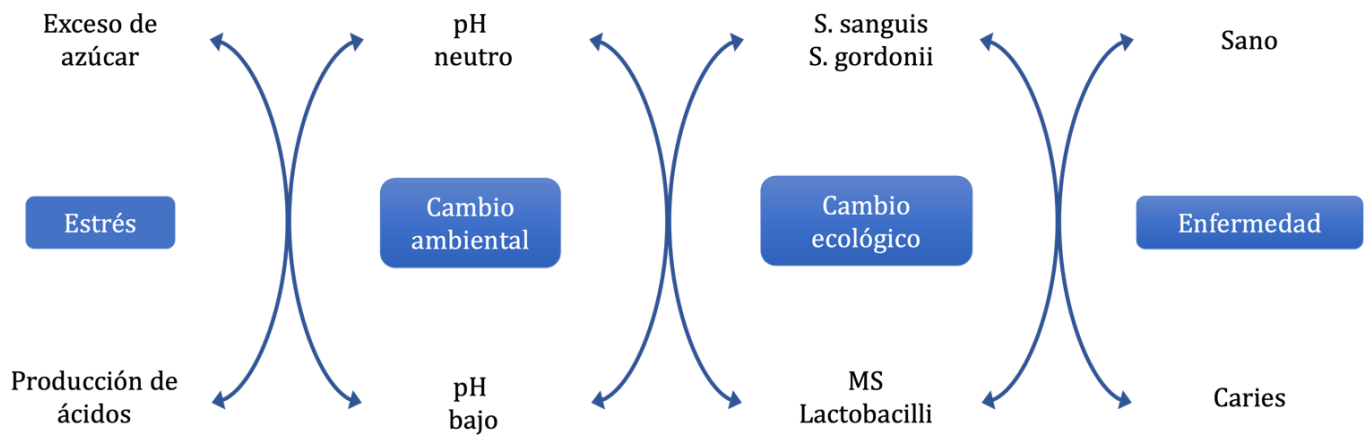


Figura 7. Hipótesis de la placa ecológica y la prevención de la caries dental.

Fuente: Adaptado de Marsh, P. D. (2006).

Ahora bien, hoy en día existe una visión más amplia respecto al postulado original de Philip Marsh, que hace hincapié en la importancia de la actividad metabólica que se produce en la comunidad microbiana, convirtiendo a esta en el principal modulador del ambiente (Nyvad and Takahashi, 2020). Ello se ve reflejado en investigaciones recientes donde se identifica un cambio en el metabolismo de los individuos con caries dental activa, exhibiendo una interrelación entre la microbiota y el metabolismo de la biopelícula (Wang et al., 2022).

Metabolómica y caries

La saliva brinda una oportunidad única de observar el funcionamiento interno del cuerpo por medio de la ejecución de diversos análisis que tienen el potencial de ser importantes indicadores de salud y enfermedad. En la actualidad, se sugiere su uso en investigaciones relacionadas en enfermedades, tales como el cáncer (Lohavanichbutr et al., 2018; Mikkonen et al., 2018; Song et al., 2020; Sugimoto et al., 2010), neurodegenerativas (Liang et al., 2015; Yilmaz et al., 2017), autoinmunes (Herrala et al., 2021; Kageyama et al., 2015; Setti et al., 2023), enfermedad periodontal (Baima et al., 2021; García-Villaescusa et al., 2018; Gawron

et al., 2019), caries (Fidalgo et al., 2013, 2015; Li et al., 2023; Pereira et al., 2019), entre otras.

En un inicio, las investigaciones en saliva que utilizaban RMN eran bastante limitadas, ya que las frecuencias empleadas eran relativamente bajas, 400 MHz versus los actuales 600 MHz, permitiendo obtener solo un pequeño número de asignaciones moleculares. Los primeros trabajos datan de 1990-1991, y fueron llevados a cabo por un equipo perteneciente al *St Bartholomew's and the Royal London Hospitals School of Medicine and Dentistry* en colaboración con *Queen Mary College* (Grootveld et al., 2022). A partir de entonces, nacen las primeras publicaciones sobre perfiles metabólicos presentes en la saliva humana. No obstante, se considera que el primer estudio «real» metabolómico de la saliva es en el año 2002, cuando Silwood *et al.* (2002), realizan una investigación con RMN de enfoque no dirigido que les permite identificar más de 60 biomoléculas.

Actualmente, se observa un gran progreso en las tecnologías y métodos de identificación de metabolitos, exhibiéndose un alza en cuanto al número de publicaciones relacionados en este ámbito. Sin embargo, las investigaciones que utilizan la saliva para la evaluación de perfiles metabolómicos son más bien escasas en comparación con otros biofluidos, como la orina y el plasma (Gardner et al., 2018a, 2020), por esta razón, se considera aún como una rama de investigación reciente que presenta un amplio rango de oportunidades a futuro.

Carbohidratos

Los carbohidratos (CH) son elementos cruciales en el proceso de la caries dental. Inicialmente se ven desintegrados en monosacáridos gracias a la acción de un conjunto de enzimas llamadas enzimas carbohidrato-activas (Barbour et al., 2022). Posteriormente, los monosacáridos ingresan intracelularmente a las bacterias orales, tales como *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, a través de los sistemas de transporte de azúcares denominados fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato y sistema de transporte de proteínas de unión. Una vez ingresados, estos continúan su proceso mediante la glucólisis o vía *Embden-*

Meyerhof-Parnas, dando origen al fosfoenolpiruvato, que generará piruvato, ATP (Adenosin trifosfato) y NADH (Nicotinamida adenina dinucleótida) (Barbour et al., 2022; Takahashi, 2015).

En conjunto, derivan del fosfoenolpiruvato o del piruvato por medio de diversas vías, el lactato, etanol, formiato y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), incluyendo al acetato, propionato, butirato (Barbour et al., 2022; Takahashi, 2015). De forma paralela, durante el proceso de glucólisis también se va consumiendo oxígeno, colaborando con la generación de un ambiente anaerobio (Takahashi, 2015).

Las investigaciones han identificado diferencias en el metabolismo entre los sujetos con caries dental activa y aquellos libres de caries, señalando que los individuos con caries presentaban un aumento en la actividad del metabolismo, particularmente de la glucosa y galactosa (Li et al., 2023; Wang et al., 2022). En esta misma línea, da Costa *et al.* (2021) concluyeron que la microbiota oral y el metaboloma asociado a la progresión de lesiones de caries es diferente a aquello encontrado en lesiones detenidas. Conforme a lo anterior, se ha registrado una disminución de los sacáridos en sujetos con caries (Fidalgo et al., 2013), hipotetizando que existe un mayor número de bacterias cariogénicas que dan lugar a un metabolismo más acelerado de estos compuestos. Sin embargo, Fidalgo *et al.* (2015) informan que posterior al tratamiento de las lesiones de caries los pacientes presentan una disminución de la concentración de sacáridos, sumado a un decrecimiento de microorganismos cariogénicos. Adicionalmente, Pereira *et al.* (2019) indican un aumento específico de monosacáridos en pacientes con caries, particularmente de fucosa, galactosa, glucosa y xilosa.

La literatura señala que frente a una exposición o incremento de ingesta de azúcares -como sucede durante las comidas- aumentan los niveles intracelulares de elementos, como la fructosa-1,6-bifosfato, que participan activamente durante la glucólisis. Ello provoca una aceleración de la vía *Embden-Meyerhof-Parnas*, generando como consecuencia una mayor producción de lactato (Takahashi, 2015). En correspondencia con lo anterior, Gardner *et al.* (2018a) distinguieron un

incremento de lactato en la saliva posterior al enjuague con sacarosa. Adicionalmente, se ha observado que cuando *S. mutans* se encuentra en un medio de cultivo con sacarosa, uno de sus principales compuestos provenientes de su metabolismo es el lactato (Letieri et al., 2022). Por lo tanto, el lactato -producto de la fermentación homoláctica del piruvato- genera como resultado final ácido láctico; este último logrará disminuir el pH y favorecerá que prosperen bacterias acidógenas (Barbour et al., 2022). Por este motivo, es considerado como uno de los principales involucrados en el desarrollo de las lesiones de caries (Pitts et al., 2017).

Conforme a lo descrito en el párrafo anterior, Andreadis y Kalfas (2014) han observado en pacientes pediátricos con caries activas que su *biofilm* produce más lactato a partir de la sacarosa que aquellos libres de caries, facilitando la instalación de un ambiente con mayor potencial cariogénico, el cual eventualmente favorecería la formación de nuevas lesiones de caries. En esta misma dirección, Fidalgo *et al.* (2013) y Kim *et al.* (2023), hallaron aumentadas las concentraciones de lactato en sujetos con lesiones de caries. Resultados similares fueron los de Schulz *et al.* (2020), quienes observaron un supuesto aumento de concentración respecto al resto de los grupos de estudio, sin embargo, no se logró identificar una diferencia estadísticamente significativa. No obstante, otras publicaciones no presentan variaciones significativas respecto a las concentraciones de lactato, impidiendo revalidar los resultados de los estudios precedentes (Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019).

Lo recién expuesto puede deberse a lo indicado por Gardner *et al.* (2019), quienes señalan que no hay una correlación entre la concentración de lactato y la carga de bacterias sacarolíticas, más bien, explican que este es un derivado del hospedero y que ingresa a la saliva total desde la circulación del plasma circundante a través de las glándulas salivales. Por lo tanto, sugieren que habría que tener en consideración las variables que modifiquen el lactato plasmático (por ejemplo el ejercicio físico) al momento de medir el lactato salival con fines diagnósticos (Gardner et al., 2019). En otro orden de ideas, la evidencia actual propone que el lactato pudiera estar relacionado con enfermedades periimplantarias; no obstante, aún se necesitan más estudios que determinen dicha relación (Barbour et al., 2022).

Por otra parte, la saliva total de pacientes sanos está predominada por AGCC, particularmente acetato, propionato, butirato y en menor medida formiato (Gardner et al., 2019). Específicamente, se ha expuesto que el acetato, propionato y butirato, tienen fuertes correlaciones con cargas bacterianas salivales, principalmente proteolíticas, indicando que estos metabolitos son producidos por la microbiota oral (Gardner et al., 2019).

Las investigaciones revelan que las concentraciones de n-butirato y acetato en saliva se expresan de forma aumentada en pacientes con caries (Fidalgo et al., 2013, 2015), al igual que en biopelículas maduras en comparación con aquellas recién formadas (da Costa Rosa et al., 2021). Asimismo, se ha observado que después del tratamiento de las lesiones de caries existe un efecto reductor de las concentraciones de ambos metabolitos (Fidalgo et al., 2015). Por lo tanto, existiría una vinculación entre estos metabolitos y la actividad metabólica de la microbiota asociada a la progresión de las lesiones de caries. Ahora bien, contrario a los resultados anteriores, Pereira *et al.* (2019) hallaron en su investigación que la concentración de butirato se encontraba disminuida en los sujetos con caries. Por lo demás, se sugiere que el butirato altera la respuesta inmune del hospedero, modulando la respuesta inflamatoria en las células epiteliales orales (Magrin et al., 2020). De igual forma, se ha visto enlazado con la patogénesis de las enfermedades periodontales, estimulando la colonización y mejorando la estructura del *biofilm* (Suzuki et al., 2018).

Respecto a las concentraciones de propionato, estas se han visto aumentadas en la saliva de pacientes con caries (Fidalgo et al., 2015), así como también, en biopelículas maduras (da Costa Rosa et al., 2021). Sin embargo, estos datos no se han ratificado, ya que, a su vez se han observado concentraciones reducidas en individuos con lesiones de caries (Fidalgo et al., 2013). Ahora bien, otro derivado del metabolismo de los CH -a través de la vía *Embden-Meyerhof-Parnas*- es el etanol (Silwood et al., 2002; Takahashi, 2015). Este compuesto se ha visto en concentraciones elevadas en pacientes con caries temprana de la infancia (Kim et al., 2023). No obstante, otras investigaciones similares no encuentran diferencias

relevantes en las concentraciones de etanol en la saliva entre pacientes con caries y sin evidencia de caries (Fidalgo et al., 2013; Pereira et al., 2019).

Finalmente, es crucial destacar que la interpretación de los carbohidratos y sus productos finales deben llevarse a cabo con precaución, debido a una gran cantidad de factores que influyen en la disponibilidad de estos a nivel salival, por ejemplo el origen étnico, la microbiota oral, el horario de recolección de la muestra, la dieta, entre otros (Dame et al., 2015). En efecto, una de las fuentes que podría contribuir de manera significativa a las posibles diferencias de los hallazgos en las concentraciones de ácidos orgánicos es la ingesta de diversos tipos de alimentos (Linke et al., 1997).

Lípidos

Referente a los metabolitos lipídicos, se ha indicado que puede existir una asociación entre niveles elevados de ácidos grasos y pacientes que presentan lesiones de caries (Fidalgo et al., 2013, 2015). Lo anterior, coincide con el estudio de Tomita *et al.* (2008), en el cual encontraron concentraciones elevadas de lípidos, particularmente ácido linoleico, esteárico y docosaheptaenoico, en la saliva parotídea de los pacientes susceptibles a caries dental. Sin embargo, Schulz *et al.* (2020) no encontraron esa diferencia en sus resultados.

Aminoácidos

La vía de la descomposición de las proteínas se ejecuta principalmente a través de las proteasas y peptidasas que se encuentran en el hospedero y las bacterias. Este proceso da origen a péptidos y aminoácidos que posteriormente serán desaminados y transformados en AGCC (Barbour et al., 2022; Takahashi, 2015).

A nivel del *biofilm*, se destacan como los aminoácidos libres más abundantes el glutamato y aspartato (Singer and Kleinberg, 1983). Además, es importante señalar que el glutamato figura como uno de los aminoácidos de mayor cantidad en

los biofluidos de los seres humanos. Por consiguiente, las bacterias orales, por ejemplo *P. gingivalis*, hacen que atraviese una serie de procesos, tales como la desaminación, la descarboxilación y la degradación, pudiendo dar origen a la formación de butirato, propionato y acetato (Takahashi, 2015). De igual forma, el aspartato también es degradado por bacterias orales, entregando como resultado la producción de succinato, formiato, acetato, butirato y propionato. Igualmente, otros aminoácidos, como la cisteína y metionina, colaboran con la obtención de acetato y propionato al ser degradados por la enzima cistationina γ -liasa y metionina γ -liasa, respectivamente (Takahashi, 2015).

Ahora bien, Pereira *et al.* (2019), señalan un aumento significativo de aminoácidos, particularmente de alanina, aspartato, glutamato, glicina, isoleucina, leucina, taurina, tirosina y prolina, en pacientes con presencia de lesiones de caries dental. Específicamente, se ha observado una relación entre la experiencia de caries y la presencia de prolina y glicina en la saliva total. En concreto, se sugiere que una mayor presencia de prolina se asocia a un mayor riesgo de caries en aquellos paciente con niveles elevados de *Streptococcus mutans*, mientras que la existencia de glicina reduciría el riesgo de desarrollar una lesión de caries (Fonteles et al., 2009). Sin embargo, Schulz *et al.* (2020) y Li *et al.* (2023) no vieron aumentadas las concentraciones de prolina y glicina en los pacientes con caries activa en comparación con los sujetos sanos. Sumado a esto, Kim *et al.* (2023) indican en su estudio niveles reducidos de estos metabolitos específicos en los sujetos que evidencian caries temprana de la infancia.

Por otro lado, las sialidasas actúan sobre las mucinas salivales, permitiendo la liberación de elementos que procederán como fuentes nutritivas a las bacterias orales (Barbour et al., 2022). La información precedente, es consecuente con el estudio de Banderas *et al.* (2002), quienes manifiestan que pacientes con índices elevados de CAOD presentan una reducción de mucinas en contraste con aquellas personas con índice CAOD más bajo. Asimismo, Angwaravong *et al.* (2015) indican que escolares en etapa de dentición mixta presentan una correlación negativa entre los niveles de mucina salival, específicamente MUC5B, y caries dental.

Ahora bien, también se encuentran aminoácidos que neutralizan la acción de los ácidos favoreciendo el equilibrio entre los procesos de remineralización y desmineralización dental. Por ejemplo, la arginina, aminoácido que puede provenir de la dieta o bien del hospedero; las bacterias arginolíticas, incluyendo *S. sanguinis*, *S. mitis*, *Streptococcus gordonii*, y ciertas especies de *Lactobacillus* y *Actinomyces*, ubicadas en la placa supragingival, utilizan una de sus principales vías de metabolización, el denominado Sistema de Arginina Deiminasa (SAD), para degradar la arginina y producir una serie de elementos alcalinos que contrarrestarán la acidificación producida por el metabolismo de los azúcares (Barbour et al., 2022; Nascimento et al., 2019; Takahashi, 2015).

De igual manera, el amoníaco -proveniente de la vía SAD- tiene un potencial reductor de cariogenicidad, favoreciendo el desarrollo de microorganismos compatibles con salud y neutralizando ácidos glucolíticos (Nascimento et al., 2019). De este modo, y con el objetivo de observar la capacidad arginolítica de la biopelícula supragingival mediante la evaluación del SAD, Nascimento *et al.* (2019) indican que existe una correlación positiva entre la actividad de caries y una baja capacidad arginolítica del *biofilm* supragingival, sugiriendo la medición del SAD como método de detección de riesgo cariogénico.

De igual modo, la urea -suministrada por la saliva- es un componente vital en la producción de elementos alcalinos. Esta es metabolizada a través de ureasas provenientes de bacterias, por ejemplo *S. salivarius* y *Actinomyces naeslundii*, reduciéndose y transformándose en amoníaco y dióxido de carbono (Huang et al., 2015; Takahashi, 2015). Además, se ha observado que la urea se correlaciona de forma inversa con la carga bacteriana en saliva total (Gardner et al., 2019). Por lo tanto, en conjunto con la arginina, la urea podría considerarse como otro factor protector frente al crecimiento de bacterias acidogénicas. Adicionalmente, otro aminoácido que se ha relacionado con la limitación del proceso de la caries dental es la fenilalanina, la cual se ha propuesto que pudiese tener un efecto inhibitor en el desarrollo de la caries dental gracias a la alcalinización del medio como resultado de su conversión al desaminarse y derivar en fenilacetato o fenilpropionato (Masoudi Rad et al., 2014; Shi et al., 2020). Lo anterior, es concordante con el estudio

de Fidalgo *et al.* (2013), en el cual los pacientes con caries presentaban una menor concentración de este aminoácido.

OBJETIVOS

Objetivos

Objetivo General

1. Determinar la capacidad de un modelo predictivo de la caries basado en el perfil metabolómico de la saliva en pacientes de edad infantil.

Objetivos Específicos

1. Analizar los hábitos e higiene oral de los sujetos y su relación con la caries dental.
2. Determinar la composición del perfil metabólico salival de los sujetos de estudio.
3. Identificar los metabolitos de mayor potencial como biomarcadores predictivos de la caries dental.

MATERIAL Y MÉTODO

Material y Método

Diseño del estudio

Se ha realizado un estudio observacional, de casos y controles; de tipo transversal. Presenta características de ser observacional, ya que no hay manipulación de los pacientes y está limitado a la observación de estos. Además, es de tipo caso y control porque se han seleccionado dos grupos de individuos, unos con la enfermedad de caries y otros que no. Por último, es transversal puesto que se han medido las variables en un momento y tiempo determinado.

Las propiedades descritas anteriormente permitirán cumplir con los objetivos propuestos por el equipo investigador.

Muestra

Se incluyeron a los niños y niñas, entre 6 y 12 años de edad, derivados por los equipos de Pediatría de los Centros de Salud (CS) -Benimaclet, Alfahuir, Salvador Pau, Chile, República Argentina, Malvarrosa, Serrería I y II, Trafalgar, Vicente Brull, Nazaret y La Punta- a las Unidades de Odontopediatría de los CS Malvarrosa y Nazaret, pertenecientes al Departamento Clínico-Malva-rosa. En estos últimos, se ejecuta el programa de salud bucodental infantil, cuyo principal objetivo es la promoción, prevención y mejora de la salud bucodental.

Tamaño muestral

Para determinar el tamaño muestral hemos utilizado el software R y el paquete pwr (función `pwr.t.test`). Se ha estimado un mínimo de $n=29$ en cada grupo

para un escenario de comparación entre dos medias normalizadas (casos vs controles) con los supuestos de un nivel de significación=0,05, potencia=0,8 y una d de Cohen=0,7 (tamaño del efecto de moderado a alto). Además, nos hemos basado en estudios anteriores similares al nuestro reportados en la literatura. El tamaño de la muestra del estudio se compone de 31 casos y 37 controles.

Selección de la muestra

La selección de los participantes ha sido por muestra consecutiva, es decir, se fueron incluyendo en el estudio los individuos que iban acudiendo a la Unidad de Odontopediatría de los CS nombrados anteriormente, durante el periodo de tiempo entre febrero y mayo de 2022, y que cumplieran con los criterios de selección definidos como «caso», o sea, personas que presentaban códigos 3, 4, 5 y 6; y «control», vale decir, pacientes que exhibían un código 0, 1 y 2, según la herramienta de clasificación internacional de caries ICDAS-II. Además, todos los participantes debían presentar firmada la autorización y consentimiento informado para participar en el estudio.

Por otro lado, se excluyeron los niños/as que presentaban gingivitis moderada/severa, pacientes que hayan recibido tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses, menores con enfermedades sistémicas o autoinmunes, e individuos con algún tipo de discapacidad, y/o portadores de aparatos de ortodoncia.

Consentimiento informado

En primer lugar, se les explicaba de forma verbal a los padres y/o cuidadores de los participantes toda la información necesaria sobre los objetivos del estudio y la metodología de recolección y exploración que se realizaría en caso de que participasen. Además, se les entregó un consentimiento informado (anexo III y anexo IV) con toda la información básica necesaria, el cuál debía ser firmado para dar el consentimiento a que sus hijos/as al cargo participasen en la investigación.

Una vez recibidas las autorizaciones firmadas de los padres y/o tutores se realizaba la exploración, la toma de la muestra de saliva y se recogía la información a través del cuestionario de hábitos, el que había sido entregado previo al examen.

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de investigación en Humanos de la Universitat de València con el número de registro 1885726 (anexo V) y por el Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia con número de orden 2022/008 (anexo VI), respetando los principios éticos de la declaración de Helsinki y cumpliendo la normativa vigente en cuanto a protección de datos de carácter personal.

Trabajo de campo

Material utilizado

Para llevar a cabo las exploraciones se han considerado las recomendaciones y criterios sugeridos por la OMS para las Encuestas de Salud Bucodental (2013). El material de examen utilizado fue aquel dispuesto por los CS, siendo estos un espejo plano intraoral del N.º 5, sonda exploratoria, pinza acodada con cierre. Además, se empleó aspirador dental, torundas de algodón, mascarilla FFP2 y guantes desechables de nitrilo, evitando así posibles reacciones alérgicas al látex. Al acabar la jornada de exploración, el material era desinfectado y esterilizado en los CS correspondientes.

Por otra parte, el material aplicado para la recolección de las muestras de saliva fueron tubos Eppendorf de 1,5 ml.. Estos fueron previamente esterilizados en el autoclave de la Clínica Odontológica de la Universitat de València. La recopilación de las muestras obtenidas fue del 100 % de los participantes.

Los hallazgos clínicos y sociodemográficos se registraron en el formulario de exploración diseñado para el estudio (anexo I), y la información sobre hábitos e higiene bucodental en el cuestionario de salud oral (anexo II).

Recolección de datos y muestras

Inicialmente se ha realizado un triaje para la elección de los participantes por medio de la aplicación de los criterios de selección de la muestra. Seguidamente, a los padres y/o tutores de los niños/as del estudio se les solicitó que previo a la cita de exploración y toma de muestra, firmen el consentimiento informado (anexo III y IV) y autocumplimenten el cuestionario de salud oral (anexo II).

Las exploraciones y recolecciones de las muestra de saliva fueron efectuadas en las unidades dentales de los Centros de Salud. Por consiguiente, se ha realizado el registro clínico de los sujetos de estudio en un sillón dental, garantizando condiciones óptimas de iluminación, ergonomía y control del medio.

En correspondencia con el diseño de la investigación, las muestras de saliva total no estimulada han sido obtenidas siguiendo un mismo protocolo de recolección y mediante el método de drenaje pasivo. Esta técnica implica que el paciente se siente tranquilamente en posición de reposo, incline la cabeza levemente hacia adelante y abra los labios ligeramente facilitando que la saliva caiga de forma pasiva en un tubo Eppendorf calibrado (López Jornet, 2010; Priya and Prathibha, 2017); idealmente se recolectó 1 ml de saliva.

Todas las muestras biológicas fueron conseguidas siguiendo las mismas instrucciones generales descritas en la literatura (Fidalgo et al., 2013, 2015; López Jornet, 2010). Es decir, se obtuvieron en un ambiente tranquilo, en el mismo rango horario (16:00 – 19:30). Además, se hizo entrega de forma verbal y escrita a todos los pacientes las mismas indicaciones: dos horas previas a la cita no consumir alimentos y/o líquidos, y no realizar ningún tipo de higiene oral, incluido lavarse los dientes con pasta dental, utilizar colutorio o seda dental, en el día de la cita (anexo VII).

El almacenamiento y la manipulación de las muestras de saliva fueron estrictamente estandarizadas. Por ello, todas las muestras se mantuvieron a -20 °C en neveras portátiles con hielo hasta un máximo de 3 horas y luego transferidas y almacenadas en un ultracongelador a -80 °C hasta el día de las mediciones de RMN.

Formulario de exploración

Se cumplimentó una ficha clínica adaptada de la Encuesta de Salud Bucodental de la OMS (2013). En un primer apartado se detalla la información sociodemográfica del paciente y en un segundo apartado se encuentra lo relativo a la salud oral del paciente.

Se adaptó el formulario de evaluación de salud bucodental de la OMS, en base a las necesidades y objetivos propuestos en nuestro estudio. De manera que, se utilizó el criterio de clasificación de caries ICDAS-II, el Índice Periodontal Comunitario (IPC) y la guía para el diagnóstico de la hipomineralización incisivo molar (MIH, por sus siglas en inglés) establecida el año 2021 por la Academia Europea de Odontopediatría (Lygidakis et al., 2021).

Las variables recogidas en el registro clínico se adjuntan a continuación:

Variables personales

- i. Fecha de exploración: Se registró el día, mes y año en que se realizó la exploración.
- ii. Hora: Se anotó la hora y minutos en que tuvo lugar la exploración, anotando con dos dígitos cada uno de ellos.
- iii. N.º Identificador: Corresponde al código de cuatro dígitos único e irrepetible que identifica a cada individuo explorado. Esta variable concede la seudonimización de la base de datos.

- iv. Nombre: Nombre completo del niño/a explorado.
- v. Género: Se registró si el menor era de sexo masculino con un código «1» o femenino con un código «2».
- vi. Fecha de nacimiento: Se apuntó la fecha completa con día, mes y año del paciente.
- vii. Centro de Salud: Se identificó el CS al cual está asignado el sujeto de investigación, asignándole el código «1» al CS Malvarrosa y el código «2» al CS Nazaret.
- viii. Muestra: Se marcó con un visto bueno la casilla de saliva una vez conseguida la muestra.

Variables clínicas

- i. Necesidad de tratamiento: Se ha registrado la necesidad de remitir a los niños/as a los servicios de salud, en caso de ser necesario, según la siguiente clasificación:

0 = Sin necesidad de tratamiento

1 = Necesidad de tratamiento preventivo o de rutina

2 = Necesidad de tratamiento inmediato, incluido el raspado

3 = Necesidad de tratamiento inmediato (urgente) debido a dolor o infección de origen dental y/o bucal

4 = Remitido para una evaluación completa o un tratamiento médico/dental (condición sistémica)

- ii. Índice Periodontal Comunitario: El estado de salud periodontal se ha atribuido a través del IPC simplificado a dos grados y seis dientes índice.

La puntuación de sangrado gingival se consideró como:

0 = Sano

1 = Sangrado observado directamente o con visión indirecta mediante un espejo, luego de la exploración.

En virtud de la población examinada -al ser menores de 15 años-, no fueron consideradas las bolsas periodontales en el registro, y solo se cotejaron los dientes índices 16-11-26-36-31-46. Ahora bien, si no tenía ningún diente índice en un sextante que cumpla con los requisitos para ser evaluado, se examinaba el resto de los dientes que estaban presentes en ese sextante y la puntuación más alta era la que finalmente se registraba.

- iii. Lesiones de mucosa oral: Se realizó una examinación rigurosa y sistemática de la mucosa oral y tejidos blandos de cada paciente, mediante la ayuda de un espejo plano N°5 y el mango de la sonda exploratoria. Esto permitió registrar la ausencia, presencia o sospecha de enfermedad, con un máximo de tres condiciones.

Los códigos según condición aplicados para niños/as fueron:

- 0 = Sin anormalidades
- 1 = Ulceración
- 2 = Gingivitis ulcero necrotizante aguda
- 3 = Candidiasis
- 4 = Absceso
- 8 = Otras condiciones
- 9 = Sin registro

Adicionalmente, se registró la localización de la lesión en la mucosa oral en caso de que el sujeto en estudio la presentara, conforme a la siguiente clasificación:

- 0 = Borde del bermellón
- 1 = Comisuras
- 2 = Labios
- 3 = Surcos
- 4 = Mucosa bucal
- 5 = Piso de boca
- 6 = Lengua
- 7 = Paladar duro/blando
- 8 = Reborde alveolar/gingival

9 = Sin registro

- iv. Fluorosis: Para la determinación de lesiones por fluorosis se empleó el índice de Dean, el cual codifica utilizando el siguiente criterio:

0 = Normal

1 = Discutible

2 = Muy leve

3 = Leve

4 = Moderada

5 = Severa

8 = Excluido (ejemplo, corona, restauración, «bracket»)

9 = No registrada

- v. Trauma dental: La clasificación del formulario de evaluación de salud bucodental de la OMS para los dientes afectados por traumatismo incorpora adicionalmente el número de dientes involucrados.

Los códigos utilizados fueron:

0 = Sano

1 = Lesión tratada

2 = Fractura solo de esmalte

3 = Fractura de esmalte y dentina

4 = Lesión con compromiso pulpar

5 = Diente perdido a causa de un trauma

6 = Otras lesiones

9 = No registrado

- vi. Hipomineralización Inciso Molar: Se asentó como bases diagnósticas de MIH los criterios recientemente actualizados y expuestos por la *European Academy of Paediatric Dentistry* (EAPD) (Lygidakis et al., 2021). En virtud de lo anterior y en consideración con los objetivos y necesidades del estudio, se utilizó el formulario abreviado propuesto por Ghanim *et al.* (2015) para el registro de MIH y HSPM (del inglés *Hypomineralised*

Second Primary Molars o hipomineralización en segundos molares temporales). Esta plantilla evalúa el estado de erupción, el estado clínico y de extensión de la lesión de los dientes índices (primeros molares permanentes, segundo molares primarios e incisivos permanentes); registrando el código de la superficie de mayor gravedad del diente índice.

A continuación, se describen los códigos utilizados para cada variable.

El estado de erupción:

A = Diente no erupcionado o semi-erupcionado con menos de 1/3 de la superficie oclusal o longitud de la corona del incisivo visible.

El estado clínico:

0 = Sin defectos del esmalte

1 = Defecto del esmalte, no MIH/HSPM

2 = Opacidades blancas, cremosas demarcadas, amarillas o marrones demarcadas.

3 = Pérdida de esmalte post-eruptivo

4 = Restauración atípica

5 = Caries atípica

6 = Diente ausente por MIH/HSPM

7 = No puede ser registrado

Extensión de la lesión:

I = Menos de un tercio del diente afectado

II = Al menos un tercio del diente afectado, pero menos de dos tercios de este.

III = Al menos dos tercios del diente afectado

Posteriormente, se consideró para establecer el grado de afectación por MIH, los niveles de severidad descritos y recomendados por la EAPD en

leve o severo, de acuerdo con la siguiente descripción (Ghanim et al., 2017; Lygidakis et al., 2010, 2021):

Leve: Opacidades delimitadas sin pérdida del esmalte poseruptiva. Puede existir sensibilidad ocasional inducida por estímulos externos, por ejemplo con aire/agua, pero no durante el cepillado. Leve preocupación estética por la decoloración de los incisivos.

Severo: Opacidades delimitadas con pérdida del esmalte poseruptiva, caries, hipersensibilidad persistente/espontánea que afecta a la función, por ejemplo durante el cepillado. Fuertes preocupaciones estéticas que pueden tener impacto sociopsicológico.

En concordancia con lo anterior, el grado de severidad fue dado por el defecto más grave en el diente, asignando como leve el código 2 y severo los códigos 3 al 7.

- vii. Caries: El presente estudio utilizó el criterio de ICDAS-II (International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) Coordinating Committee, 2011) para la valoración de la gravedad de las lesiones de caries. Adicionalmente, se ha seleccionado para una mejor y exhaustiva recolección de datos, el sistema de codificación de dos dígitos. De modo que, se han registrado los sellantes y/o restauraciones presentes, indicados en el primer dígito, seguido por un segundo dígito correspondiente al código de la lesión de caries.

En seguida, la codificación utilizada de ICDAS-II:

Códigos de obturación (primer dígito)

- 0 = Sano; sin sellado ni obturaciones
- 1 = Sellado parcial
- 2 = Sellado total
- 3 = Obturación estética

- 4 = Obturación de amalgama
- 5 = Corona de acero inoxidable
- 6 = Corona o carilla ceramometálica o porcelana
- 7 = Obturación rota o perdida
- 8 = Obturación provisoria

Códigos 9 (Para dientes ausentes y/o no valorables)

- 96 = No se puede examinar la superficie del diente
- 97 = Diente perdido por caries
- 98 = Diente perdido por otra causa
- 99 = Diente no erupcionado

Código de caries (segundo dígito)

- 0 = Diente sano
- 1 = Cambio visual en esmalte con diente seco
- 2 = Cambio visual en esmalte con diente húmedo
- 3 = Fractura de esmalte, sin dentina expuesta
- 4 = Sombra oscura subyacente de la dentina
- 5 = Cavidad visible con dentina expuesta
- 6 = Cavidad extensa, más del 50% de la superficie, con dentina expuesta

Dado el rango de edad de los pacientes (6 a 12 años de edad) incluidos en la investigación, era indispensable considerar una codificación para los dientes primarios. Por consiguiente, el segundo dígito relativo al código de caries en dientes primarios se registró como: «A» = 0, «B» = 1, «C» = 2, «D» = 3, «E» = 4, «F» = 5 y «G» = 6. Conjuntamente, se tuvo consideraciones especiales, tales como si había duda de un código se registraba el menor de estos; en los casos donde estaba presente el diente temporal y el permanente, se anotaba solo el código de este último, y cuando existía más de una lesión de caries en una misma superficie, se apuntaba el código de la lesión más grave.

Por último, una vez examinados los dientes húmedos, se usó aire comprimido por 5 segundos, para observarlos en seco, pudiendo distinguir entre los códigos de caries 1 y 2.

Cuestionario de salud oral

Se les ha solicitado a los padres y/o cuidadores de los todos los menores, autocumplimentar un cuestionario de hábitos de higiene y salud oral similar al exhibido en Encuesta de Salud Bucodental de la OMS (2013), aunque, con algunas modificaciones considerando la realidad local y edad de los pacientes.

Adicionalmente, se agregó una pregunta sobre la ocupación de los padres, la cual nos permitió analizar la clase social del niño o niña considerando la ocupación laboral de los padres y/o cuidadores del menor. Se utilizó la adaptación española de la clasificación del *British Registrar General* propuesto por Domingo y Marcos (1989).

Esta clasificación categoriza las profesiones de la siguiente manera:

- I = Directivos de la Administración Pública. Altos funcionarios. Profesionales liberales. Técnicos superiores.
- II = Directivos y propietarios-gerentes del comercio y de los servicios personales. Otros técnicos (no superiores). Artistas y deportista.
- III = Cuadros y mandos intermedios. Administrativos y funcionarios, en general. Personal de los servicios de protección y seguridad.
- IVa = Trabajadores manuales cualificados de la industria, el comercio y los servicios y del sector primario.
- IVb = Trabajadores manuales semicualificados de la industria, el comercio y los servicios y del sector primario.
- V = Trabajadores manuales no cualificados.
- VI = «No clasificables», aquéllos sin profesión declarada o mal declarada, mal clasificados o pertenecientes a las fuerzas armadas.

En el presente estudio se han agrupado estas categorías para el análisis de la clase social en: nivel «A» los grupos I y II, nivel «B» los grupos III y IVa, y nivel «C» los grupos IVb, V y VI, tal como se ha utilizado en otros estudios (Almerich-Torres et al., 2020; Alonso et al., 1997).

De igual manera, se ha creado en base a las respuestas de la pregunta N.º 8 una nueva variable denominada «calidad de vida», que se reflejará en el apartado de resultados en la Tabla N.º 19. Para la estimación de esta nueva variable se ha asignado un punto a cada respuesta afirmativa de las preguntas incluidas en la pregunta N.º 8 del cuestionario de salud (anexo II), pudiendo alcanzar cada sujeto un máximo de 6 puntos. Ésta tiene como objetivo principal relacionar la calidad de vida de los participantes con su salud oral.

Procesamiento y análisis de datos

Adquisición y procesamiento de los datos con RMN

Preparación de la muestra

En una primera etapa, las muestras de saliva fueron descongeladas y posteriormente centrifugadas en una minicentrífuga *Sigma 1-14* a 14800 rpm durante 5 minutos. A continuación, el método de preparación seguido consistió en adicionar 55 µL de una solución de KH_2PO_4 (1.5M) / ácido trimetilsililpropanoico-d4 (TSP, 5.8 mM) en D_2O a 495 µL de saliva. Un total de 500 µL de la mezcla anterior se introdujo dentro de un tubo de 5mm de alta resolución de RMN. La concentración final del TSP en el tubo fue de 0.58 mM.

Adquisición de la señal

Los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro *Bruker Avance III DRX 600* (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania)(figura 8), instalado en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica de la Facultad de Medicina-UCIM/INCLIVA, operando a una frecuencia de ^1H de 600,13 MHz y equipado con una sonda QXI 5mm de cuádruple resonancia $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$. La gestión de los tubos de medida, entrada y salida del espectrómetro se realizó mediante un robot muestreador termostatzado SampleJet.

La temperatura de la muestra dentro del equipo se controló mediante una unidad enfriadora BCU Xtreme. La uniformidad del campo magnético se consiguió inicialmente mediante un ajuste manual de las bobinas de homogeneidad usando un experimento 1D con presaturación de agua en modo interactivo. Para el resto de las medidas, la homogeneidad de campo se mantuvo mediante una rutina de corrección automática (TopShim) implementada en el software del equipo. La temperatura nominal de la muestra durante las medidas se mantuvo constante en 298K. Para todas las muestras se adquirió un experimento de un pulso simple con presaturación de agua, de 3 minutos de duración, 64 repeticiones, 65.000 puntos, 2 segundos de tiempo de relajación y 3,94 segundos de tiempo de adquisición. La presaturación del agua se ejecutó durante 1 segundo a lo largo del tiempo de reciclado para la supresión de la señal del solvente. La anchura espectral para todos los espectros se ajustó a 8000 Hz para el espectro de ^1H . Antes de aplicar la transformada de Fourier a los datos, se multiplicó la FID (decaimiento libre de la señal) por una función exponencial de anchura de línea de 0,3 Hz.

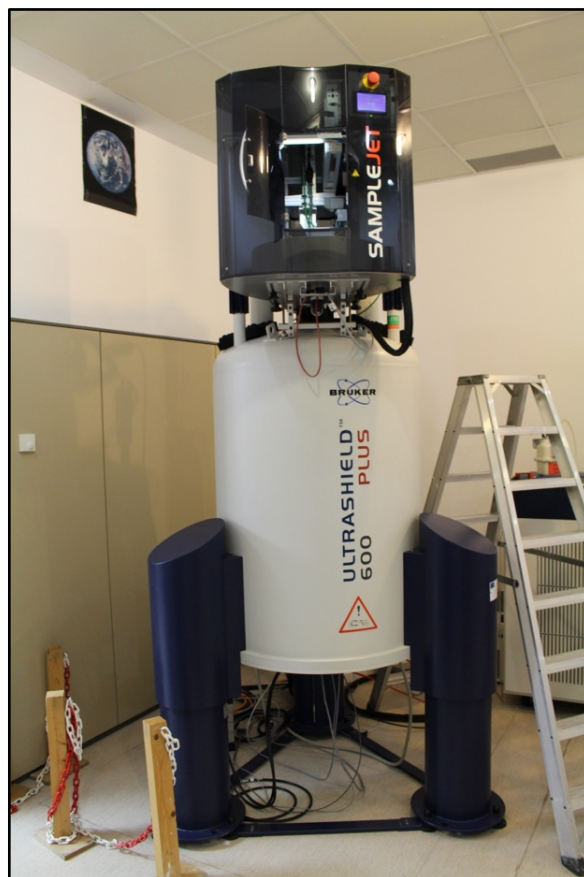


Figura 8. Espectrómetro de RMN Bruker Avance DRX 600 Mhz. Ubicado en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica de la Facultad de Medicina-UCIM/INCLIVA. Fuente: Elaboración propia.

Procesamiento de los espectros

Con el empleo del software *MestReNova 10* (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, España) se aplicó a cada espectro un preprocesamiento de datos, los cuales consistieron en una corrección manual de fase, un ajuste de la línea de base y referenciado del desplazamiento químico. En la presente investigación todos los espectros han sido referenciados usando la señal del TSP a 0 ppm (figura 9).

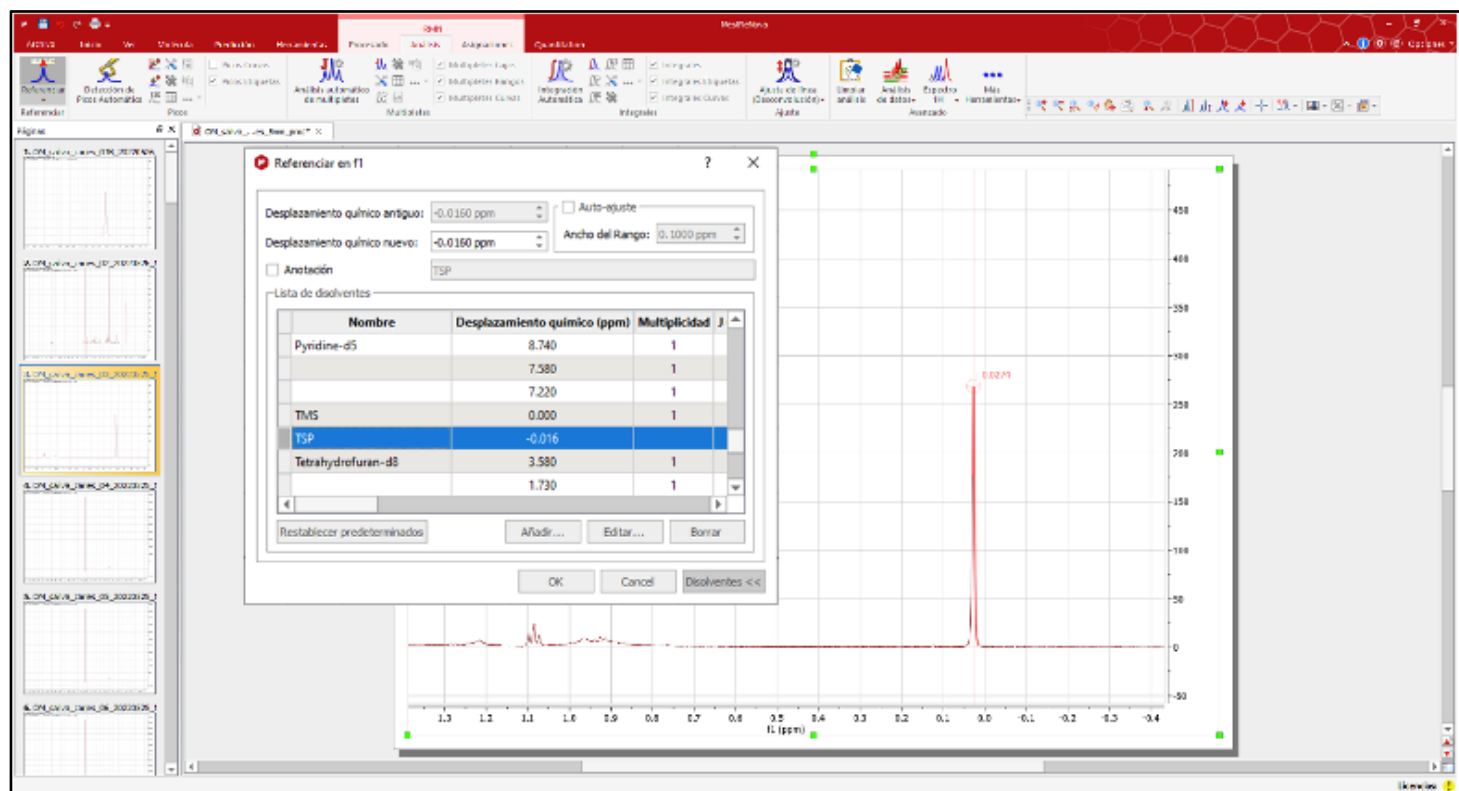


Figura 9. Representación del preprocesamiento de datos.
Se observa la fase de desplazamiento químico referenciado a la señal del TSP.

Asignación e integración de los espectros

Se realizó la asignación de las señales de los espectros de acuerdo con las referencias de la literatura disponible (García-Villaescusa et al., 2018), de las bases de datos especializadas (HMDB, BMRB, etc.) y la base de datos espectral incluida en el programa de ajuste y cuantificación contenida en *Chenomx NMR Suite 8.1* (Chenomx Inc, Alberta, Canadá) (figura 10).

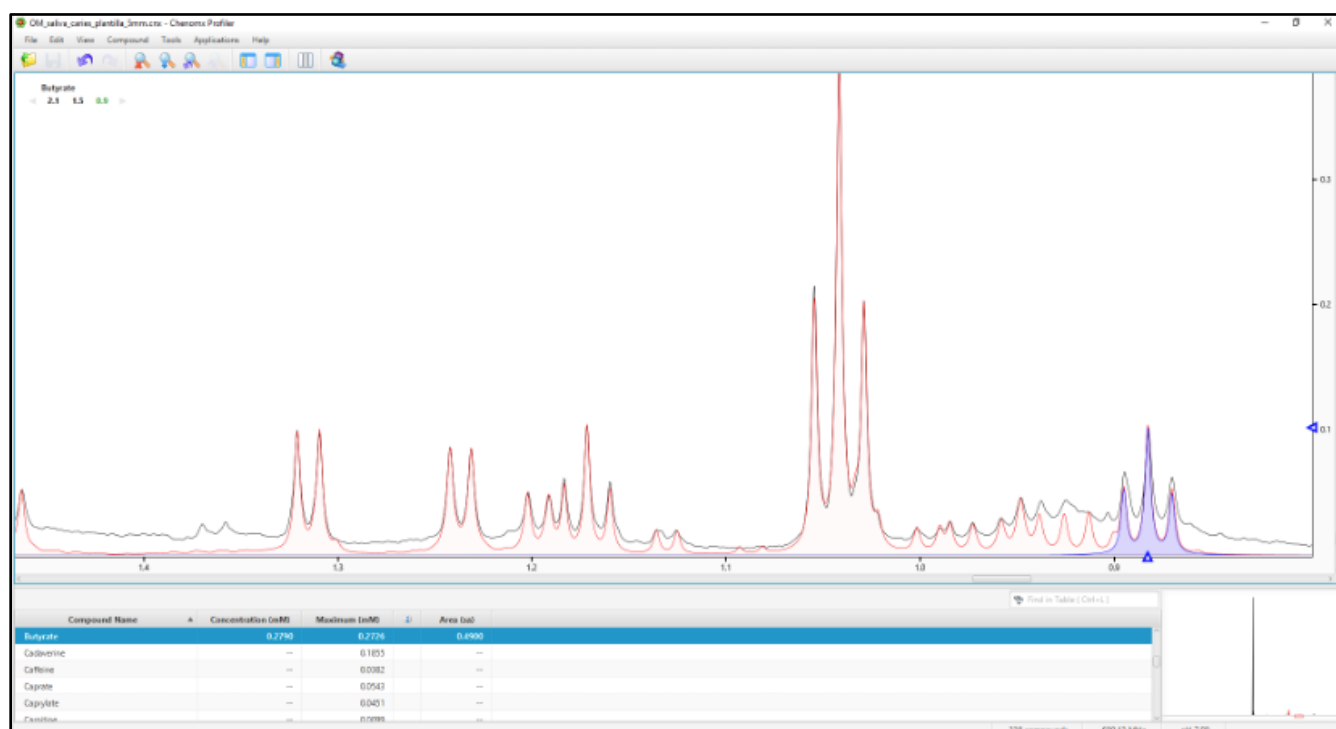


Figura 10. Visión general de la deconvolución de los espectros utilizando la base de datos Chenomx NMR Suite 8.1.

La área demarcada en azul señala la identificación del butirato dentro del espectro.

Procesado de los datos

La señal de RMN medida empleada para la cuantificación de los niveles metabólicos fue, para todas las muestras, la secuencia ^1H -RMN ZGPR de la librería de secuencias de Bruker. Se intentó asignar e integrar el máximo de las señales presentes en los espectros. De tal manera que las señales seleccionadas se asignaron y cuantificaron utilizando el programa de ajuste y cuantificación Chenomx NMR Suite 8.1 (Chenomx Inc, Alberta, Canadá). La concentración de los metabolitos se expresó en unidades de concentración normalizada (UCN) a la suma del contenido metabólico total, con el fin de hacer directamente comparables todas las muestras entre sí.

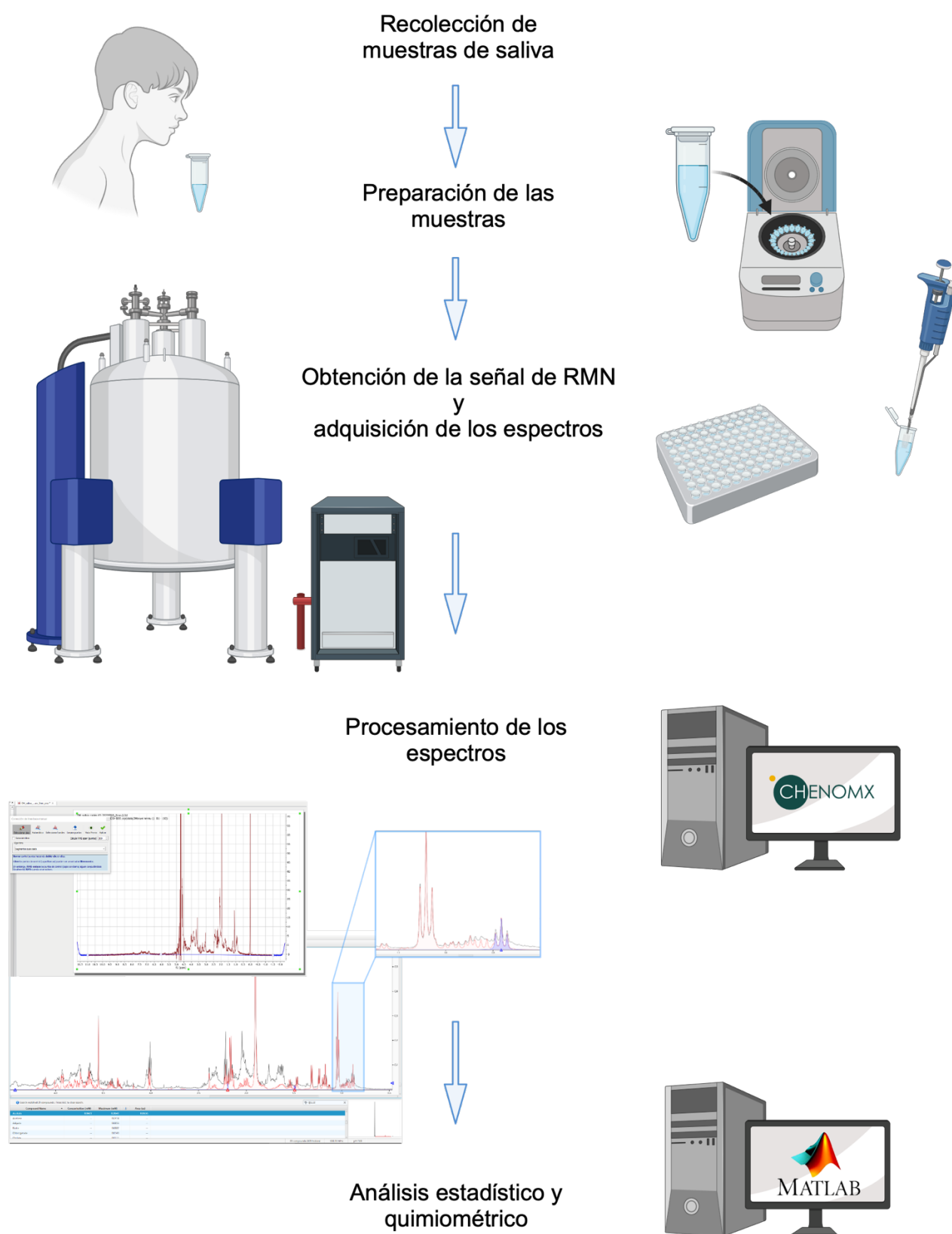


Figura 11. Esquema de flujo de trabajo.

Análisis estadístico

Análisis estadístico descriptivo y analítico

La información recolectada de los formularios (anexos I y II) fue almacenada en hojas de cálculos del programa Microsoft® Excel v 16.70. Se utilizó para el análisis estadístico de los datos recogidos el programa SPSS v 29 de IBM.

Para las variables cuantitativas se estimaron sus medias y para las variables cualitativas se estimaron sus porcentajes, así como, sus intervalos de confianza al 95%. Para las comparaciones de las medias tras la comprobación de la normalidad con los test de *Kolmogorov-Smirnov* y *Shapiro-Wilk*, se emplearon el test t de *Student* para muestras paramétricas independientes y la prueba *U de Mann-Whitney* para muestras no paramétricas independientes.

Además, para estimar la magnitud del tamaño de efecto entre dos medias normalizadas se utilizó la d de *Cohen*, que representa el número de desviaciones típicas que separan dos grupos. Se interpreta como tamaño de efecto pequeño cuando la $d = 0,2$; tamaño de efecto mediano $d = 0,5$ y tamaño de efecto grande cuando la $d > 0,8$.

Para la comparación entre proporciones se empleó el test χ^2 y la prueba exacta de *Fisher*.

El nivel de significación estadístico tanto para las comparaciones de proporciones como de medias se estableció para un p-valor $< 0,05$.

Análisis estadístico quimiométrico

Todos los datos se trasladaron al entorno de programación científica y matemática MATLAB 2019b (MathWorks, Natick, Estados Unidos) para el análisis de perfiles moleculares y la búsqueda de correlaciones globales mediante técnicas

avanzadas de análisis multivariable. Los modelos se han construido usando rutinas propias en Matlab y el paquete de herramientas PLS_Toolbox (Eigenvector Research, Inc.).

Para todas las variables independientes estudiadas, inicialmente, se realizó un análisis no supervisado mediante modelos de Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) para el estudio global de las muestras. Se evaluó la homogeneidad dentro de los grupos y se identificaron posibles *outliers* utilizando los gráficos combinados T2 de Hotelling, Q residuals y el diagrama de cargas. Posteriormente, se realizó un análisis supervisado para identificar posibles diferencias entre los grupos analizados mediante un Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés), que facilita la detección de subgrupos y las regiones espectrales que tiene mayor contribución a la separación entre ellos.

En virtud del modelo anterior, se obtuvo un listado con las K-variables empleadas en el modelo y su correspondiente valor VIP (del inglés *Variable Importance in Projection*). Se consideró que los descriptores con valores VIP > 1 eran los que contribuían en mayor medida a la discriminación entre los grupos de estudio. Los modelos quimiométricos se sometieron a validación cruzada mediante Venetian blinds para evaluar la precisión de cada modelo de clasificación. En cada ejecución, una muestra de los datos se deja fuera de los cálculos de entrenamiento y se utiliza para probar el modelo. Todo el proceso de validación cruzada se ejecutó 10 veces. Se calculó el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) ROC (del inglés *receiver operating characteristic*) para la discriminación entre casos y controles utilizando todas las variables incluidas en el modelo predictivo.

RESULTADOS

Resultados

Descriptiva de la muestra

La muestra final observada fue de 68 individuos, de los cuales 52 pertenecían al CS Malva-rosa y 16 al CS Nazaret (figura 12). Asimismo, con una distribución equilibrada, el sexo de los participantes fue de 34 individuos de sexo masculino y 34 de sexo femenino (figura 13).

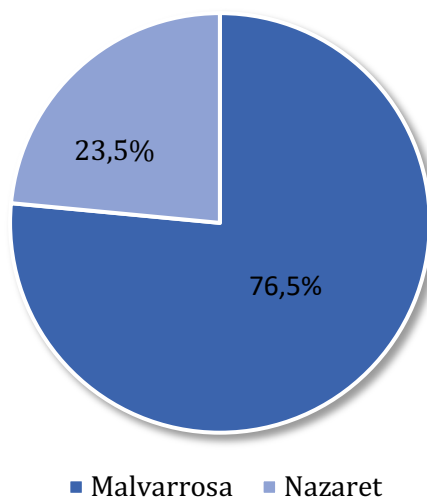


Figura 12. Distribución porcentual de los Centros de Salud del total de la muestra.

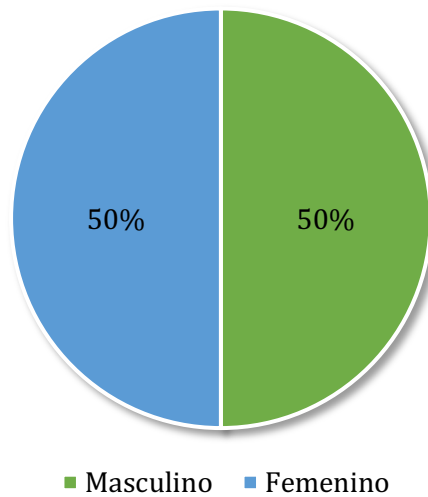


Figura 13. Distribución porcentual según sexo del total de la muestra.

La participación por edad del total de los sujetos explorados fue la siguiente, catorce niños de 6 años, siete de 7 años, ocho de 8 años, quince de 9 años, cuatro de 10 años, trece de 11 años y siete de 12 años. La frecuencia por edad se puede observar en la figura 14.

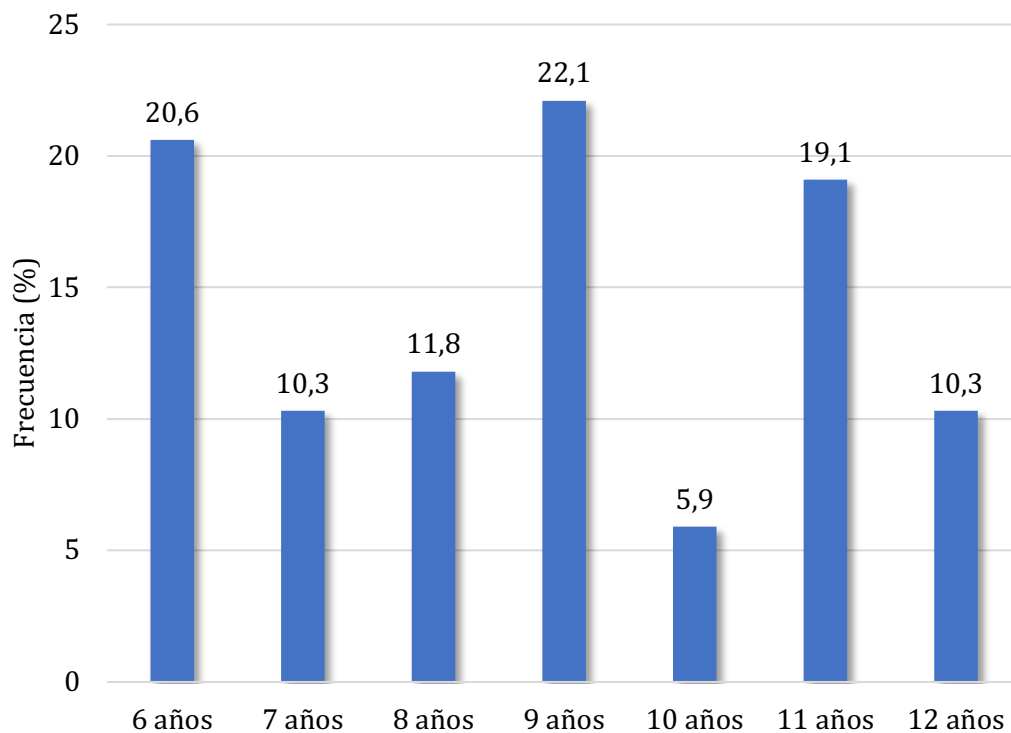


Figura 14. Distribución porcentual por edad del total de la muestra.

En correspondencia con la clase social, se consideró la de mayor asignación obtenida entre ambos padres. Por lo tanto, pertenecientes a la categoría «A» fueron 20 individuos (29,4 % de la muestra total), a la categoría «B» 30 sujetos (44,1 %) y a la categoría «C» 18 participantes (26,5 %) (figura 15).

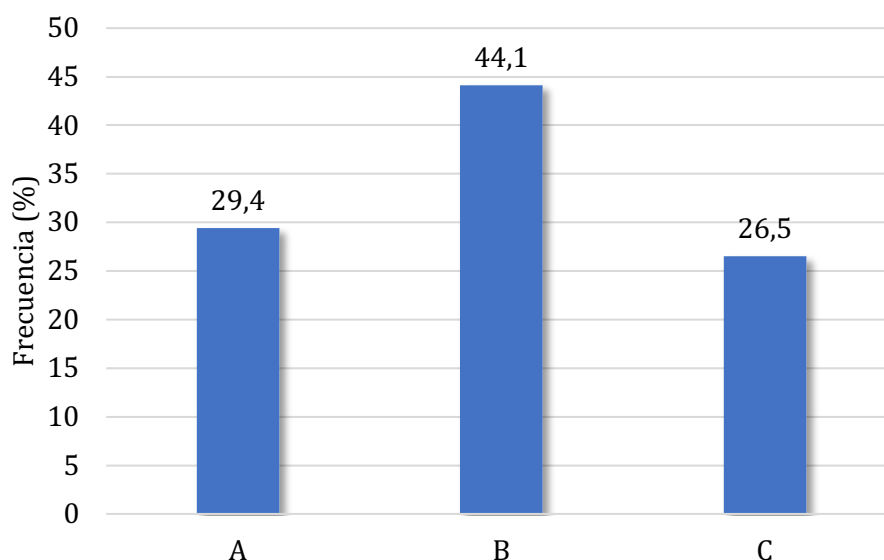


Figura 15. Representación porcentual de la clase social del total de la muestra. Clase social: A (códigos I y II), B (códigos III y IVa) y C (códigos IVb, V y VI).

Descriptiva caso y control

En relación con la condición clínica definida como caso y control se observaron 37 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión de control (54,4%) y 31 individuos obedecían a la definición asignada como caso (45,6%) (figura 16).

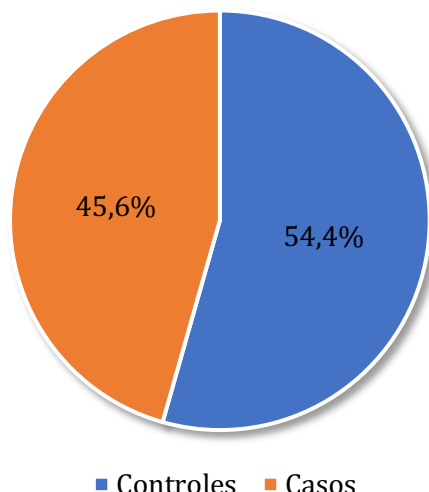


Figura 16. Distribución porcentual de casos y controles.

Conforme al análisis entre los casos y controles y la edad no se han observado diferencias significativas (test *U de Mann-Whitney* p-valor= 0,671). Resultado similar encontramos con la variable sexo con un test χ^2 p-valor = 0,808 y test de *Fisher* p-valor = 1. Por último, tampoco se ha observado diferencia significativa entre los casos y controles y la clase social (χ^2 p-valor = 0,257). Se puede observar lo anteriormente señalado en la tabla 2, y la representación gráfica de sexo y clase social según casos y controles en las figuras 17 y 18, respectivamente.

Tabla 2. Descriptiva de la muestra según casos y controles.

	CONTROLES Media/n (%) [IC-95%]	CASOS Media/n (%) [IC-95%]	Test
Edad	8,70 [7,92 – 9,47]	8,93 [8,32 – 9,54]	U de Mann-Whitney p = 0,671
Sexo	M = 18 (48,7) [33,5 – 64,1]	M = 16 (51,6) [34,8 – 68,0]	χ^2 p = 0,808 Fisher p = 1
	F = 19 (51,4) [35,9 – 66,6]	F = 15 (48,4) [32,0 – 65,2]	
Clase social	A = 13 (35,1) [21,8 – 51,2]	A = 7 (22,6) [11,4 – 40,0]	χ^2 p = 0,257
	B = 17 (45,9) [31,0 – 61,6]	B = 13 (41,9) [26,4 – 59,2]	
	C = 7 (18,9) [9,5 – 34,2]	C = 11 (35,5) [21,1 – 53,1]	

Sexo: M (Masculino), F (Femenino). Clase social: A (códigos I y II), B (códigos III y IVa) y C (códigos IVb, V y VI).

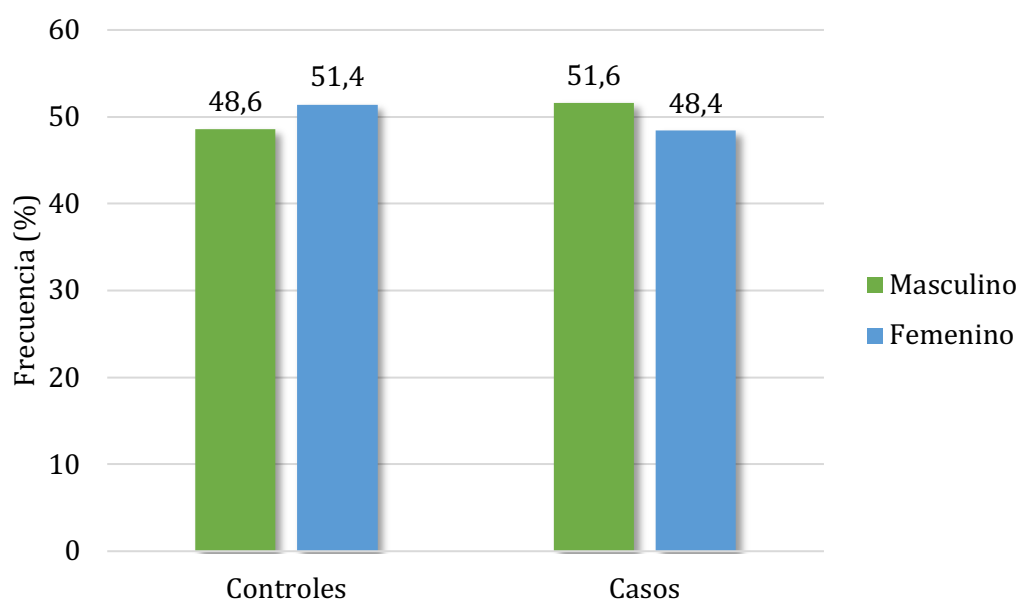


Figura 17. Distribución porcentual de sexo según casos y controles.

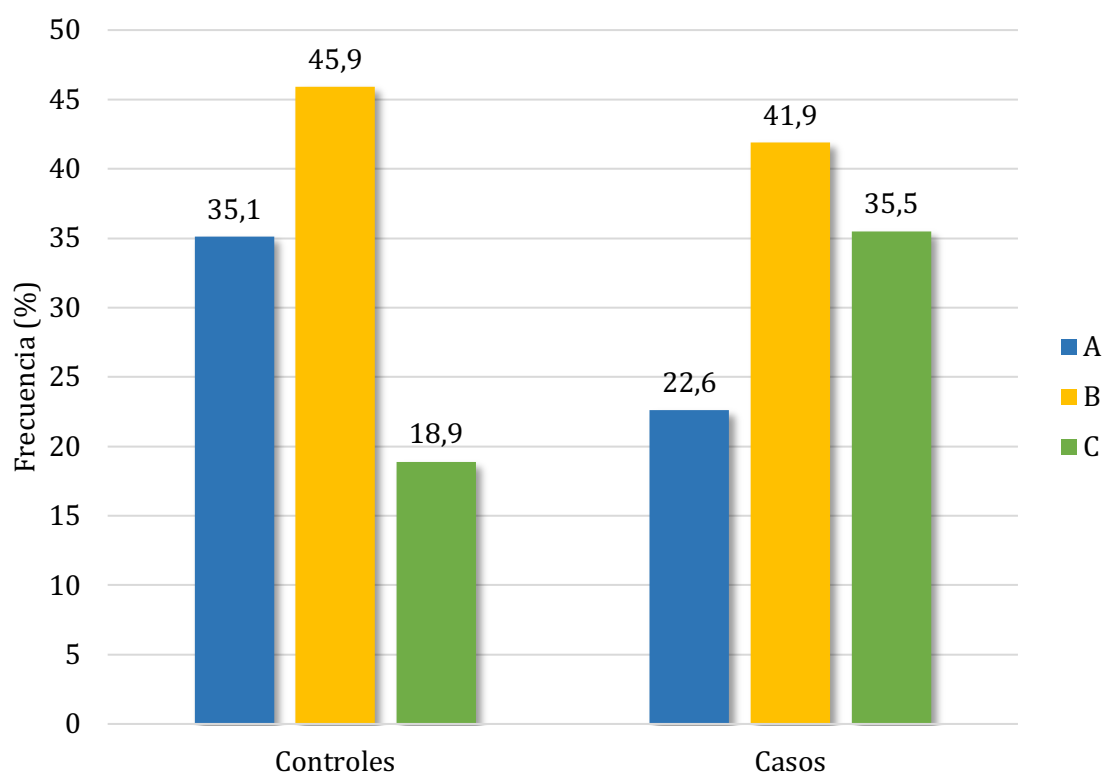


Figura 18. Distribución porcentual de la clase social según casos y controles.
Clase social: A (códigos I y II), B (códigos III y IVa) y C (códigos IVb, V y VI).

Análisis de diagnóstico de caries

Criterio de caries ICDAS

En correspondencia con el uso de la clasificación de caries ICDAS, se puede observar en las tablas 3 y 4 la media de los códigos tanto para dentición permanente como para dentición temporal según casos y controles. Asimismo, se presentan las medias de dientes y superficies ausentes y obturadas para ambas denticiones.

Tabla 3. Análisis de códigos de caries ICDAS por superficie y dentición permanente, como también la media de dientes y superficies ausentes y obturadas por caries.

	CAOD		CAOS	
	CONTROL Media [IC-95%]	CASO Media [IC-95%]	CONTROL Media [IC-95%]	CASO Media [IC-95%]
Código 1	0,30 [0,05 – 0,54]	0,52 [0,22 – 0,81]	0,38 [0,08 – 0,68]	0,97 [0,46 – 1,47]
Código 2	0,27 [0,04 – 0,50]	0,87 [0,33 – 1,41]	0,38 [0,07 – 0,69]	1,35 [0,53 – 2,17]
Código 3	-	0,45 [0,17 – 0,73]	-	0,58 [0,22 – 0,94]
Código 4	-	-	-	-
Código 5	-	0,29 [0,02 – 0,56]	-	0,32 [0,00 – 0,64]
Código 6	-	0,06 [0 – 0,20]	-	0,13 [0 – 0,39]
Ausentes	-	0,13 [0 – 0,31]	-	0,64 [0 – 1,56]
Obturados	0,11 [0 – 0,24]	0,19 [0,05 – 0,34]	0,30 [0 – 0,63]	0,32 [0,10 – 0,54]

Tabla 4. Análisis de códigos de caries ICDAS por superficie y dentición temporal, como también la media de dientes y superficies ausentes y obturadas por caries.

	cod		cos	
	CONTROL Media [IC-95%]	CASO Media [IC-95%]	CONTROL Media [IC-95%]	CASO Media [IC-95%]
Código B	0,43 [0,16 – 0,70]	0,39 [0,12 – 0,65]	0,46 [0,19 – 0,73]	0,68 [0,30 – 1,05]
Código C	0,40 [0,16 – 0,65]	1,10 [0,67 – 1,52]	0,51 [0,16 – 0,86]	1,97 [1,16 – 2,77]
Código D	-	0,70 [0,32 – 1,10]	-	1,03 [0,49 – 1,57]
Código E	-	0,80 [0,35 – 1,26]	-	0,97 [0,39 – 1,54]
Código F	-	0,65 [0,22 – 1,07]	-	1,06 [0,30 – 1,83]
Código G	-	0,19 [0 – 0,39]	-	0,48 [0 – 1,01]
Obturadas	0,19 [0 – 0,44]	0,48 [0,07 – 0,90]	0,35 [0 – 0,78]	1,13 [0,16 – 2,09]

Análisis de índices de caries

A raíz de los resultados anteriores, se han obtenido los siguientes cálculos de los índices epidemiológicos utilizados por la OMS. Se observa en la tabla 5 la media de los índices CAOD y CAOS para dentición permanente y los índices cod y cos para la dentición temporal, según casos y controles. Se utilizó como criterio de corte para el cálculo del componente C/c los códigos ICDAS 3-6/D-G.

Tabla 5. Análisis de indicadores de caries.

	CONTROLES Media [IC-95%]	CASOS Media [IC-95%]	Test
CAOS	0,30 [0 – 0,63]	2,0 [0,88 – 3,12]	U de Mann-Whitney p = < 0,001*
cos	0,35 [0 – 0,78]	4,68 [3,14 – 6,22]	U de Mann-Whitney p = < 0,001*
CAOD	0,11 [0 – 0,24]	1,13 [0,67 – 1,59]	U de Mann-Whitney p = < 0,001*
cod	0,19 [0 – 0,44]	2,84 [2,04 – 3,64]	U de Mann-Whitney p = < 0,001*
Criterio de corte código ICDAS 3-6/D-G			

Necesidad de tratamiento

En cuanto a la necesidad de tratamiento se observa en la figura 19 una diferencia entre los casos y controles. En los controles un 45,9% no requieren de tratamiento, un 45,9% demandan un tratamiento preventivo o de rutina y tan solo el 8,1% necesitan algún tratamiento inmediato. Por el contrario, en los casos el 100% requiere tratamiento, de los cuales un 32,3% corresponde a un tratamiento preventivo o de rutina, un 51,6% a tratamiento inmediato y un 16,1% a tratamiento urgente debido a infección o dolor dental. Las cifras expuestas en la tabla 6, correspondientes a la necesidad de tratamiento, expresan que existe una diferencia significativa entre los casos y controles con un χ^2 p-valor = 0,000.

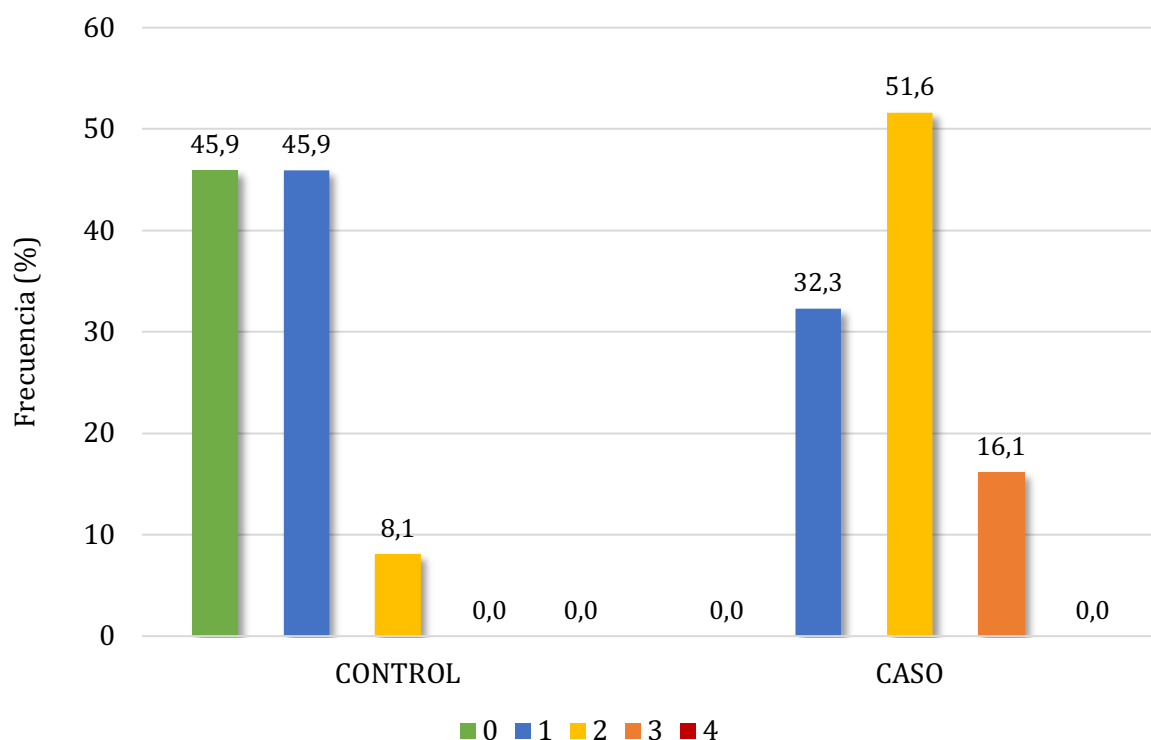


Figura 19. Descriptiva de necesidad de tratamiento por caso y control.

Códigos: 0 (Sin necesidad de tratamiento); 1 (Necesidad de tratamiento preventivo o de rutina); 2 (Necesidad de tratamiento inmediato, incluido raspado); 3 (Necesidad de tratamiento inmediato (urgente) debido a dolor o infección de origen dental y/o bucal); 4 (Remitido para una evaluación completa o a un tratamiento médico/dental (condición sistémica)).

Tabla 6. Descriptiva de necesidad de tratamiento por casos y controles.

Necesidad de tratamiento	CONTROLES n (%) / [IC-95%]	CASOS n (%) / [IC-95%]	Test
0	17 (46) [31 – 61,6]	-	χ^2 p = 0,000*
1	17 (46) [31 – 61,6]	10 (32,3) [18,5 – 49,9]	
2	3 (8,1) [2,8 – 21,3]	16 (51,6) [34,8 – 68]	
3	-	5 (16,1) [7,1 – 32,6]	
4	-	-	

0= Sin necesidad de tratamiento; 1= Necesidad de tratamiento preventivo o de rutina; 2= Necesidad de tratamiento inmediato, incluido raspado; 3= Necesidad de tratamiento inmediato (urgente) de debido a dolor o infección de origen dental y/o bucal; 4= Remitido para una evaluación completa o un tratamiento médico/dental (condición sistémica). * p-valor significativo < 0,05.

Índice Periodontal Comunitario

La media del IPC en el total de participantes fue de 0,16 con un intervalo de confianza al 95% de 0,11 y 0,21. Asimismo, la media del número de sextantes con sangrado ha sido de 0,97 con un intervalo de confianza al 95% entre 0,66 y 1,28. Por el contrario, el número de sextantes sanos resultó una media de 5,03 con un intervalo de confianza de 95% entre 4,72 y 5,34. Ahora bien, como se observa en la tabla 7 la media del IPC de los controles fue de 0,12 y de los casos 0,21. La media del número de sextantes sanos en los controles ha sido de 5,27 y en los casos 4,74. Por último, la media del número de sextantes con sangrado en los controles resultó 0,73 contra los 1,26 de los casos. En las tres variables descritas se registraron diferencias significativas (*U de Mann-Whitney* p-valor = 0,047).

Tabla 7. Descriptiva de la media del IPC, N.º de sextantes con sangrado y N.º de sextantes sanos.

	Muestra Media [IC-95%]	CONTROLES Media [IC-95%]	CASOS Media [IC-95%]	Test
IPC	0,16 [0,11 - 0,21]	0,12 [0,05 - 0,19]	0,21 [0,13 - 0,29]	U de Mann-Whitney p = 0,047
N.º de sextantes con sangrado	0,97 [0,66 - 1,28]	0,73 [0,32 - 1,13]	1,26 [0,77 - 1,75]	U de Mann-Whitney p = 0,047
N.º de sextantes sanos	5,03 [4,72 - 5,34]	5,27 [4,86 - 5,68]	4,74 [4,25 - 5,23]	U de Mann-Whitney p = 0,047

* p-valor significativo < 0,05

La distribución porcentual según el grado del IPC por sextante explorado se encuentra representada en la figura 20. Se destaca una mayor frecuencia de sangrado en los dientes índices 3.6, 2.6 y 4.6 con un 23,5%, 22,1% y 19,1%, respectivamente.

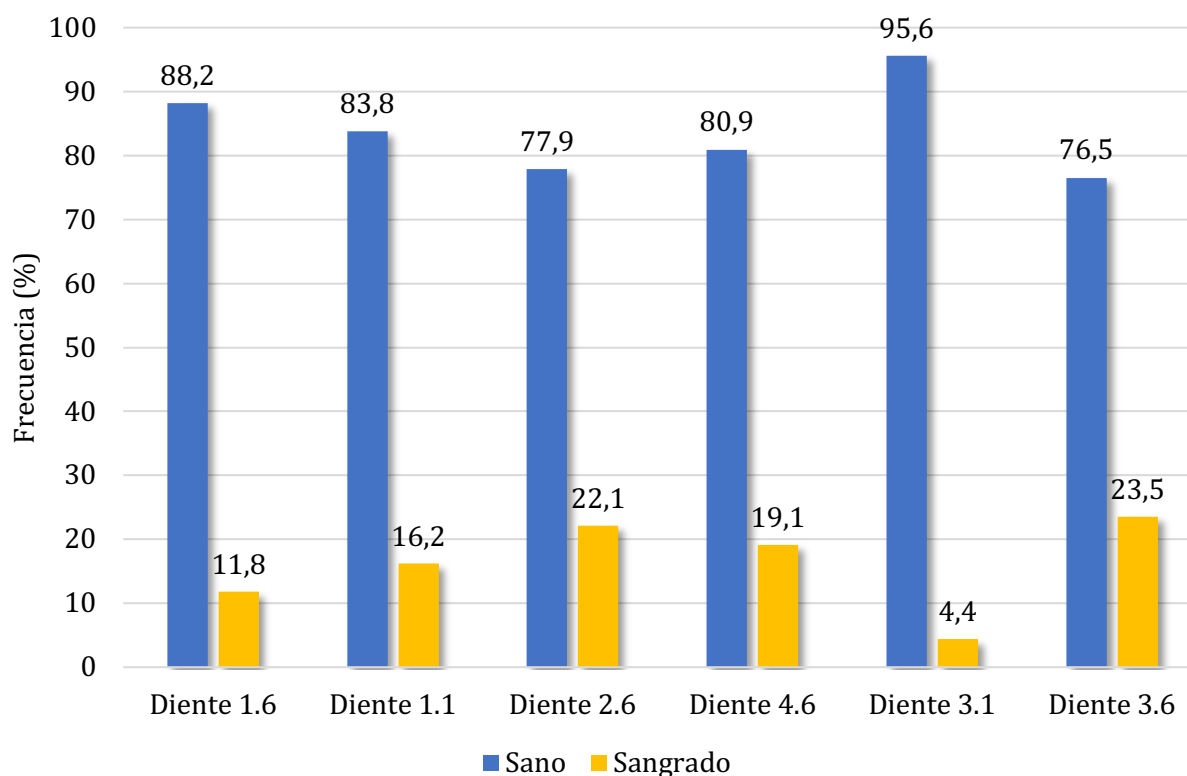


Figura 20. Distribución porcentual por grado del IPC del total de la muestra.

Referente a la prevalencia de sangrado entre los casos y controles, no se registra una diferencia estadísticamente significativa, test χ^2 p-valor = 0,054 (Tabla 8). No obstante, sí se destaca una marcada desigualdad en sus porcentajes, alcanzando los casos una prevalencia del 61,3 % frente a un 37,8 % de los controles (figura 21).

Tabla 8. Prevalencia de sangrado en casos y controles en relación con el IPC.

	CONTROLES n (%) / [IC-95%]	CASOS n (%) / [IC-95%]	Test
Sano	23 (62,2) [46,1 – 75,9]	12 (38,7) [23,7 – 56,2]	χ^2 p = 0,054
Sangrado	14 (37,8) [24,1 – 53,9]	19 (61,3) [43,8 – 76,2]	

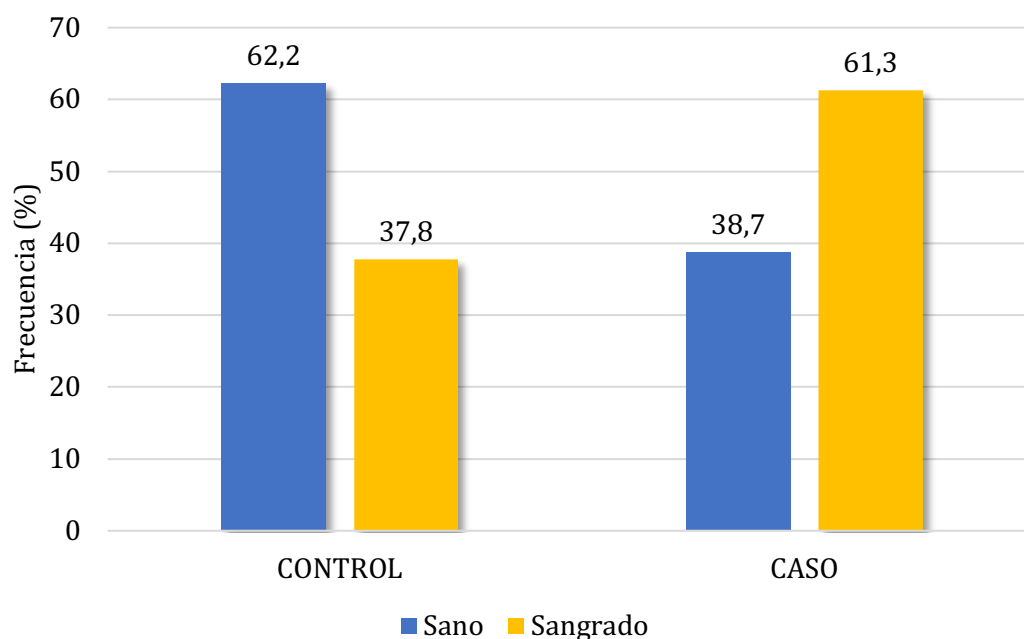


Figura 21. Prevalencia de sangrado de casos y controles.

Lesiones de mucosa oral

En relación con las lesiones de mucosa oral observadas, se contabilizaron 4 en el total de la muestra, correspondiente a un 5,9%. Una de las lesiones clasificada como ulcera se halló en el grupo de control. En el grupo de casos se localizaron dos lesiones de tipo absceso y una lesión registrada como otras condiciones. Respecto a la localización de las lesiones, dos se encontraron a nivel de la mucosa bucal, una en paladar y otra en el reborde gingival. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre casos y controles.

Fluorosis

El número de los participantes que presentaban algún grado de fluorosis fue de 3 individuos (4,4% del total de la muestra), clasificándose dos pacientes como «Discutible» (2,9%) y uno como «Moderada» (1,5%). Respecto a la cifra anterior, los

controles pertenecían al grupo clasificado como «Discutible» y el caso como «Moderada». El resultado de la prueba comparativa de χ^2 tuvo un p-valor = 0,237.

Trauma dental

Referente al trauma dental, los casos y controles se encontraban libres de lesiones en un 87,1% y 91,9%, respectivamente. La lesión con mayor prevalencia en ambos grupos fue la fractura de esmalte con un 7,4%. Referente al número de dientes involucrados por el trauma ocasionado las cifras son un 7,4% para aquellos traumas que solo se vio implicado un diente y un 2,9% en los episodios con dos dientes comprometidos. Al análisis estadístico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupo de casos y controles, obteniendo un χ^2 p-valor = 0,477.

Hipomineralización incisivo molar (MIH) e Hipomineralización en segundos molares temporales (HSPM)

Los resultados de la frecuencia de distribución de MIH y HSPM, conforme al estado de erupción, el estado clínico y de extensión de la lesión en los dientes índices, se ven reflejados en las tablas 9 y 10. Cabe mencionar, que los dientes más afectados con algún grado de MIH fueron los dientes 1.6 y 2.6, con un 33,8% y 26,8%, respectivamente.

Tabla 9. Frecuencia del estado de erupción, estado clínico y de extensión de la lesión, de los dientes índices según la clasificación de MIH otorgada por la EAPD.

	16 n(%)	55 n (%)	12 n (%)	11 n (%)	21 n (%)	22 n (%)	65 n (%)	26 n (%)
0	38 (55,9)	44 (64,7)	43 (63,2)	41 (60,3)	39 (57,4)	44 (64,7)	45 (66,2)	42 (61,8)
1	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	4 (5,9)	6 (8,8)	1 (1,5)	1 (1,5)	2 (2,9)
2I	17 (25)	9 (13,2)	3 (4,4)	10 (14,7)	11 (16,2)	4 (5,9)	10 (14,7)	15 (22,1)
2II	-	-	-	-	-	-	-	1 (1,5)
2III	-	-	-	-	-	-	-	-
3I	2 (2,9)	-	-	-	-	-	-	-
3II	-	1 (1,5)	-	-	-	-	-	1 (1,5)
3III	3 (4,4)	-	-	-	-	-	-	-
4I	-	-	-	-	-	-	-	-
4II	-	-	-	-	-	-	1 (1,5)	-
4III	-	-	-	-	-	-	-	-
5I	1 (1,5)	-	-	-	-	-	-	1 (1,5)
5II	-	-	-	-	-	-	-	-
5III	-	-	-	-	-	-	-	-
6III	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	1 (1,5)	-
A	5 (7,4)	12 (17,6)	20 (29,4)	13 (19,1)	12 (17,6)	19 (27,9)	10 (14,7)	6 (8,8)

Tabla 10. Frecuencia del estado de erupción, estado clínico y de extensión de la lesión, de los dientes índices según la clasificación de MIH otorgada por la EAPD.

	46 n (%)	85 n (%)	42 n (%)	41 n (%)	31 n (%)	32 n (%)	75 n (%)	36 n (%)
0	46 (67,6)	48 (70,6)	51 (75)	59 (86,8)	59 (86,8)	52 (76,5)	48 (70,6)	44 (64,7)
1	3 (4,4)	-	-	-	-	1 (1,5)	-	1 (1,5)
2I	10 (14,7)	3 (4,4)	2 (2,9)	4 (5,9)	-	1 (1,5)	5 (7,4)	12 (17,6)
2II	-	-	-	-	-	-	-	1 (1,5)
2III	-	-	-	-	-	-	-	-
3I	-	-	-	-	1 (1,5)	-	-	-
3II	1 (1,5)	-	-	-	-	-	-	2 (2,9)
3III	-	-	-	-	-	-	-	-
4I	-	1 (1,5)	-	-	-	-	-	-
4II	1 (1,5)	-	-	-	-	-	-	-
4III	-	-	-	-	-	-	-	-
5I	-	-	-	-	-	-	-	-
5II	-	1 (1,5)	-	-	-	-	-	-
5III	-	-	-	-	-	-	-	-
6III	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1 (1,5)	1 (1,5)	-	-	-	-	-	1 (1,5)
A	6 (8,8)	14 (20,6)	15 (22,1)	5 (7,4)	8 (11,8)	14 (20,6)	15 (22,1)	7 (10,3)

MIH en correspondencia con el grado de afectación

De acuerdo con el grado de afectación de MIH utilizado en el presente estudio -sano, leve o severo- los porcentajes de los controles fueron 24,3% leve, 8,1% severo y sano el porcentaje restante (67,6%); en los casos el 29% eran clasificados como leve, un 22,6% severo y el 48,4% sanos. Al análisis comparativo de χ^2 el p-valor fue 0,165, por lo tanto, no se observa una diferencia significativa entre los casos y controles. En la tabla 11 y figura 22 se representa el resumen de las cifras mencionadas.

Tabla 11. Descriptiva de la muestra caso y control según criterio de afectación de MIH.

MIH	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	Test
Sano	25 (67,6)	15 (48,4)	χ^2 p = 0,165
Leve	9 (24,3)	9 (29)	
Severo	3 (8,1)	7 (22,6)	

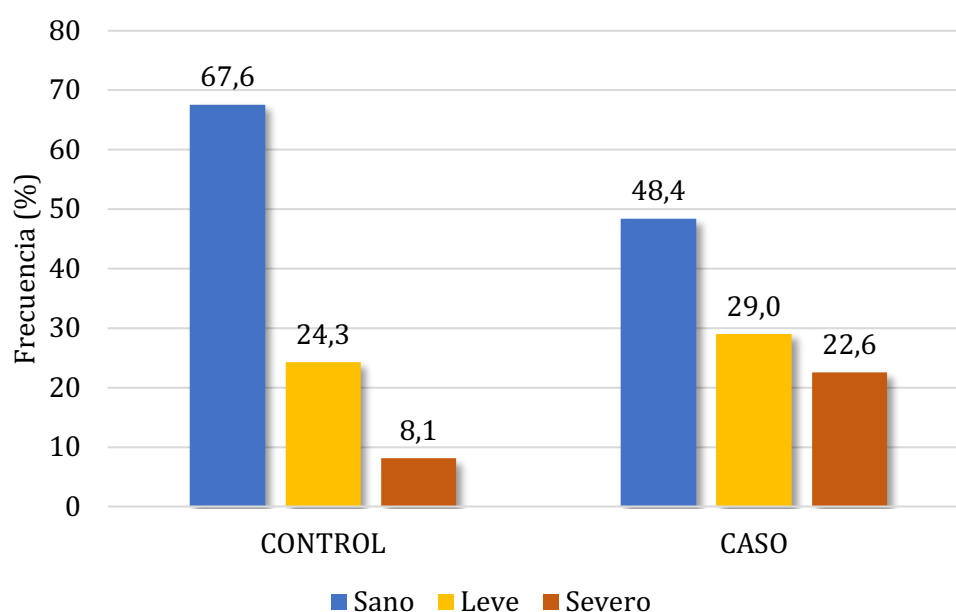


Figura 22. Distribución porcentual de casos y controles según criterio de afectación de MIH.

HSPM en correspondencia con el grado de afectación

En relación con el grado de afectación de HSPM los resultados para los controles fueron un 83,8% sanos, 16,2% leve y no se presentaron individuos con lesiones severas. Por el contrario, en los casos el 64,5% eran clasificados como sanos, un 29% leve y un 6,5% con afectación severa. Al análisis comparativo de χ^2 el p-valor = 0,107, sin observarse una diferencia significativa entre los casos y controles. En la tabla 12 y figura 23 se representan en resumen las cifras mencionadas.

Tabla 12.Descriptiva de la muestra caso y control de acuerdo con el criterio de afectación de HSPM.

HSPM	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	Test
Sano	31 (83,8)	20 (64,5)	χ^2 p = 0,107
Leve	6 (16,2)	9 (29)	
Severo	-	2 (6,5)	

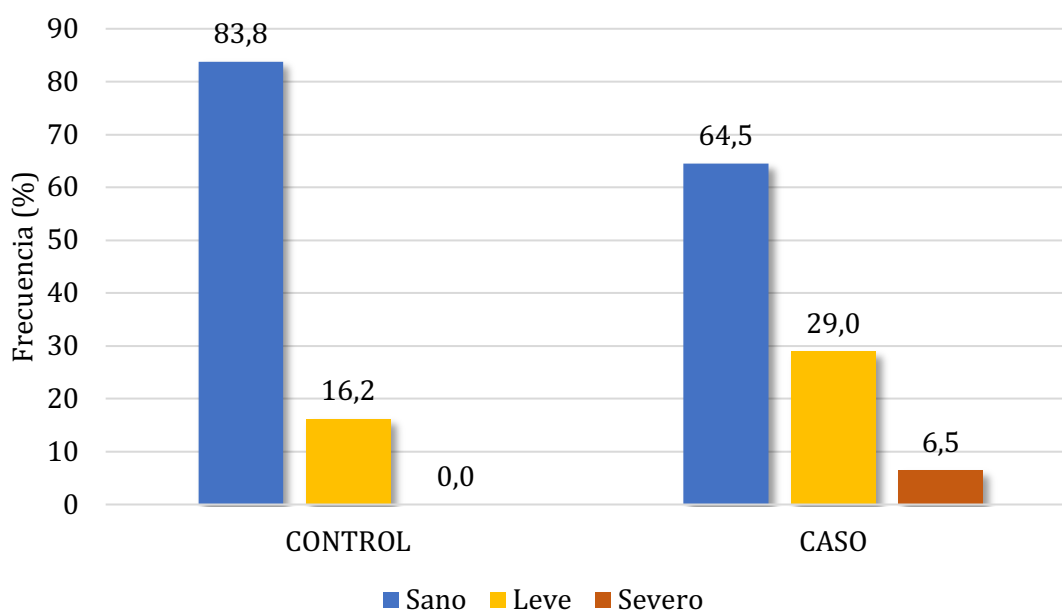


Figura 23. Distribución porcentual de casos y controles según criterio de afectación de HSPM.

Cuestionario de Salud

El número total de cuestionarios de salud autocumplimentados por los padres y/o cuidadores fue del 100 % de los participantes. Las respuestas obtenidas se exponen a continuación.

En correspondencia con la primera pregunta del cuestionario, se observa una diferencia significativa de la percepción de los padres y/o cuidadores relacionado con la salud de los dientes entre los casos y controles (χ^2 p-valor = 0,000). No obstante, frente la misma pregunta, pero correspondiente a la salud de la encía, no se encontraron valores diferentes entre ambos grupos (Tabla 13).

Tabla 13. Pregunta N.º 1 ¿Cómo describirías la salud de los dientes y encías de tu hijo/a?

	Diente		Encía	
	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)
Excelente	3 (8,1)	-	5 (13,5)	1 (3,2)
Muy buena	13 (35,1)	1 (3,2)	11 (29,7)	5 (16,1)
Buena	16 (43,2)	8 (25,8)	17 (45,9)	14 (45,2)
Promedio	4 (10,8)	11 (35,5)	3 (8,1)	7 (22,6)
Pobre	-	5 (16,1)	1 (2,7)	3 (9,7)
Muy pobre	-	5 (16,1)	-	-
No lo sé	1 (2,7)	1 (3,2)	-	1 (3,2)
Test	χ^2 p = 0,000*		χ^2 p = 0,138	

* p-valor significativo < 0,05.

Los resultados de la segunda pregunta del anexo II se presentan en la tabla 14. Se señala una mayor frecuencia de dolor frecuente u ocasional en el último año por parte del grupo de casos (35,5%) versus los controles (5,4%). Conforme a lo anterior, se presenta una diferencia estadísticamente significativa con un χ^2 p-valor= 0,016.

Tabla 14. Pregunta N.º 2 ¿Con qué frecuencia durante los últimos 12 meses tu hijo/a tuvo dolor de muelas o se sintió incómodo con sus dientes?

	CONTROLES n (%)	CASOS n(%)	Test
Frecuentemente	-	2 (6,5)	χ^2 p = 0,016*
Ocasionalmente	2 (5,4)	9 (29)	
Raramente	13 (35,1)	6 (19,4)	
Nunca	22 (59,5)	14 (45,2)	
No lo sé	-	-	

* p-valor significativo < 0,05.

Se destaca una mayor frecuencia de asistencia al dentista por parte de los casos, un 39% visita tres o más veces al año, frente a los controles, un 10,8%. Sin embargo, al analizar por grupos no se observa una diferencia significativa en cuanto a la frecuencia de visitas al dentista en los últimos 12 meses entre los casos y controles (Tabla 15).

Tabla 15. Pregunta N.º 3. ¿Con qué frecuencia fue tu hijo/a al dentista durante los últimos 12 meses?

	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	Test
Una vez	15 (40,5)	10 (32,3)	χ^2 p = 0,103
Dos veces	12 (32,4)	3 (9,7)	
Tres veces	3 (8,1)	7 (22,6)	
Cuatro veces	-	2 (6,5)	
Más de cuatro veces	1 (2,7)	3 (9,7)	
No ha visitado al dentista en los últimos 12 meses	5 (13,5)	5 (16,1)	
Nunca ha recibido atención dental / Visitado al Dentista	1 (2,7)	1 (3,2)	
No lo sé / No lo recuerdo	-	-	

Los resultados de la pregunta 4 expresan el motivo por el cual el paciente asistió al dentista en los últimos doce meses. Se refleja una gran diferencia en el porcentaje de casos que asisten por razones de dolor o tratamiento dental (41,9%) versus los controles (5,4%). Por el contrario, los controles asisten a revisión un 75,7%, mientras que los casos un 38,7%. En consecuencia, se evidencia una diferencia significativa entre los grupos con un χ^2 p-valor = 0,002 (figura 24).

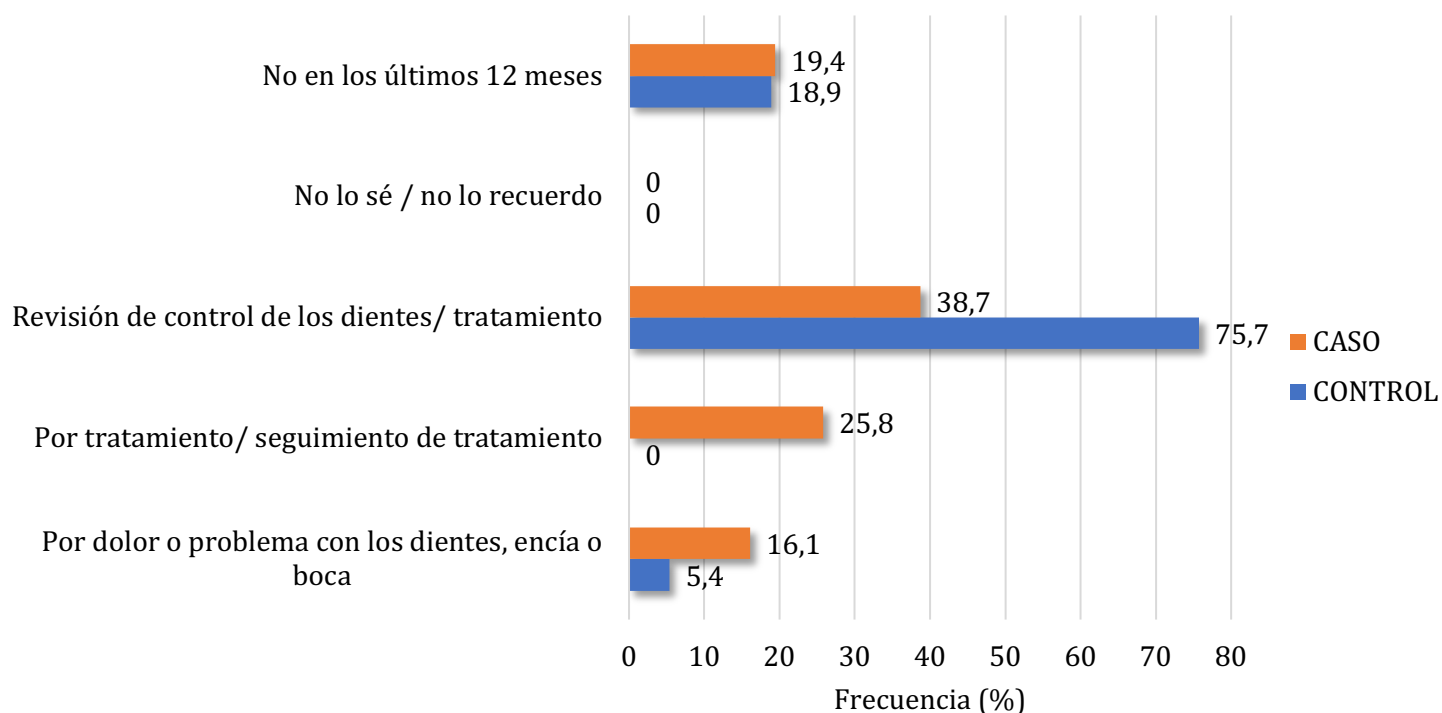


Figura 24. Distribución porcentual pregunta N.º 4. ¿Cuál fue la razón de la última visita al dentista de tu hijo/a?

En relación con hábitos de cepillados, los resultados muestran que aproximadamente el 64,7% del total de la muestra se cepilla dos o más veces al día. Ahora bien, en cuanto a la distribución de la frecuencia de cepillado entre casos y controles, no se observan grandes diferencias (Tabla 16).

Tabla 16. Pregunta N.º 5. ¿qué tan frecuente se lava los dientes tu hijo/a?

	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	Test
Nunca	1 (2,7)	1 (3,2)	χ^2 p = 0,519
Varias veces al mes	3 (8,1)	1 (3,2)	
Una vez a la semana	-	-	
Varias veces a la semana	1 (2,7)	3 (9,7)	
Una vez al día	6 (16,2)	8 (25,8)	
2 o más veces al día	26 (70,3)	18 (58,1)	

Referente a los auxiliares higiénicos, el cepillo de dientes es el más utilizado, tanto en el grupo control como en los casos, con cifras del 100% y 96,8%, respectivamente. Por el contrario, la seda dental es menos empleada y solo un 16,2%

de los controles y 9,7% de los casos hace uso de ella. La prueba comparativa no mostró diferencias significativas en ambos tipos de ayudantes higiénicos (Tabla 17).

Tabla 17. Pregunta N.º 6. ¿Utiliza tu hijo/a alguno de los siguientes para realizar su limpieza dental o de encías?

	CEPILLO		HILO DENTAL	
	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)
Sí	37 (100)	30 (96,8)	6 (16,2%)	3 (9,7)
No	-	1 (3,2)	31 (83,8)	28 (90,3)
Test	χ^2 p = 0,271		χ^2 p = 0,428	

En esa misma línea, cuando se preguntó si existía otro elemento de higiene oral un 10,8% de los controles y un 6,4% de los casos respondieron que hacían uso de colutorio o enjuague bucal, un 2,7% de los controles y un 3,2% de los casos utilizaban irrigador bucal y un 6,5% de los casos ocupaban reveladores de placa. El porcentaje restante de ambos grupos no respondieron la pregunta (figura 25).

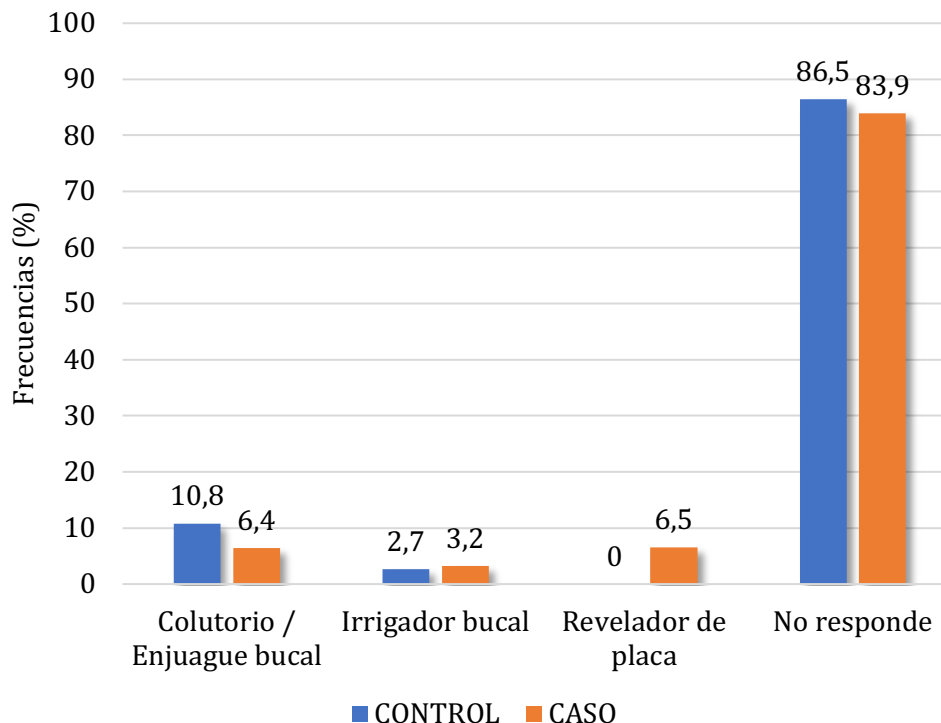


Figura 25. Distribución porcentual de otros elementos auxiliares de higiene oral.

Continuando con los hábitos de higiene oral y el uso de auxiliares de limpieza, nuestros resultados señalan que los casos y controles usan pasta dental para lavarse los dientes en un 96,8% y un 100%, respectivamente. Ahora bien, al preguntar si la pasta dental utilizada contenía flúor, las respuestas de ambos grupos, como se expone en la tabla 18, fueron similares. Ambas preguntas no señalan diferencias significativas a la prueba comparativa de chi cuadrado.

Tabla 18. Pregunta N.º7. ¿Usa pasta de dientes para lavarse los dientes?/¿Utiliza pasta dental que contenga flúor?

	CONTROLES n (%)			CASOS n (%)		
	Sí	No	No lo sé	Sí	No	No lo sé
Usa pasta de dientes para lavarse los dientes	37 (100)	-	-	30 (96,8)	1 (3,2)	-
Test	χ^2 p = 0,271					
Utiliza pasta dental que contenga flúor	28 (75,7)	3 (8,1)	6 (16,2)	24 (77,4)	1 (3,2)	6 (19,4)
Test	χ^2 p = 0,676					

De acuerdo con las preguntas sobre problemas de salud oral experimentados en el último año, se logra observar que existe una diferencia porcentual entre los grupos en aquellos enunciados referentes a dolor y dificultades a la masticación. Un 9,7% de los casos revelan dolor de muelas de origen dental que los ha obligado a faltar al colegio, versus los controles que no expresan ningún porcentaje. Asimismo, un 16,1% de los casos presentan dificultades para masticar comidas duras frente al 5,4% de los controles. Adicionalmente, se observa en relación con la variable denominada «calidad de vida», que el grupo control alcanzó una media de 0,16 y el grupo de casos de 0,55; test *U* de *Mann-Whitney* un p-valor = 0,048, manifestando una diferencia significativa en cuanto a la calidad de vida relacionada con la salud oral entre los casos y controles (Tabla 19).

Tabla 19. Pregunta N.º 8. Debido al estado de los dientes y boca, ¿su hijo/a ha experimentado alguno de siguientes problemas durante el último año?

	CONTROLES			CASOS		
	n (%) / Media [IC-95%]			n (%) / Media [IC-95%]		
	Sí	No	No lo sé	Sí	No	No lo sé
No está satisfecho con la apariencia de sus dientes	3 (8,1)	34 (91,9)	-	5 (16,1)	24 (77,4)	2 (6,5)
Test	χ^2 p = 0,155					
Frecuentemente evita sonreír y reír a causa de sus dientes	-	36 (97,3)	1 (2,7)	-	31 (100)	-
Test	χ^2 p = 0,356					
Otros niños/as se burlan de él/ella por sus dientes	-	36 (97,3)	1 (2,7)	1 (3,2)	30 (96,8)	-
Test	χ^2 p = 0,362					
El dolor de muelas o las molestias causadas por los dientes lo/la obligaron a ...	-	37 (100)	-	3 (9,7)	28 (90,3)	-
Test	χ^2 p = 0,053					
Tiene dificultades para masticar comidas duras	2 (5,4)	34 (91,9)	1 (2,7)	5 (16,1)	24 (77,4)	2 (6,5)
Test	χ^2 p = 0,242					
Tiene dificultades en la masticación	1 (2,7)	36 (97,3)	-	3 (9,7)	26 (83,9)	2 (6,5)
Test	χ^2 p = 0,128					
Calidad de vida	0,16 [0,20 – 0,30]			0,55 [0,21 – 0,90]		
Test	U de Mann-Whitney p = 0,048					

El resumen de los resultados referentes a los hábitos de consumo de alimentos, por ejemplo de bebidas y comidas ricas en azúcares, se exponen en la tabla 20. Cabe mencionar que no se observaron diferencias significativas entre los casos y controles. No obstante, se distingue que los controles tienen una menor frecuencia de consumo de bebidas durante la semana que el grupo de casos, un 18,9% versus un 45,3%, respectivamente. De igual forma, la ingesta de leche con azúcar también manifiesta diferencias, en los casos un 41,9% refiere su consumo diario mientras que los controles tan solo un 21,6%.

Tabla 20. Pregunta N.º 9. ¿Con qué frecuencia come o bebe alguno de los siguientes alimentos, incluso en pequeñas cantidades?

	Grupo	Varias veces al día	Todos los días	Varias veces por semana	Una vez por semana	Varias veces al mes	Nunca	Test
Fruta fresca n (%)	CONTROL	11 (29,7)	12 (32,4)	10 (27)	1 (2,7)	1 (2,7)	2 (5,4)	χ^2 p = 0,415
	CASO	7 (22,6)	9 (29)	12 (38,7)	-	3 (9,7)	-	
Galletas, tartas, pasteles, bollos n (%)	CONTROL	4 (10,8)	5 (13,5)	21 (56,8)	4 (10,8)	2 (5,4)	1 (2,7)	χ^2 p = 0,579
	CASO	5 (16,1)	4 (12,9)	16 (51,6)	6 (19,4)	-	-	
Limonada, Coca-Cola, otras bebidas n (%)	CONTROL	2 (5,4)	2 (5,4)	1 (2,7)	2 (5,4)	16 (43,2)	14 (37,8)	χ^2 p = 0,072
	CASO	3 (9,7)	2 (6,5)	2 (6,5)	7 (22,6)	14 (45,2)	3 (9,7)	
Mermelada / Miel n (%)	CONTROL	-	1 (2,7)	4 (10,8)	4 (10,8)	7 (18,9)	21 (56,8)	χ^2 p = 0,656
	CASO	-	1 (3,2)	1 (3,2)	2 (6,5)	9 (29)	18 (58,1)	
Chicle con azúcar n (%)	CONTROL	-	1 (2,7)	2 (5,4)	3 (8,1)	9 (24,3)	22 (59,5)	χ^2 p = 0,646
	CASO	1 (3,2)	-	1 (3,2)	4 (12,9)	10 (32,3)	15 (48,4)	
Caramelos, chucherías, gominolas n (%)	CONTROL	1 (2,7)	1 (2,7)	5 (13,5)	5 (13,5)	22 (59,5)	3 (8,1)	χ^2 p = 0,691
	CASO	1 (3,2)	1 (3,2)	8 (25,8)	6 (19,4)	14 (45,2)	1 (3,2)	
Leche con azúcar n (%)	CONTROL	1 (2,7)	7 (18,9)	6 (16,2)	2 (5,4)	3 (8,1)	18 (48,6)	χ^2 p = 0,278
	CASO	1 (3,2)	12 (38,7)	1 (3,2)	3 (9,7)	3 (9,7)	11 (35,5)	
Té con azúcar n (%)	CONTROL	-	-	-	-	-	37 (100)	χ^2 p = 0,280
	CASO	-	1 (3,2)	1 (3,2)	1 (3,2)	1 (3,2)	27 (87,1)	
Café con azúcar n (%)	CONTROL	-	-	-	-	2 (5,4)	35 (94,6)	χ^2 p = 0,663
	CASO	-	-	-	-	1 (3,2)	30 (96,8)	

Relativo al consumo familiar de tabaco, los resultados muestran que tanto el padre (9,7%) como la madre (16,1%) de los casos fuman ≥ 10 cigarrillos al día que el padre (2,7%) y la madre (2,7%) de los controles. A pesar de ello, no se aprecia una diferencia significativa (Tabla 21). El grupo de los casos fue el único que afirmó que otro familiar conviviente fumaba, correspondiente a un 9,7%, del cual un 3,2% fuma menos de 10 cigarrillos al día y un 6,5% entre 10 y 20 cigarrillos al día.

Tabla 21. Pregunta N.º 10. ¿Con qué frecuencia fuman los familiares convivientes del niño/a?

	Padre		Madre	
	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)
No fuma	28 (75,7)	18 (58,1)	29 (78,4)	22 (71)
Menos de 10 al día	3 (8,1)	1 (3,2)	7 (18,9)	4 (12,9)
Entre 10-20 al día	1 (2,7)	3 (9,7)	1 (2,7)	4 (12,9)
Más de 20 al día	-	-	-	1 (3,2)
No convive	5 (13,5)	9 (29)	-	-
Test	χ^2 p = 0,185		χ^2 p = 0,253	

En cuanto a la pregunta sobre el nivel educacional de los padres, el número de respuestas obtenido varía respecto al total. Sobre la base del total de la muestra (n = 68), la pregunta relacionada con el nivel educacional del padre logró una tasa de respuesta del 91,2% y la de la madre un 97,1%. En consideración a lo anterior, podemos evidenciar que el padre y la madre de los individuos del grupo control presentan un mayor porcentaje de estudios universitarios (42,9% y 43,2%, respectivamente) frente al grupo de casos (29,6% y 27,6%). En la tabla 22 se reflejan los resultados en función de la cumplimentación de las preguntas N.º 11 y 12 del cuestionario de salud.

Tabla 22. Pregunta N.º 11 y 12. ¿Qué nivel de educación ha completado el padre/madre?

	Padre		Madre	
	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	CASOS n (%)
Escuela primaria completada	2 (5,7)	5 (18,5)	3 (8,1)	5 (17,2)
Escuela secundaria completada	9 (25,7)	5 (18,5)	7 (18,9)	7 (24,1)
Formación profesional	9 (25,7)	7 (25,9)	11 (29,7)	9 (31)
Estudios universitarios	15 (42,9)	8 (29,6)	16 (43,2)	8 (27,6)
No hay ningún adulto de género masculino/femenino en el hogar	-	2 (7,4)	-	-
Test	χ^2 p = 0,209		χ^2 p = 0,488	

Análisis metabólico

La adquisición de los espectros fue en el 100% de los participantes ($n = 68$). El total de señales o picos identificados en los espectros ha sido de 82 regiones metabólicas. La figura 26 representa el espectro de un caso y un control, en el cual se indican aquellos metabolitos con un p -valor $< 0,1$.

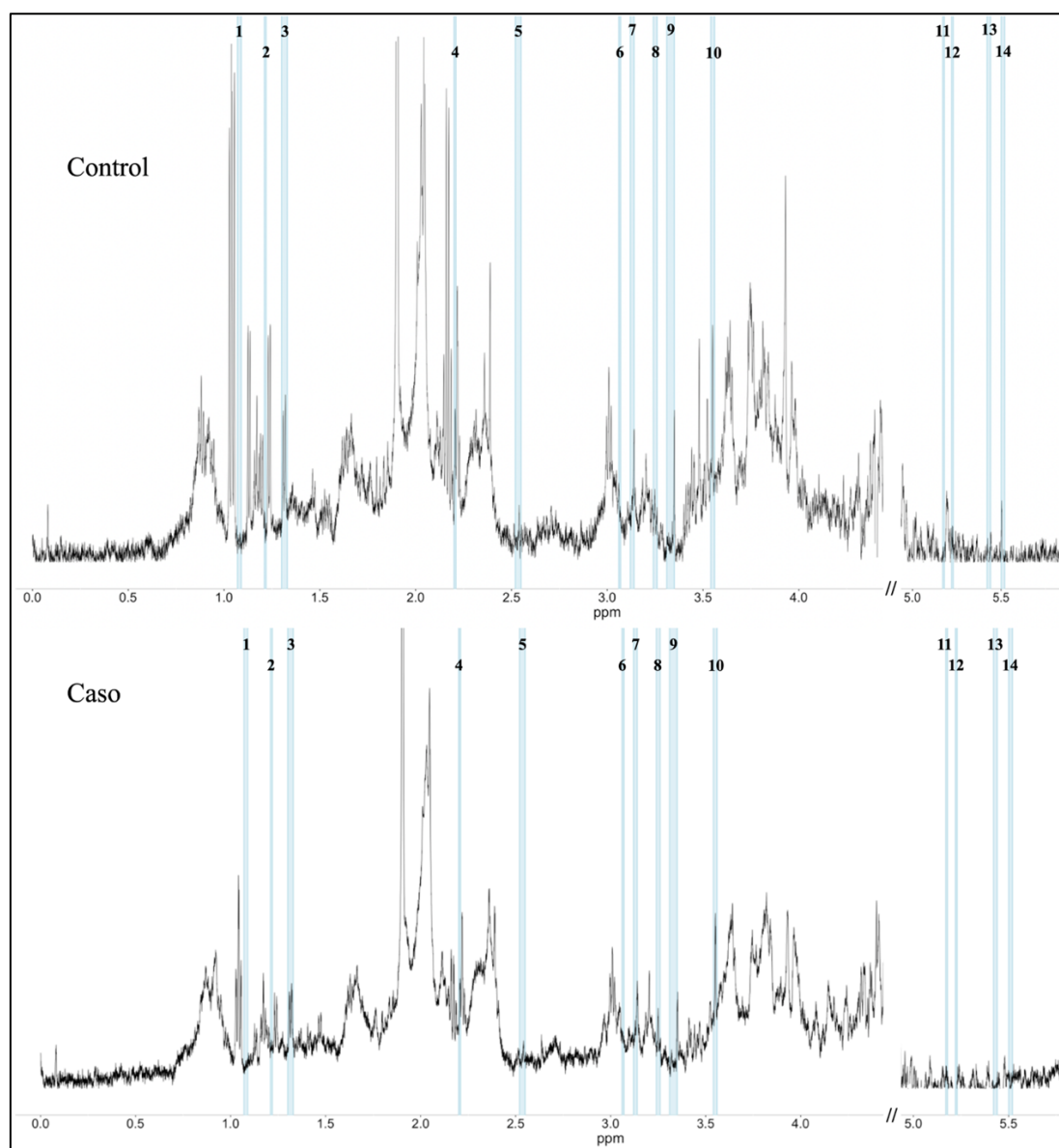


Figura 26. Representación del espectro de ^1H NMR de la saliva total de un control y caso. Se señalan las asignaciones de los metabolitos con p -valor < 0.1 ; 1. 3-metil-2-oxovalerato 2. 3-hidroxibutirato 3. Lactato 4. Acetona 5. Citrato 6. Ornitina 7. Etanolamina 8. Taurina 9. Prolina 10. Glicina 11. Manosa 12. Glucosa 13. 1-6-Anhidro- β -D-glucosa 14. Citraconato.

Análisis de componentes principales

La figura 27, correspondiente al gráfico T^2 de Hotelling del PCA, nos ayudó a la identificación de la presencia de una muestra *outlier* o atípica, la N.º 20, la cual se expresa con un contenido metabólico muy diferente tanto de su propio grupo como del conjunto del total de muestras.

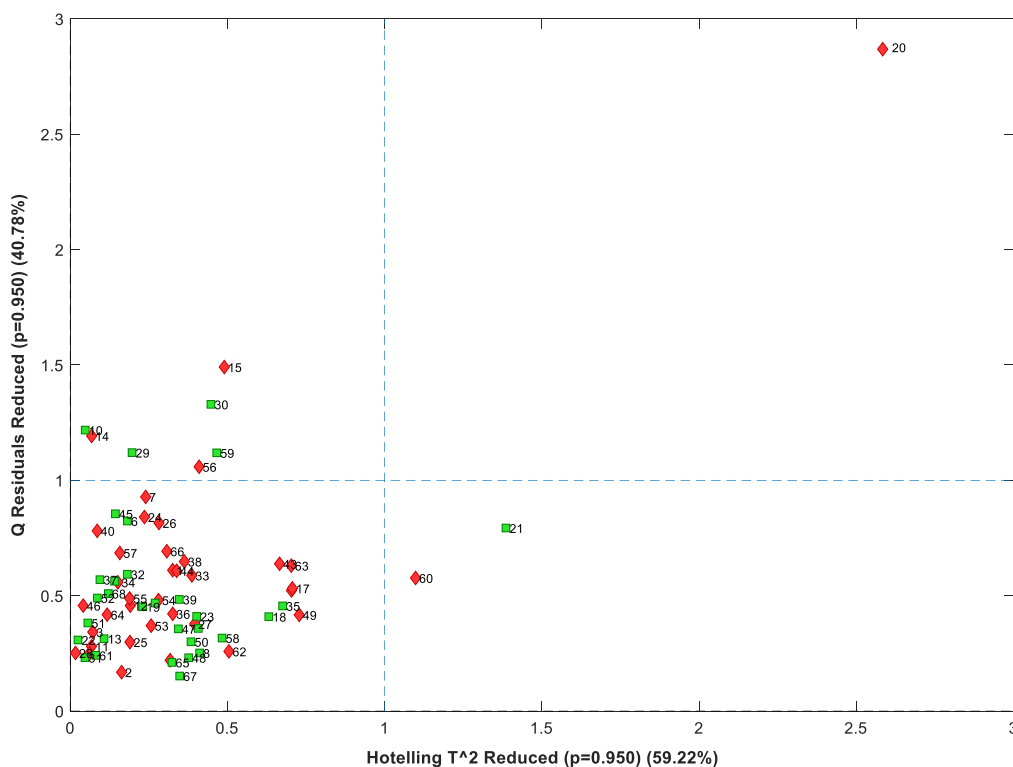


Figura 27. Gráfico T^2 de Hotelling/Residuals del PCA obtenido del total de las muestras. Los rombos de color rojo representan a los controles y los cuadrados de color verde a los casos.

Una vez excluida la muestra atípica se realizó nuevamente el PCA. La figura 28 corresponde al diagrama de cargas del análisis de componentes principales donde se puede observar que la distribución de las muestras no nos indica una clara separación entre los casos y controles.

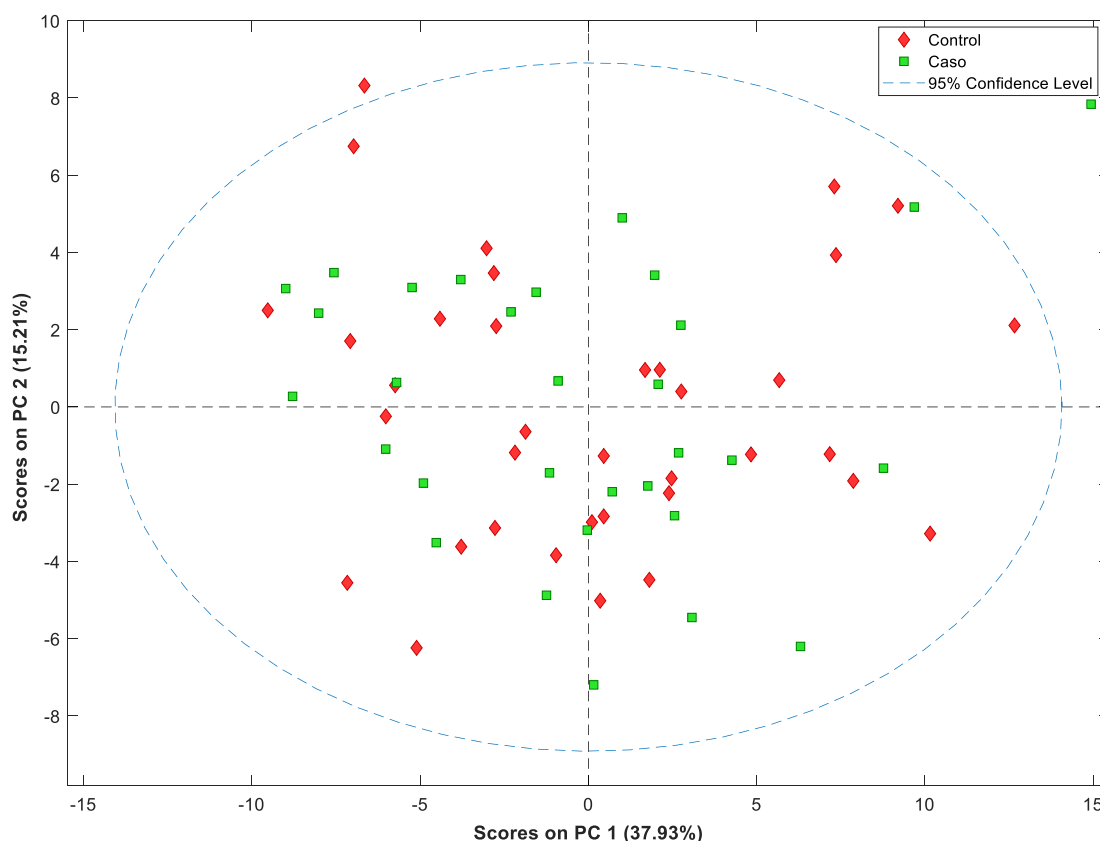


Figura 28. Diagrama de cargas del PCA del total de las muestras, excluida la muestra outlier. Los rombos de color rojo representan a los controles y los cuadrados verdes a los casos. La circunferencia que rodea a las muestras (---) denota un 95% del nivel de confianza. Los porcentajes de los ejes (X, Y) de la gráfica, que representan a los componentes principales (PC1 y PC2), expresan la porción de variabilidad que explica el modelo sobre el conjunto de datos.

Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales

Una vez realizado el análisis del PCA se continuó con la construcción del modelo supervisado PLS-DA, excluyendo la muestra identificada como atípica.

Se originó un modelo en base a los dos componentes o variables latentes (LV1 y LV2) que explican un 41,9% de la variabilidad total. El diagrama de puntuaciones proyecta una separación entre ambos grupos, con un leve solapamiento ubicado principalmente en la zona central (figura 29). Se percibe una agrupación de los pacientes controles en los cuadrantes izquierdos, destacándose en el cuadrante inferior, mientras que los casos se observan mayoritariamente en los cuadrantes derechos, predominando el cuadrante superior. Por consiguiente, podemos

interpretar que la primera variable latente (LV1) es la que produce una mayor separación entre los grupos.

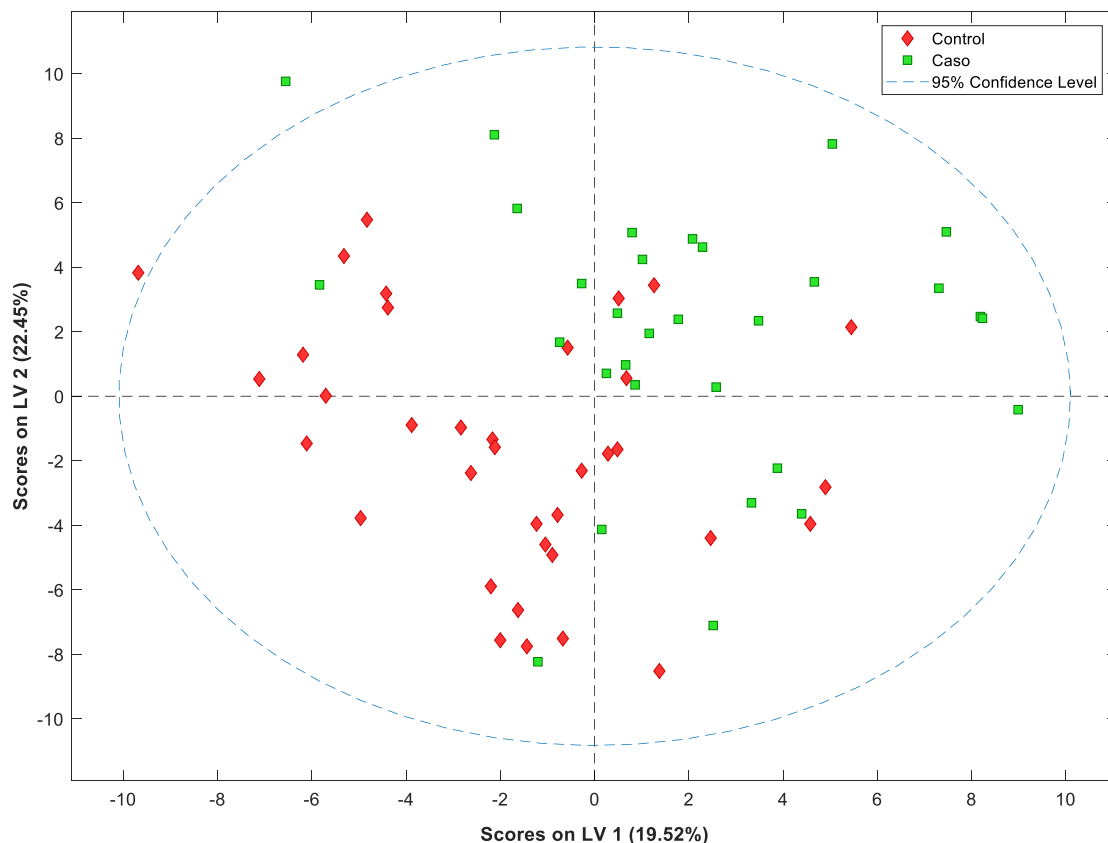


Figura 29. Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda variable latente (LV 1 y LV 2) del PLS-DA de las muestras de saliva analizadas. Los controles están representados de color rojo y con forma de rombo, y los casos de color verde con forma cuadrada. La circunferencia que rodea a las muestras (---) representa un 95% del nivel de confianza.

Los valores VIP identificados con puntuación mayor a 1 dentro del modelo PLS-DA son aquellos que se distinguen en la figura 30. Se destacan la glucosa, manosa y taurina como los tres metabolitos que más aportaban al modelo.

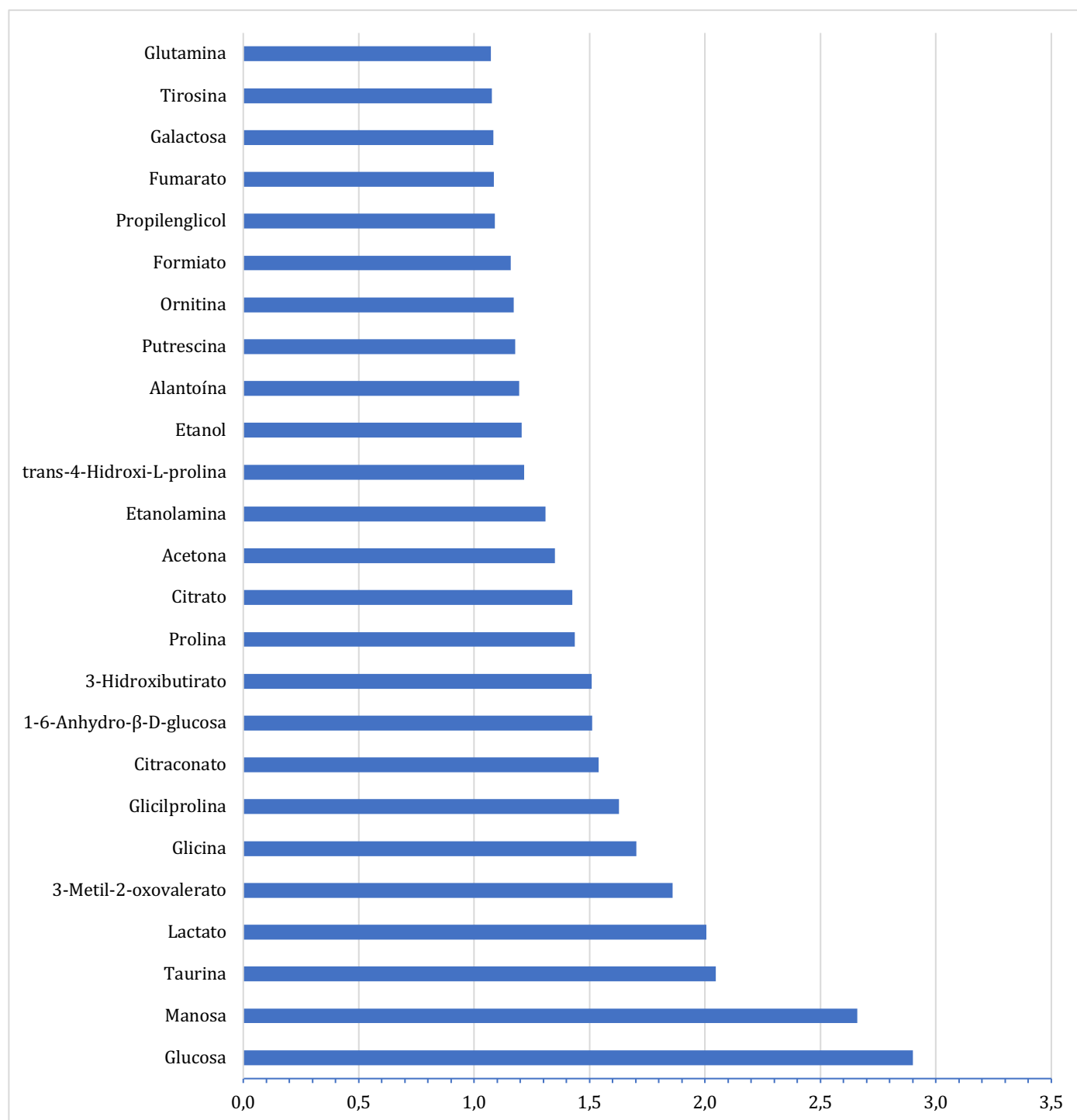


Figura 30. Metabolitos que más contribuyen al modelo PLS-DA de las muestras de saliva con una puntuación VIP ≥ 1 ordenados por su contribución relativa.

El resultado de la validación cruzada tipo Venetian Blinds se expone en la figura 31, representada por la curva ROC. La curva azul representa los valores de entrenamiento, mientras que la curva verde a la validación cruzada. El área bajo la curva ROC tuvo un valor de 0.7061. Los resultados de sensibilidad y especificidad

expresados por la validación cruzada para el modelo de PLS-DA fue de 0,72 y 0,68, respectivamente.

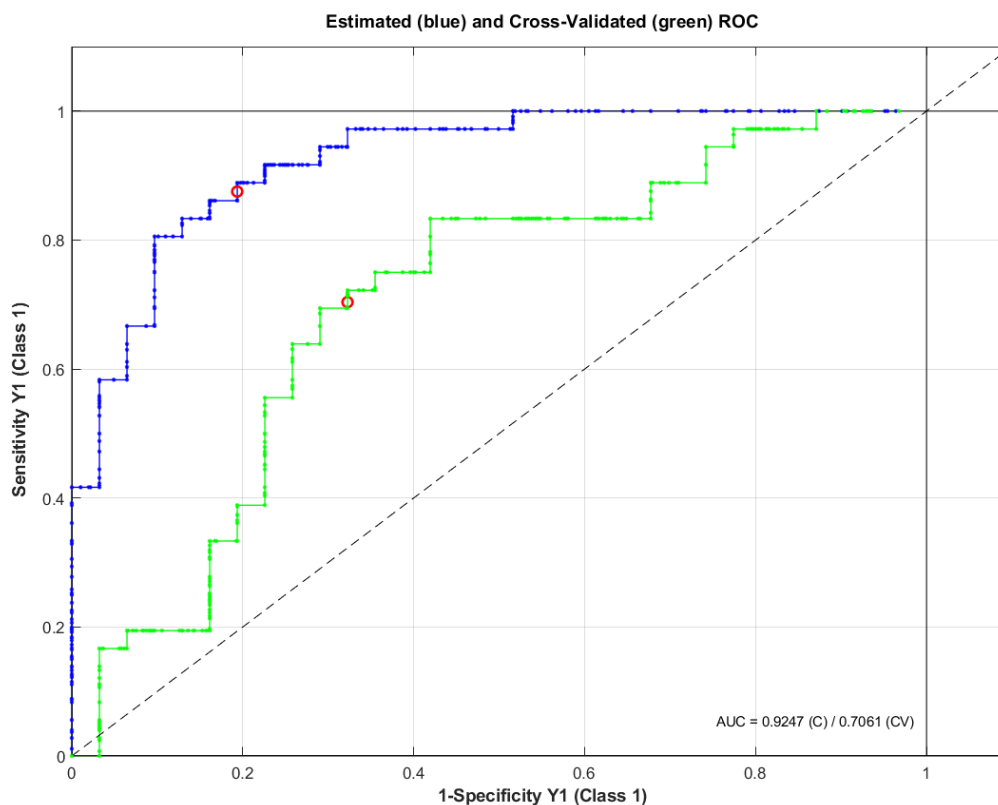


Figura 31. Curva ROC otorgada por la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre casos y controles.

El eje Y representa la sensibilidad y el eje X simboliza la especificidad. La línea marcada como (---) desde el punto 0,0 al punto 1,1 es la denominada diagonal de referencia.

Al analizar el perfil metabolómico diferencial entre los casos y controles, podemos observar que existen regiones metabólicas, tales como 3-metil-2-oxovalerato, 3-hidroxi butirato, lactato, acetona, citrato, ornitina, etanolamina, prolina, 1-6-Anhidro- β -D-glucosa, citraconato, glicina, glucosa, taurina y manosa, que muestran niveles más dominantes, tanto en el grupo de casos como de controles (tabla 23).

Ahora bien, la glicina y glucosa presentan medias más elevadas en el grupo control por sobre los casos. Se registran valores para la glicina de $1,66E^{-2}$ versus $1,48E^{-2}$ y para la glucosa de $8,10E^{-4}$ versus $5,98E^{-4}$, respectivamente. En ambas situaciones se observaron diferencias estadísticamente significativas. En la glicina

un test t de Student p-valor = 0,039, y para la glucosa t de Student p-valor = 0,015. Adicionalmente, se señala una d de Cohen para la glicina de 0,430 y de 0,546 para la glucosa, que refieren un tamaño de efecto mediano (Tabla 24).

Por el contrario, tanto la taurina como la manosa muestran unidades de concentración normalizadas más aumentadas en los casos frente a los controles. Así, en la taurina $6.21E^{-3}$ versus $5.16E^{-3}$, y en la manosa $2.78E^{-4}$ versus $1.80E^{-4}$, respectivamente. Ambas diferencias mostraron significación, test t de Student p-valor = 0,029 para la taurina y para la manosa una prueba t Student p-valor = 0,034. Además, se constata una d de Cohen con valores de -0,474 para la taurina y de -0,456 para la manosa, que indican un tamaño de efecto mediano (Tabla 24).

Tabla 23. Descriptiva de la media de las unidades de concentraciones normalizadas de los metabolitos analizados en el total de la muestra, excluida la muestra atípica. (ds) Desviación estándar. * p-valor significativo < 0,05

Metabolito	Grupo	Media UCN	ds	t de Student	d de Cohen
Valina	Control	0,00613068	0,00134953	0,497	-0,002
	Caso	0,00613288	0,00137398		
Piroglutamato	Control	0,00751555	0,00168041	0,489	0,007
	Caso	0,00750425	0,00171008		
Isoleucina	Control	0,00440070	0,00086060	0,469	-0,019
	Caso	0,00441669	0,00082736		
Niacinamida	Control	0,00128782	0,00065992	0,465	-0,022
	Caso	0,00130273	0,00071573		
2-Hidroxisovalerato	Control	0,00915898	0,00244200	0,451	-0,030
	Caso	0,00922615	0,00195529		
1-metilnicotinamida	Control	0,00499554	0,00505809	0,447	-0,033
	Caso	0,00513086	0,00271393		
Lisina	Control	0,01006489	0,00134498	0,440	0,037
	Caso	0,01001706	0,00121667		
Asparagina	Control	0,00246847	0,00077004	0,428	0,045
	Caso	0,00243502	0,00071578		
Succinato	Control	0,01949252	0,00541433	0,421	0,049
	Caso	0,01921252	0,00606868		
Fenilacetato	Control	0,00466787	0,00103645	0,420	0,050
	Caso	0,00462191	0,00077325		
Mio-inositol	Control	0,00268763	0,00073114	0,418	0,051
	Caso	0,00265127	0,00069669		
Dimetilamina	Control	0,00204848	0,00050770	0,416	0,052
	Caso	0,00202063	0,00055856		
Carnitina	Control	0,00360235	0,00138818	0,405	0,059
	Caso	0,00352576	0,00118085		
2-aminoadipato	Control	0,02395206	0,00480155	0,400	0,063
	Caso	0,02365246	0,00478282		

Tabla 23. Descriptiva de la media de las unidades de concentraciones normalizadas de los metabolitos analizados en el total de la muestra, excluida la muestra atípica. (ds) Desviación estándar. * p-valor significativo < 0,05

Metabolito	Grupo	Media UCN	ds	t de Student	d de Cohen
Leucina	Control	0,00992102	0,00148432	0,398	0,064
	Caso	0,00982307	0,00160662		
Anserina	Control	0,00038286	0,00014092	0,395	0,066
	Caso	0,00037430	0,00011765		
UNK1	Control	0,00896213	0,00137229	0,394	-0,066
	Caso	0,00905344	0,00140267		
2-hidroxivalerato	Control	0,00793317	0,00185870	0,386	-0,071
	Caso	0,00805876	0,00163097		
Piruvato	Control	0,01027495	0,00378156	0,372	0,080
	Caso	0,00996993	0,00383033		
Sarcosina	Control	0,00420042	0,00094661	0,364	0,086
	Caso	0,00412120	0,00089583		
Compuestos de Cho	Control	0,01159586	0,00315602	0,360	-0,088
	Caso	0,01186741	0,00299162		
pi-metilhistidina	Control	0,00082975	0,00032263	0,326	0,111
	Caso	0,00079786	0,00023987		
2-hidroxisobutirato	Control	0,00535367	0,00091426	0,325	0,112
	Caso	0,00525931	0,00075192		
UNK3	Control	0,00723456	0,00212119	0,325	-0,112
	Caso	0,00746163	0,00192794		
4-hidroxifenilacetato	Control	0,00329866	0,00069669	0,325	0,112
	Caso	0,00322120	0,00069102		
Imidazol	Control	0,00137954	0,00034670	0,320	0,115
	Caso	0,00134142	0,00031054		
Propionato	Control	0,05247411	0,02264061	0,317	-0,117
	Caso	0,05496729	0,01946716		
Alanina	Control	0,00926520	0,00192060	0,310	0,122
	Caso	0,00904569	0,00164467		
N-acetilglutamato	Control	0,05187865	0,01574045	0,307	0,124
	Caso	0,04994274	0,01550028		
Fucosa	Control	0,01547640	0,00344351	0,305	-0,126
	Caso	0,01596647	0,00437646		
3-hidromuconato	Control	0,00154657	0,00049976	0,305	0,125
	Caso	0,00148715	0,00044123		
Tryptófano	Control	0,00083694	0,00033809	0,300	0,129
	Caso	0,00079475	0,00031456		
Treonina	Control	0,00878664	0,00201279	0,299	0,130
	Caso	0,00846726	0,00288331		
Metionina	Control	0,00111035	0,00030504	0,297	0,131
	Caso	0,00107127	0,00028845		
2-Oxoisocaproato	Control	0,00130676	0,00030916	0,294	-0,134
	Caso	0,00134732	0,00029634		
Metilamina	Control	0,00105810	0,00029892	0,294	-0,133
	Caso	0,00109765	0,00029370		
Quinolinte	Control	0,00171808	0,00068729	0,293	0,134
	Caso	0,00163074	0,00060772		
Metanol	Control	0,00262790	0,00090595	0,288	-0,138

Tabla 23. Descriptiva de la media de las unidades de concentraciones normalizadas de los metabolitos analizados en el total de la muestra, excluida la muestra atípica. (ds) Desviación estándar. * p-valor significativo < 0,05

Metabolito	Grupo	Media UCN	ds	t de Student	d de Cohen
Glicerol	Caso	0,00278334	0,00134467	0,286	0,139
	Control	0,01089288	0,00222177		
Fenilalanina	Caso	0,01054878	0,00272555	0,286	0,139
	Control	0,00286720	0,00080312		
Xantina	Caso	0,00274709	0,00092811	0,284	0,141
	Control	0,00207455	0,00066995		
Adenina	Caso	0,00199030	0,00050027	0,283	0,141
	Control	0,00072413	0,00021302		
Dimetilsulfona	Caso	0,00069002	0,00027084	0,281	0,143
	Control	0,00323978	0,00086689		
Acetoacetato	Caso	0,00310767	0,00098463	0,280	0,143
	Control	0,00529728	0,00137069		
5-aminopentanoato	Caso	0,00510036	0,00137768	0,276	0,147
	Control	0,01250758	0,00138040		
Etilenglicol	Caso	0,01231243	0,00126824	0,271	0,150
	Control	0,06844289	0,01612139		
Histamina	Caso	0,06595865	0,01702236	0,271	0,150
	Control	0,00116986	0,00035844		
Arabinosa	Caso	0,00111803	0,00032955	0,268	0,153
	Control	0,00037085	0,00041159		
trans-4-hidroxi-L-prolina	Caso	0,00031614	0,00028322	0,266	-0,154
	Control	0,01549678	0,00508982		
Aspartato	Caso	0,01631375	0,00555258	0,259	0,159
	Control	0,00220597	0,00063298		
N-Nitrosodimetilamina	Caso	0,00210348	0,00065714	0,251	0,166
	Control	0,00273528	0,00061598		
Trimetilamina	Caso	0,00263858	0,00054424	0,239	-0,175
	Control	0,00164891	0,00036965		
Butirato	Caso	0,00172128	0,00046089	0,231	-0,181
	Control	0,02812982	0,00346022		
UNK2	Caso	0,02885973	0,00460991	0,218	0,192
	Control	0,00827460	0,00180560		
Histidina	Caso	0,00793790	0,00169413	0,210	0,199
	Control	0,00246408	0,00070177		
Acetato	Caso	0,00233324	0,00059950	0,209	-0,200
	Control	0,32290775	0,06355886		
Galactosa	Caso	0,33580690	0,06567350	0,180	0,225
	Control	0,00149938	0,00065768		
Glicilprolina	Caso	0,00136634	0,00049994	0,174	-0,232
	Control	0,00831112	0,00125240		
Formiato	Caso	0,00864390	0,00162033	0,174	0,231
	Control	0,00373368	0,00437581		
Glutamina	Caso	0,00283017	0,00327870	0,163	0,243
	Control	0,00738103	0,00178316		
Glucitol	Caso	0,00695356	0,00173652	0,147	0,260
	Control	0,01927540	0,00369242		
	Caso	0,01831719	0,00369150		

Tabla 23. Descriptiva de la media de las unidades de concentraciones normalizadas de los metabolitos analizados en el total de la muestra, excluida la muestra atípica. (ds) Desviación estándar. * p-valor significativo < 0,05

Metabolito	Grupo	Media UCN	ds	t de Student	d de Cohen
Alantoína	Control	0,00043274	0,00041120	0,139	0,268
	Caso	0,00032198	0,00041575		
Putrescina	Control	0,02184003	0,00465521	0,134	0,274
	Caso	0,02066026	0,00386124		
Tirosina	Control	0,00357372	0,00109273	0,134	0,274
	Caso	0,00328139	0,00103420		
Propilenglicol	Control	0,00463542	0,00188613	0,130	-0,278
	Caso	0,00524648	0,00251517		
Glutamato	Control	0,02687187	0,00583569	0,126	0,283
	Caso	0,02500909	0,00734524		
Fumarato	Control	0,00020977	0,00019553	0,123	0,287
	Caso	0,00015542	0,00018189		
Etanol	Control	0,01756160	0,00394482	0,106	-0,309
	Caso	0,01871781	0,00349390		
Acetona	Control	0,00790822	0,00172945	0,100	0,318
	Caso	0,00742218	0,00125860		
Ornitina	Control	0,00260777	0,00049218	0,100	0,317
	Caso	0,00246085	0,00042594		
1-6-Anhidro-β-D-glucosa	Control	0,00015982	0,00031113	0,087	0,337
	Caso	0,00005264	0,00032517		
Etanolamina	Control	0,00640498	0,00131409	0,084	0,341
	Caso	0,00592010	0,00153530		
Lactato	Control	0,01528647	0,01064428	0,070	0,353
	Caso	0,01218975	0,00589646		
Citrato	Control	0,00400269	0,00118783	0,062	0,381
	Caso	0,00358411	0,00098286		
3-hidroxibutirato	Control	0,00258800	0,00050339	0,059	-0,389
	Caso	0,00281605	0,00067029		
Citraconato	Control	0,00025105	0,00047020	0,056	0,383
	Caso	0,00009655	0,00030881		
Prolina	Control	0,00717827	0,00266946	0,054	0,385
	Caso	0,00633275	0,00146542		
3-metil-2-oxovalerato	Control	0,00213939	0,00039588	0,052	-0,404
	Caso	0,00232668	0,00053128		
Glicina	Control	0,01661271	0,00480035	0,039	0,430
	Caso	0,01480133	0,00341291		
Manosa	Control	0,00018038	0,00019347	0,034	-0,456
	Caso	0,00027808	0,00023581		
Taurina	Control	0,00516801	0,00117081	0,029	-0,474
	Caso	0,00621135	0,00298487		
Glucosa	Control	0,00081049	0,00040157	0,015	0,546
	Caso	0,00059827	0,00037268		

Tabla 24. Metabolitos estadísticamente significativos entre casos y controles, excluida la muestra atípica.

Metabolito	Grupo	Media UCN	ds	Prueba de t	d de Cohen	Valor VIP
Glicina	Control	0,01661271	0,00480035	p = 0,039*	0,430	1.701
	Caso	0,01480133	0,00341291			
Taurina	Control	0,00516801	0,00117081	p = 0,029*	-0,474	2.045
	Caso	0,00621135	0,00298487			
Manosa	Control	0,00018038	0,00019347	p = 0,034*	-0,456	2.658
	Caso	0,00027808	0,00023581			
Glucosa	Control	0,00081049	0,00040157	p = 0,015*	0,546	2.900
	Caso	0,00059827	0,00037268			

(ds) Desviación estándar. *p-valor < 0,05

DISCUSIÓN

Discusión

Diseño del estudio

Las investigaciones con un diseño de estudio de casos y controles se caracterizan principalmente por tener dos grupos, uno que tiene una enfermedad o rasgo de estudio denominado «casos» y otro grupo que no presenta el evento de interés clasificados como «controles», que posteriormente son comparados entre sí con el objetivo de buscar y conocer los factores que pueden estar asociados con el desarrollo de la enfermedad. Este tipo de estudio presenta cualidades de eficiencia en términos de tiempo y dinero, considerando que generalmente son de índole transversal, no experimental y de corta duración, proporcionando resultados útiles y fiables. En consecuencia, este diseño era el más indicado para llevar a cabo nuestro proyecto de investigación (García de la Torre et al., 2012; Schulz and Grimes, 2002).

Otra de las características que definen a este tipo de estudios es su carácter retrospectivo (Schulz and Grimes, 2002; Sedgwick, 2015). No obstante, nuestra investigación en particular no obedece a cabalidad a esta propiedad, dado que las variables principales del estudio, es decir los metabolitos, fueron observados a través de mediciones realizadas en el presente, dicho de otra manera, la ubicación temporal en que ocurre la medición de los metabolitos es la misma en la que se detecta el evento o enfermedad que define a los casos. En correspondencia con lo anterior, el sesgo de memoria, que es uno de los factores que influye en el posicionamiento de estos estudios en la pirámide de la evidencia científica, haciéndolo que esté por debajo de otros (por ejemplo abajo de los estudios de cohorte); en nuestro trabajo este se ve controlado porque la medición de la información metabolómica a través de la saliva es de carácter transversal, y a su vez, se mide de forma objetiva los perfiles metabolómicos obtenidos mediante RMN, impidiendo así que los resultados se vean afectados por inexactitudes transmitidas por parte de los sujetos del estudio (Schulz and Grimes, 2002).

Por otra parte, los estudios de casos y controles suelen ser propensos al sesgo de selección de la muestra (Schulz and Grimes, 2002; Sedgwick, 2015). En nuestra investigación este estaría controlado, teniendo en cuenta que los controles fueron seleccionados de la misma base poblacional y Centros de Salud de donde se originaron los casos, presentando un riesgo similar a desarrollar la caries dental. Asimismo, en relación con el principio de comparabilidad se han analizado tres variables -edad, sexo y clase social- no encontrando en ninguna de ellas diferencias significativas entre los casos y controles (p -valor = 0,671; 0,808; 0,257, respectivamente). Lo anterior, garantiza una adecuada homogeneidad en la representación entre ambos grupos, brindándole mayor validez a la selección de la muestra y a los resultados.

Uno de los pilares fundamentales en que se sustenta un estudio de casos y controles es la correcta definición de «caso». En nuestro contexto, el criterio diagnóstico de «caso» comprende lesiones de caries códigos ICDAS 3-6. Se ha considerado este rango en vista de que la evidencia determina que ese punto de corte otorga una adecuada equivalencia diagnóstica entre el concepto de caries de la OMS y la escala de clasificación ICDAS-II (Braga et al., 2009; Iranzo-Cortés et al., 2013; WHO, 2013). De igual forma, se confirma la existencia de una clara y robusta separación entre casos y controles al encontrar una diferencia significativa en los índices de caries entre ambos grupos (Tabla 5). Además, cabe mencionar que los controles presentan un $\text{cod}/\text{CAOD} > 0$, debido a que algunos participantes presentaban obturaciones.

En cuanto al cálculo del tamaño muestral, responde a un cálculo matemático donde se utilizó el software R y el paquete pwr (función pwr.t.test), y adicionalmente nos hemos apoyado en investigaciones previas. Estas han presentado tamaños muestrales que van en un rango entre 33 a 57 individuos, cifras que se ubican por debajo o cercanas a la utilizada en el presente estudio ($n=68$) (Fidalgo et al., 2013, 2015; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020).

En consideración a la edad de inclusión de los participantes -entre los 6 a 12 años de edad-; esta permitió evitar que una serie de variables alteraran o confundieran los resultados, como así explica Grootveld *et al.* (2022) y Percival *et al.* (2018), que destacan el tabaco y alcohol como agentes externos que lograrían intervenir en los resultados finales.

En términos generales, los estudios destinados a evaluar los perfiles metabolómicos de la saliva en pacientes pediátricos con y sin lesiones de caries dental suelen aplicar de manera frecuente los siguientes criterios de exclusión: individuos que presenten signos de gingivitis o enfermedad periodontal, pacientes que hayan recibido recientemente algún tratamiento con antibiótico (<3 meses), menores con enfermedades sistémicas o autoinmunes, así como aquellos que utilicen aparatos de ortodoncia (Fidalgo *et al.*, 2013, 2015; Li *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2019); todos ellos fueron empleados en la presente investigación. Estos criterios se utilizan con el propósito de eliminar potenciales efectos que pudieran conllevar a alteraciones en los resultados.

En otro orden de ideas, en nuestra investigación encontramos una muestra atípica, que fue excluida de los análisis del modelo predictivo para que no generará eventuales modificaciones en nuestros resultados. Ahora bien, con la intención de entender el comportamiento del paciente *outlier*, es decir la muestra N.º 20, frente al resto de los individuos, se efectuó una revisión de la historia clínica. La participante, de sexo femenino, perteneciente al grupo control, no presentaba antecedentes médicos relevantes. No obstante, se destaca que días previos a la recolección de saliva cursaba un proceso de nasofaringitis aguda. Esta es una infección viral aguda que afecta las vías respiratorias superiores, generando una inflamación nasal y faríngea difusa (Couloigner and Van Den Abbeele, 2004; Pondaven Letourmy, 2022). Tomando como referencia la literatura actual, se entiende que los virus tienen la capacidad de intervenir en una serie de vías de señalización que modifican el metabolismo de las biomoléculas, por ejemplo, la infección por influenza impacta en una cadena de rutas metabólicas celulares con el fin de optimizar su replicación y generación de partículas virales (Keshavarz *et al.*, 2020). Además, debemos considerar que las respuestas inmunitarias contra

infecciones virales también pueden influir y alterar significativamente las vías metabólicas (Grootveld et al., 2023). Por lo tanto, en consecuencia del proceso infeccioso reciente que padecía el paciente y la evidencia sobre el efecto que tienen los virus en las rutas metabólicas, es que se decidió eliminarlo para asegurarnos que no alterara nuestros resultados.

Metodología de la recolección salival

Se seleccionó como objeto de análisis a la saliva total. Esta elección se fundamenta en sus destacadas cualidades, que incluyen ser un elemento rico en información biológica y tener una excelente representación del medio oral. De igual manera, su amplio reconocimiento como el estándar en investigaciones de esta índole, otorgan la confianza suficiente para su elección en este estudio (Chiappin et al., 2007; Fidalgo et al., 2013, 2015; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020).

En consideración con el método de recolección salival, es importante recalcar que existe una variación en los perfiles metabolómicos según el método de saliva seleccionado. Como prueba de ello, diversos trabajos de investigación -realizados principalmente en población adulta- han reportado diferencias significativas de concentración de metabolitos (por ejemplo acetato, lactato, taurina, propionato, entre otros) al comparar saliva estimulada versus saliva no estimulada (Figueira et al., 2017; Masoudi Rad et al., 2014; Neyraud et al., 2013; Takeda et al., 2009). Lo anterior, se puede deber a las diferentes fuentes de origen salival, las cuales generarán distintas composiciones salivales. En particular, sabemos que la saliva no estimulada proviene mayoritariamente de la glándula submandibular, mientras que la saliva estimulada de la glándula parótida (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001). Ahora bien, Pereira *et al.* (2019) no encontraron diferencias metabólicas entre saliva estimulada y no estimulada en pacientes pediátricos, sugiriendo que en edades tempranas estas no difieren significativamente. Por otra parte, se ha detectado que los diferentes agentes estimulantes utilizados también podrían contribuir a estas marcadas discrepancias de resultados entre las publicaciones (Figueira et al., 2017; Neyraud et al., 2013; Takeda et al., 2009).

Por lo tanto, la saliva no estimulada nos otorgará mayor seguridad y estabilidad de la huella ómica obtenida, minimizando la dilución de los niveles de metabolitos presentes en la saliva (Bellagambi et al., 2020) y evitando la contaminación de la muestra por agentes externos capaces de distorsionar los resultados (Grootveld et al., 2022). Asimismo, el tipo de saliva seleccionada en otras investigaciones, que utilizan tecnologías como RMN o EM con enfoque no dirigido, es de tipo no estimulada, confirmándonos ser la metodología más apropiada para nuestro estudio (Fidalgo et al., 2013, 2015; Schulz et al., 2020).

En cuanto a los sistemas de recolección, se ha observado que los métodos de aspiración, del hisopo y de expectoración podrían generar algún grado de estimulación y variabilidad, por lo tanto, no son recomendados para el análisis de saliva total no estimulada (Bellagambi et al., 2020; López Jornet, 2010; Navazesh, 1993; Pereira et al., 2019; Priya and Prathibha, 2017). Por el contrario, el método seleccionado en esta investigación -la técnica de drenaje pasivo- es reproducible y fiable, otorgando una cuantificación de los analitos sin modificaciones, logrando muestras lo más representativas posibles. Además, su obtención no es invasiva (Bellagambi et al., 2020); por lo tanto, era la más indicada en consideración con la técnica de análisis salival seleccionado y la edad de los participantes (Katsavochristou and Koumoulis, 2020; Pappa et al., 2019).

Uno de los primeros estudios cuyo objetivo fue evaluar la variación de diferentes biofluidos humanos -orina, plasma y saliva-, junto con la consideración del horario de recolección de la muestra, fue el de Walsh *et al.* (2006). En este estudio lograron desarrollar un modelo con la capacidad predictiva de distinguir las muestras de saliva obtenidas en la mañana y en la tarde, identificando al acetato como el componente de mayor contribución al modelo. De igual forma, Dame *et al.* (2015) señalan variaciones diurnas en la concentración de algunos metabolitos; el acetato fue uno de los que presentaba mayor significancia en las muestras, respaldando así lo informado por Walsh *et al.* (2006). Además, Dallmann *et al.* (2012) señalan que aproximadamente un 15% de los metabolitos salivales expresan

una fluctuación circadiana. No obstante, Skarke *et al.* (2017) reportan que tan solo un 5,6% de los metabolitos salivales tienen una variabilidad diurna específica.

Por otra parte, se ha observado que la variabilidad de los perfiles metabolómicos salivales a nivel intraindividual, ya sea dentro de un mismo día o entre diferentes días, es inferior en comparación con la variabilidad entre distintas personas (Wallner-Liebmann *et al.*, 2016; Walsh *et al.*, 2006). Lo anterior, se ve corroborado en el estudio de Kawanishi *et al.* (2019), quienes evidencian que no hay una variabilidad significativa de la concentración de los metabolitos entre los diferentes días de recolección de saliva en los mismos individuos. Lo mencionado, nos indica la existencia de un fenotipo metabólico salival individual que permite diferenciar con gran precisión a las personas (Wallner-Liebmann *et al.*, 2016). Ahora bien, teniendo en consideración la información precedente y, con la intención de garantizar reproducibilidad y evitar distorsiones en la cuantificación de los metabolitos salivales, nuestras muestras fueron siempre recolectadas en un mismo rango horario.

Adicionalmente, a cada participante se le entregó indicaciones concretas respecto a la alimentación previa a la recolección de la saliva; particularmente, se les restringió el consumo de alimentos y/o líquidos dos horas antes de la toma de muestra. Lo expuesto anteriormente, es debido a que se ha observado que el consumo reciente de alimentos, por ejemplo, en menos de una hora, muestra un aumento de concentración de metabolitos derivados de componentes de la dieta, tales como el lactato, señalando alteraciones en los resultados (Gardner *et al.*, 2018b; Grootveld *et al.*, 2022). Por lo tanto, estas indicaciones logran eliminar que elementos exógenos pudiesen interferir en los resultados finales.

En consideración al proceso de transporte y almacenamiento de las muestras, el protocolo utilizado fue similar al descrito en estudios previos, los cuales demuestran dar estabilidad y seguridad a los resultados (Fidalgo *et al.*, 2013, 2015; Pereira *et al.*, 2019). En concreto, existe evidencia que respalda de que las muestras se puedan mantener a una temperatura de -20 °C por un periodo de hasta 4 semanas, sin observarse modificaciones en la concentración de los metabolitos

(Duarte et al., 2020). Ahora bien, referente a la temperatura de almacenamiento por largos periodos de tiempo (>28 días), se indica mantener las muestras a una temperatura de -80 °C antes de su medición con la plataforma RMN. Esto logra conservar las propiedades y concentraciones iniciales de manera efectiva (Kirwan et al., 2018), por lo tanto, el uso de un ultracongelador -como fue en nuestra investigación- que permita la correcta mantención de las muestras es indispensable para estos estudios.

Referente a la estrategia de análisis metabolómico, hemos seleccionado un enfoque «no dirigido», puesto que se ajusta mejor al diseño y objetivo del estudio. Lo anterior, tomando en cuenta que este enfoque permite la identificación de un perfil metabolómico global, en ausencia de patrones o conjuntos de metabolitos predefinidos que respondan a nuestros objetivos. Además, posibilita mediante la combinación de técnicas estadísticas multivariantes, el descubrimiento de nuevos biomarcadores que nos permiten distinguir entre grupos de casos y controles (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018). Por consiguiente, la herramienta más adecuada de acuerdo con la estrategia seleccionada -enfoque no dirigido-, y los objetivos del estudio, se eligió la plataforma de medición de RMN (EMBL-EBI, 2020a; Emwas et al., 2019).

Resultados

Respecto a nuestros análisis metabolómicos, se observó que la manosa, glucosa, glicina y taurina, presentaban una diferencia estadísticamente significativa entre los casos y controles (p-valor <0,05). En particular, se observa una menor concentración de glucosa en el grupo de casos, coincidiendo con Fidalgo *et al.* (2013), quienes exponen que pacientes con caries activas presentan una disminución en la concentración de sacáridos. La información precedente se vincula con lo expuesto en los estudios de Wang *et al.* (2022) y Li *et al.* (2023), que informan un aumento en la actividad metabólica de los CH en los pacientes con caries, tales como la glucosa y galactosa. Siguiendo esta línea de pensamiento, se puede entender

la variación que observamos en nuestro estudio referente al etanol, que se expresa de forma elevada en los casos, en concordancia con los resultados señalados por Kim *et al.* (2023). Por el contrario, la manosa presentó mayores niveles en los casos que los controles, similar al resultado de otro estudio que encontró un aumento específico de monosacáridos en el grupo de pacientes con caries (Pereira *et al.*, 2019).

En contraste a los hallazgos de otras investigaciones, que reportan mayores concentraciones de lactato en pacientes con caries (Fidalgo *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2023; Schulz *et al.*, 2020), nuestro trabajo muestra una tendencia inversa, registrando niveles más altos de lactato en los controles. Sobre esto Gardner *et al.* (2019), sugieren en su estudio que en ausencia de exposición a CH, el ingreso del lactato a la saliva total proviene de la circulación del plasma circundante y que su concentración no tiene correlación con la carga de bacterias sacarolíticas.

A razón de los resultados expuestos, es fundamental tener precaución en la interpretación de los carbohidratos y sus productos finales, dado que existen una gran cantidad de factores que influyen en la disponibilidad de estos a nivel salival, siendo la ingesta de alimentos uno de los factores que más podría contribuir a las diferencias observadas (Dame *et al.*, 2015; Linke *et al.*, 1997).

Referente a los aminoácidos libres, se han observado diferencias específicas de prolina y glicina, indicando una mayor presencia de prolina y una ausencia de glicina en pacientes con caries (Fonteles *et al.*, 2009). El motivo de una mayor presencia de prolina en los pacientes con caries podría deberse a la degradación de la matriz colágeno de la dentina por parte de las bacterias orales (Fonteles *et al.*, 2009; Hughston *et al.*, 1959). Lo anterior, se puede ver reflejado en los resultados de Pereira *et al.* (2019), quienes observan un aumento significativo de prolina en los pacientes con caries. Ahora bien, estos resultados no han sido coincidentes con otras investigaciones (Li *et al.*, 2023; Schulz *et al.*, 2020). En particular, nuestros resultados muestran menores niveles de prolina en los casos, concordando con los datos publicados por Kim *et al.* (2023).

En cuanto a la glicina, Pereira *et al.* (2019), puntualizan una situación similar a la prolina, es decir, los casos señalan una concentración elevada respecto a los pacientes libres de caries. No obstante, nuestros resultados indican mayores niveles de glicina en los controles sobre los casos, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa. Del mismo modo, Kim *et al.* (2023), evidencian algo semejante, describiendo que pacientes con caries revelan una concentración disminuida de glicina. Esto podría corresponder al rol protector al que se ha asociado a la presencia de glicina en saliva y la reducción del riesgo de caries (Fonteles et al., 2009). Por otro lado, en el grupo de casos se detectan niveles significativamente elevados de taurina, al igual que lo reportado por Pereira *et al.* (2019).

De todas maneras, cabe recordar que frente al análisis de los aminoácidos es imprescindible considerar ciertas variables, tales como la edad y el tipo de saliva seleccionada para el estudio. Así pues, se han distinguido diferencias significativas - en particular de la glicina- relacionadas a la edad de las personas (Tanaka et al., 2010), como también, se observan diferencias en cuanto a las concentraciones de los aminoácidos según el método de recolección de saliva, observándose mayores concentraciones en UWS que SWS (Masoudi Rad et al., 2014). Por ello, se sugiere que las futuras investigaciones que se enfoquen en la confirmación de estos aminoácidos como potenciales biomarcadores de caries, tengan presente variables fundamentales como la edad y el tipo de saliva recolectada.

Se ha enfatizado desde las primeras investigaciones en este campo que existe una asociación entre los ácidos grasos de cadena corta, es decir, acetato, propionato y butirato, y la actividad de caries (Silwood et al., 1999), informándose niveles alterados tanto en biopelícula (da Costa Rosa et al., 2021; Havsed et al., 2021) como en saliva (Fidalgo et al., 2013, 2015; Pereira et al., 2019). Nuestros resultados también sostienen una diferencia, observándose mayores niveles de estos metabolitos en el grupo de casos. Lo anterior, podría ser reflejo de una mayor carga bacteriana proteolítica y/o sacarolítica por parte de los casos, considerando que la concentración de los AGCC en saliva total tiene una fuerte correlación con la carga bacteriana del hospedero (Gardner et al., 2019).

Basados en la literatura, se debería observar una mayor presencia de ácidos grasos en los pacientes pertenecientes al grupo de casos (Fidalgo et al., 2013, 2015; Kim et al., 2023; Tomita et al., 2008). Sin embargo, y al igual que lo reportado por Schulz *et al.* (2020), no se encontró esta variación en nuestros resultados. Una hipótesis sobre la diferencia de resultados puede ser por ciertas características salivales, tal como la actividad lipolítica, que pudieran modular los perfiles de ácidos grasos en la saliva generando una variación interindividual (Neyraud et al., 2017; Reich et al., 2013).

Por último, los resultados obtenidos mediante el análisis multivariante PLS-DA, podemos destacar que nuestro modelo expone separaciones semejantes a las exhibidas en las investigaciones de Kim *et al.* (2023) y Fidalgo *et al.* (2015). Ahora bien, la capacidad predictiva de nuestro modelo, obtenida en base a los 25 metabolitos que más contribuyeron (valor VIP >1), demostró ser de carácter moderada (Burgueño et al., 1995), con un valor AUC de 0.71. Cifra similar fue la obtenida por Li *et al.* (2023), quienes alcanzaron un valor AUC de 0.73.

En la siguiente tabla comparativa se enseña un resumen de las principales características de los estudios similares al nuestro que se encuentran en la literatura (tabla 25).

Tabla 25. Resumen de estudios que investigan el potencial de la metabolómica salival y su relación con la caries dental en pacientes infantiles.

Autor (año)	N (Casos / Controles)	Edad en años	Método de recolección salival	Técnica bioanalítica	Biomarcadores identificados
Fidalgo <i>et al.</i> (2013)	33 (15 / 18)	5 - 9	Saliva total No estimulada	RMN	Lactato [↑] , ácidos grasos [↑] , butirato [↑] / Fenilalanina [↓] , propionato [↓] , sacáridos [↓]
Pereira <i>et al.</i> (2019)	38 (15 / 23)	4 - 16	Saliva total No estimulada / Saliva total Estimulada	RMN	Fucosa [↑] , galactosa [↑] , glucosa [↑] , xilosa [↑] , alanina [↑] , aspartato [↑] , glutamina [↑] , glicina [↑] , isoleucina [↑] , leucina [↑] , prolina [↑] , taurina [↑] , tirosina [↑] , colina [↑] , dimetilsulfona [↑] , hipoxantina [↑] , metanol [↑] , n-acetilo [↑] , uracilo [↑] / Butirato [↓] , acetona [↓]
Kim <i>et al.</i> (2023)	54 (25 / 29)	< 6	Saliva total Estimulada	RMN	Etanol [↑] , formiato [↑] , glicerofosfocolina [↑] , lactato [↑] , urea [↑] , valerato [↑] / Alanina [↓] , fucosa [↓] , glutamina [↓] , glicina [↓] , isoleucina [↓] , lisina [↓] , ornitina [↓] , fenilalanina [↓] , prolina [↓] , tirosina [↓] , valina [↓]
Musalem-Domínguez <i>et al.</i> (2023)	68 (31 / 37)	6 - 12	Saliva total No estimulada	RMN	Taurina [↑] , manosa [↑] / Glicina [↓] , glucosa [↓]

[↑] Aumentado y [↓] Disminuido en casos; (RMN) Resonancia Magnética Nuclear.

Limitaciones del estudio

Con respecto a las fortalezas de la investigación, encontramos que existe un control adecuado de los sesgos. En primer lugar, se destaca que la ausencia de características propiamente retrospectivas y la utilización de mediciones objetivas mediante herramientas analíticas altamente sofisticadas, como es la RMN, limitaría el sesgo de memoria en este estudio. En segundo lugar, el sesgo de selección se ve restringido al cumplirse el principio de comparabilidad ajustado a las variables estudiadas, sin mostrar diferencias en edad, sexo y clase social; como también, al seleccionar los sujetos de una misma base poblacional, robusteciendo la validez de la selección de la muestra y de los resultados. Y en tercer lugar, nuestro estudio se fortalece, puesto que la definición de casos y controles está claramente establecida, observándose una diferencia estadísticamente significativa en los índices de caries entre ambos grupos. Además, debido a la edad de inclusión, se evitaron que factores externos, como el tabaco y alcohol, alteraran los resultados.

A pesar de lo anterior, nuestro estudio también presenta limitaciones, entre las que identificamos el poseer un tamaño muestral pequeño, aunque es semejante al resto de publicaciones con las que se puede comparar y, que además, responde a una fórmula matemática que nos asegura una potencia del 80% (Fidalgo et al., 2013; Kim et al., 2023; Pereira et al., 2019). Por otra parte, es de carácter observacional -de casos y controles-, por lo cual no obtenemos asociaciones que establezcan causalidad. Sin embargo, este diseño nos otorga la posibilidad de identificar los perfiles metabolómicos salivales de la enfermedad de caries en pacientes pediátricos y de estimar su asociación mediante análisis de PLS-DA.

De la misma manera, la imposibilidad de comprobar el cumplimiento de la indicación de abstenerse de consumir alimentos y bebidas antes de la recolección de la muestra podría ocasionar eventuales distorsiones en los resultados. No obstante, otras publicación con características similares a nuestro estudio tampoco indican un mayor control sobre este factor, por lo que podría considerarse como una propiedad intrínseca del diseño de estudio (Fidalgo et al., 2013; Pereira et al., 2019).

Por último, la carencia de protocolos consensuados por expertos para llevar a cabo investigaciones de metabolómica salival refiere un obstáculo en la ejecución de proyectos de estas características. A pesar de lo anterior, la evidencia disponible logra ilustrarnos, permitiéndonos reducir la probabilidad de imprecisiones (Bellagambi et al., 2020; Chiappin et al., 2007; Duarte et al., 2020; Gardner et al., 2018b; Grootveld et al., 2022; Katsavochristou and Koumoulis, 2020; Kirwan et al., 2018).

CONCLUSIONES

Conclusiones

En primer lugar, respondiendo a los objetivos específicos podemos concluir que:

1. Con la intención de robustecer el modelo predictivo se analizaron otros factores de riesgo relacionados con los hábitos e higiene oral, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los casos y controles que nos permitieran poder incorporarlos al modelo.
2. En cuanto a la determinación de la composición del perfil metabolómico salival de ambos grupos podemos destacar a los siguientes metabolitos: glucosa, manosa, taurina, lactato, 3-metil-2-oxovalerato, glicina, glicilprolina, citraconato, 1-6-anhydro- β -d-glucosa, 3-hidroxibutirato, prolina, citrato, acetona, etanolamina, trans-4-hidroxi-l-prolina, etanol, alantoína, putrescina, ornitina, formiato, propilenglicol, fumarato, galactosa, tirosina y glutamina.
3. Los metabolitos con mayor potencial para diferenciar un grupo de otro serían particularmente la taurina y manosa en los casos, y la glicina y glucosa en los controles.

Y en relación con el objetivo general, se ha identificado un perfil metabolómico que diferencia casos y controles, no obstante, la capacidad predictiva de caries del modelo es considerada de fuerza moderada (AUC = 0.7061). Por consiguiente, sugerimos continuar desarrollando y avanzando en la metabolómica salival, en aras de obtener una comprensión más profunda del proceso de la caries dental, lo que ayudará, a su vez, al desarrollo de estrategias de prevención de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Almerich-Torres, T., Montiel-Company, J. M., Bellot-Arcís, C., Iranzo-Cortés, J. E., Ortola-Siscar, J. C. and Almerich-Silla, J. M. (2020). Caries Prevalence Evolution and Risk Factors among Schoolchildren and Adolescents from Valencia (Spain): Trends 1998–2018. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186561>
- Alonso, A., Marsal, S. and Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(MAR), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>
- Alonso, J., Pérez, P., Sáez, M. and Murillo, C. (1997). Validez de la ocupación como indicador de la clase social, según la clasificación del British Registrar General. *Gaceta Sanitaria*, 11(5), 205–213. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-9111\(97\)71299-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-9111(97)71299-8)
- Andreadis, G. and Kalfas, S. (2014). Correlation of Dental Plaque Acidogenicity and Acidurance with Caries Activity – Perspectives of the Ecological Plaque Hypothesis. *GSTF Journal of Advances in Medical Research (JAMR)*, 1(1), 9. <https://doi.org/10.7603/s40782-014-0009-6>
- Angwaravong, O., Pitiphat, W., Bolscher, J. G. M. and Chaiyarit, P. (2015). Evaluation of salivary mucins in children with deciduous and mixed dentition: comparative analysis between high and low caries-risk groups. *Clinical Oral Investigations*, 19(8), 1931–1937. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1428-1>
- Antonio, J., Ranea, G., Calaf, P. A., Iriberri, R. A., Dopazo Blázquez, J., Bigas, N. L., Carracedo, Á. and Lapunzina, P. (2019). *Biología de Sistemas*. www.institutoroche.es
- Arriaga, A., Busso, C., Chato Astrain, J. and García, O. (2019). Glándulas Salivales. In M. E. Gómez de Ferraris & A. Campos Muñoz (Eds.), *Histología*,

- embriología e ingeniería tisular bucodental* (4a edición, pp. 128–154). Editorial Médica Panamericana.
- Bagán Sebastián, José Vicente, Gavaldá Esteve, C. and Peñarrocha Oltra, D. (2010). Capítulo 3. Mecanismos de la secreción salival y funciones de la saliva. In José Vte. Bagán Sebastián & Y. Jiménez Soriano (Eds.), *Fisiopatología de las glándulas salivales* (pp. 35–46). Medicina oral S. L.
- Baima, G., Iaderosa, G., Citterio, F., Grossi, S., Romano, F., Berta, G. N., Buduneli, N. and Aimetti, M. (2021). Salivary metabolomics for the diagnosis of periodontal diseases: a systematic review with methodological quality assessment. *Metabolomics*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01754-3>
- Banderas-Tarabay, J. A., Zacarías-D'Oleire, I. G., Garduño-Estrada, R., Aceves-Luna, E. and González-Begné, M. (2002). Electrophoretic Analysis of Whole Saliva and Prevalence of Dental Caries. A Study in Mexican Dental Students. *Archives of Medical Research*, 33(5), 499–505. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00395-8](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00395-8)
- Barallobre-barreiro, J., Chung, Y. and Mayr, M. (2013). La proteómica y la metabolómica: los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Revista Española de Cardiología*, 66(8), 657–661.
- Barbour, A., Elebyary, O., Fine, N., Oveisi, M. and Glogauer, M. (2022). Metabolites of the oral microbiome: important mediators of multikingdom interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1), fuab039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab039>
- Becks, H. and Wainwright, W. W. (1943). Human Saliva: XIII. Rate of Flow of Resting Saliva of Healthy Individuals. *Journal of Dental Research*, 22(5), 391–396. <https://doi.org/10.1177/00220345430220050601>
- Bellagambi, F. G., Lomonaco, T., Salvo, P., Vivaldi, F., Hangouët, M., Ghimenti, S., Biagini, D., Di Francesco, F., Fuoco, R. and Errachid, A. (2020). Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115781. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115781>
- Bernabe, E., Marcenes, W., Hernandez, C. R., Bailey, J., Abreu, L. G., Alipour, V., Amini, S., Arabloo, J., Arefi, Z., Arora, A., Ayanore, M. A., Bärnighausen, T. W.,

- Bijani, A., Cho, D. Y., Chu, D. T., Crowe, C. S., Demoz, G. T., Demsie, D. G., Dibaji Forooshani, Z. S., ... Kassebaum, N. J. (2020). Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. In *Journal of Dental Research* (Vol. 99, Issue 4). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/0022034520908533>
- Bernal Ruiz, M. L. (2015). La era de las ciencias ómicas [Discurso de recepción académica]. *Academia de Farmacia "Reino de Aragón."*
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H. and Koo, H. (2018). Oral Biofilms: Pathogens, Matrix and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Terrestrial Environments*, 26(3), 162–170. <https://doi.org/10.4324/9780429331183-11>
- Braga, M. M., Oliveira, L. B., Bonini, G. A. V. C., Bönecker, M. and Mendes, F. M. (2009). Feasibility of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS-II) in Epidemiological Surveys and Comparability with Standard World Health Organization Criteria. *Caries Research*, 43(4), 245–249. <https://doi.org/10.1159/000217855>
- Bravo Pérez, M., Almerich-Silla, J. M., Canorea Díaz, E., Casals Peidró, E., Cortés Martincorena, FJ., Expósito Delgado, AJ., Gómez Santos, G., Hidalgo Olivares, G., Lamas Oliveira, M., Martínez Beneyto, Y., Monge Tàpies, M., Montiel-Company, J. M., Navarro Moreno, MI., Otero Casal, MP., Sainz Ruiz, C. and Trullols Casas, MC. (2020). Encuesta de Salud Oral en España 2020. In *RCOE: revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España* (Vol. 25, Issue 4). Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España,.
- Burgueño, M. J., García-Bastos, J. L. and Gonzalez-Buitrago, J. M. (1995). Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina Clínica*, 108(1), 34–35.

- Cabras, T., Pisano, E., Mastinu, A., Denotti, G., Pusceddu, P. P., Inzitari, R., Fanali, C., Nemolato, S., Castagnola, M. and Messana, I. (2010). Alterations of the Salivary Secretory Peptidome Profile in Children Affected by Type 1 Diabetes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(10), 2099–2108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/mcp.M110.001057>
- Carlson, A. J. and Crittenden, A. L. (1910). The relation of ptyalin concentration to diet and to the rate of secretion of the saliva. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 26(1), 169–177. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1910.26.1.169>
- Chaffee, B. W., Rodrigues, P. H., Kramer, P. F., Vítolo, M. R. and Feldens, C. A. (2017). Oral health-related quality-of-life scores differ by socioeconomic status and caries experience. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 45(3), 216–224. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12279>
- Chawhuaveang, D. D., Yu, O. Y., Yin, I. X., Lam, W. Y.-H., Mei, M. L. and Chu, C.-H. (2021). Acquired salivary pellicle and oral diseases: A literature review. *Journal of Dental Sciences*, 16(1), 523–529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.10.007>
- Cheng, L. L. and Pohl, U. (2007). The Role of NMR-based Metabolomics in Cancer. In J. C. Lindon, J. K. Nicholson, & E. Holmes (Eds.), *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics* (pp. 345–374). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452841-4/50014-X>
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R. and De Palo, E. F. (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 383, Issues 1–2, pp. 30–40). <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
- Clish. (2015). Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 1(1), a000588. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>
- Contreras-Aguilar, M. D. and Gómez-García, F. (2020). Salivary Glands' Anatomy and Physiology. In A. Tvarijonaviciute, S. Martínez-Subiela, P. López-Jornet, & E. Lamy (Eds.), *Saliva in Health and Disease: The Present and Future of a Unique Sample for Diagnosis* (pp. 3–21). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9_1

- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3), 217–221.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7)
- Costerton, J. W., Geesey, G. G. and Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86–95.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>
- Couloigner, V. and Van Den Abbeele, T. (2004). Rinofaringitis infantiles. *EMC - Otorrinolaringología*, 33(3), 1–14.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1632-3475\(04\)41051-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1632-3475(04)41051-0)
- Craig Venter, J., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351.
<https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- da Costa Rosa, T., de Almeida Neves, A., Azcarate-Peril, M. A., Divaris, K., Wu, D., Cho, H., Moss, K., Paster, B. J., Chen, T., B. Freitas-Fernandes, L., Fidalgo, T. K. S., Tadeu Lopes, R., Valente, A. P., R. Arnold, R. and de Aguiar Ribeiro, A. (2021). The bacterial microbiome and metabolome in caries progression and arrest. *Journal of Oral Microbiology*, 13(1), 1886748.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2021.1886748>
- Dallmann, R., Viola, A. U., Tarokh, L., Cajochen, C. and Brown, S. A. (2012). The human circadian metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), 2625–2629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114410109>
- Dame, Z. T., Aziat, F., Mandal, R., Krishnamurthy, R., Bouatra, S., Borzouie, S., Guo, A. C., Sajed, T., Deng, L., Lin, H., Liu, P., Dong, E. and Wishart, D. S. (2015). The human saliva metabolome. *Metabolomics*, 11(6), 1864–1883.
<https://doi.org/10.1007/s11306-015-0840-5>
- Dawes, C. and Wood, C. M. (1973). The composition of human lip mucous gland secretions. *Archives of Oral Biology*, 18(3), 343–350.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9969\(73\)90157-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9969(73)90157-X)

- Diamant, H. and Wiberg, A. (1965). Does the Chorda Tympani in Man Contain Secretory Fibers for the Parotid Gland? *Acta Oto-Laryngologica*, 60(1-6), 255-264. <https://doi.org/10.3109/00016486509127009>
- Domingo Salvany, A. and Marcos Alonso, J. (1989). Propuesta de un indicador de la «clase social» basado en la ocupación. *Gaceta Sanitaria*, 3(10), 320-326.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Duarte, D., Castro, B., Pereira, J. L., Marques, J. F., Costa, A. L. and Gil, A. M. (2020). Evaluation of saliva stability for nmr metabolomics: Collection and handling protocols. *Metabolites*, 10(12), 1-15. <https://doi.org/10.3390/metabo10120515>
- Dunn, W. B., Broadhurst, D. I., Atherton, H. J., Goodacre, R. and Griffin, J. L. (2011). Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 40(1), 387-426. <https://doi.org/10.1039/B906712B>
- Dutta, B., Lahiri, D., Nag, M., Mukherjee, D. and Ray, R. R. (2021). Introduction to Bacterial Biofilm and Acute Infections. In R. R. Ray, M. Nag, & D. Lahiri (Eds.), *Biofilm-Mediated Diseases: Causes and Controls* (pp. 1-20). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0745-5_1
- Ekström, J., Khosravani, N., Castagnola, M. and Messana, I. (2019). Saliva and the Control of Its Secretion. In O. Ekberg (Ed.), *Dysphagia: Diagnosis and Treatment* (pp. 21-57). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/174_2017_143
- EMBL-EBI. (2020a). *Comparison of NMR and MS*.
- EMBL-EBI. (2020b). *Nuclear magnetic resonance*. <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/designing-a-metabolomics-study/nuclear-magnetic-resonance-nmr/>

- EMBL-EBI. (2020c). *The metabolome and metabolic reactions*.
<https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/the-metabolome-and-metabolic-reactions/>
- Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G. A. N., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M. and Wishart, D. S. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 9(7), 123. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
- FDI & IADR. (2022). *WHA72 - Follow-up to the high-level meeting on NCDs / FDI*.
<https://www.fdiworldddental.org/wha72-follow-high-level-meeting-ncds>
- Fidalgo, T. K. S., Freitas-Fernandes, L. B., Almeida, F. C. L., Valente, A. P. and Souza, I. P. R. (2015). Longitudinal evaluation of salivary profile from children with dental caries before and after treatment. *Metabolomics*, 11(3), 583–593. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0717-z>
- Fidalgo, T. K. S., Freitas-Fernandes, L. B., Angeli, R., Muniz, A. M. S., Gonsalves, E., Santos, R., Nadal, J., Almeida, F. C. L., Valente, A. P. and Souza, I. P. R. (2013). Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions. *Metabolomics*, 9(3), 657–666. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0484-7>
- Figueira, J., Gouveia-Figueira, S., Öhman, C., Lif Holgersson, P., Nording, M. L. and Öhman, A. (2017). Metabolite quantification by NMR and LC-MS/MS reveals differences between unstimulated, stimulated, and pure parotid saliva. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 140, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.037>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fonteles, C. S. R., Guerra, M. H., Ribeiro, T. R., Mendonça, D. N., de Carvalho, C. B. M., Monteiro, A. J., Toyama, D. O., Toyama, M. H. and Fonteles, M. C. (2009). Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries. *Archives of Oral Biology*, 54(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.07.011>

- Franco-Martínez, L., Rubio, C. P. and Contreras-Aguilar, M. D. (2020). Methodology Assays for the Salivary Biomarkers' Identification and Measurement. In A. Tvarijonaviciute, S. Martinez-Subiela, P. Lopez-Jornet, & E. Lamy (Eds.), *Saliva in Health and Disease* (pp. 67–95). Springer Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9_4
- García de la Torre, G. S., Sandoval Bosch, E., Gómez Muñoz, Ma. de L. and de la Guardia González, G. (2012). Capítulo 8: Estudios de casos y controles. In A. R. Villa Romero, L. Moreno Altamirano, & G. S. García de la Torre (Eds.), *Epidemiología y estadística en salud pública*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- García-Villaescusa, A., Morales-Tatay, M., Monleó N-Salvadó, D., Gonzá Lez-Darder, J. M., Bellot-Arcis, C., María Montiel-Company, J. and Almerich-Silla, J. M. (2018). *Using NMR in saliva to identify possible biomarkers of glioblastoma and chronic periodontitis*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188710>
- Gardner, A., Carpenter, G. and So, P. W. (2020). Salivary metabolomics: From diagnostic biomarker discovery to investigating biological function. *Metabolites*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/metabo10020047>
- Gardner, A., Parkes, H. G., Carpenter, G. H. and So, P. W. (2018a). Developing and Standardizing a Protocol for Quantitative Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) Spectroscopy of Saliva. *Journal of Proteome Research*, 17(4), 1521–1531. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00847>
- Gardner, A., Parkes, H. G., Carpenter, G. H. and So, P.-W. W. (2018b). Developing and Standardizing a Protocol for Quantitative Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) Spectroscopy of Saliva. *Journal of Proteome Research*, 17(4), 1521–1531. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00847>
- Gardner, A., Parkes, H. G., So, P.-W. and Carpenter, G. H. (2019). Determining bacterial and host contributions to the human salivary metabolome. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1), 1617014. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1617014>
- Gawron, K., Wojtowicz, W., Łazarz-Bartyzel, K., Łamasz, A., Qasem, B., Mydel, P., Chomyszyn-Gajewska, M., Potempa, J. and Mlynarz, P. (2019). Metabolomic

- Status of The Oral Cavity in Chronic Periodontitis. *In Vivo*, 33(4), 1165–1174. <https://doi.org/10.21873/invivo.11587>
- Ghanim, A., Elfrink, M., Weerheijm, K., Mariño, R. and Manton, D. (2015). A practical method for use in epidemiological studies on enamel hypomineralisation. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 16(3), 235–246. <https://doi.org/10.1007/s40368-015-0178-8>
- Ghanim, A., Silva, M. J., Elfrink, M. E. C., Lygidakis, N. A., Mariño, R. J., Weerheijm, K. L. and Manton, D. J. (2017). Molar incisor hypomineralisation (MIH) training manual for clinical field surveys and practice. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 18(4), 225–242. <https://doi.org/10.1007/s40368-017-0293-9>
- Giacaman, R. A., Fernández, C. E., Muñoz-Sandoval, C., León, S., García-Manríquez, N., Echeverría, C., Valdés, S., Castro, R. J. and Gambetta-Tessini, K. (2022). Understanding dental caries as a non-communicable and behavioral disease: Management implications. *Frontiers in Oral Health*, 3, 764479. <https://doi.org/10.3389/froh.2022.764479>
- Grootveld, M., Page, G., Bhogadia, M. and Edgar, M. (2022). Updates and Original Case Studies Focused on the NMR-Linked Metabolomics Analysis of Human Oral Fluids Part I: Emerging Platforms and Perspectives. *Applied Sciences*, 12(3), 1235. <https://doi.org/10.3390/app12031235>
- Grootveld, M., Page, G., Bhogadia, M., Hunwin, K. and Edgar, M. (2023). Updates and Original Case Studies Focused on the NMR-Linked Metabolomics Analysis of Human Oral Fluids Part III: Implementations for the Diagnosis of Non-Cancerous Disorders, Both Oral and Systemic. In *Metabolites* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/metabo13010066>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Haug, K., Cochrane, K., Nainala, V. C., Williams, M., Chang, J., Jayaseelan, K. V. and O'Donovan, C. (2020). MetaboLights: A resource evolving in response to the needs of its scientific community. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D440–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1019>

- Haug, K., Salek, R. M., Conesa, P., Hastings, J., De Matos, P., Rijnbeek, M., Mahendraker, T., Williams, M., Neumann, S., Rocca-Serra, P., Maguire, E., González-Beltrán, A., Sansone, S. A., Griffin, J. L. and Steinbeck, C. (2013). MetaboLights - An open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 781–786. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1004>
- Havsed, K., Stensson, M., Jansson, H., Carda-Diéguez, M., Pedersen, A., Neilands, J., Svensäter, G. and Mira, A. (2021). Bacterial Composition and Metabolomics of Dental Plaque From Adolescents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.716493>
- Hemadi, A. S., Huang, R., Zhou, Y. and Zou, J. (2017). Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *International Journal of Oral Science*, 9(11), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ijos.2017.35>
- Hernández, L. M. and Taylor, M. K. (2020). Salivary Gland Anatomy and Physiology. In D. A. Granger & M. K. Taylor (Eds.), *Salivary Bioscience* (pp. 11–20). Springer Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35784-9_2
- Herrala, M., Mikkonen, J. J. W., Pesonen, P., Lappalainen, R., Tjäderhane, L., Niemelä, R. K., Seitsalo, H., Salo, T., Myllymaa, S. and Kullaa, A. M. (2021). Variability of salivary metabolite levels in patients with Sjögren's syndrome. *Journal of Oral Science*, 63(1), 22–26. <https://doi.org/10.2334/josnugd.19-0504>
- Heude, C., Nath, J., Carrigan, J. B. and Ludwig, C. (2017). Nuclear Magnetic Resonance Strategies for Metabolic Analysis BT -. In A. Sussulini (Ed.), *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications* (pp. 45–76). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_3
- Hu, S., Gao, K., Pollard, R., Arellano-Garcia, M., Zhou, H., Zhang, L., Elashoff, D., Kallenberg, C. G. M., Vissink, A. and Wong, D. T. (2010). Preclinical validation of salivary biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Care & Research*, 62(11), 1633–1638. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/acr.20289>

- Huang, X., Schulte, R. M., Burne, R. A. and Nascimento, M. M. (2015). Characterization of the Arginolytic Microflora Provides Insights into pH Homeostasis in Human Oral Biofilms. *Caries Research*, 49(2), 165–176. <https://doi.org/10.1159/000365296>
- Hughston, H. H., Earle, L. S. and Binkley, F. (1959). Amino Acid Composition of Proteins of Human Dentin. *Journal of Dental Research*, 38(2), 323–327. <https://doi.org/10.1177/00220345590380021401>
- Humphrey, S. P. and Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1067/mp.2001.113778>
- Hyvärinen, E., Savolainen, M., Mikkonen, J. J. W. and Kullaa, A. M. (2021). Salivary metabolomics for diagnosis and monitoring diseases: Challenges and possibilities. *Metabolites*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/metabo11090587>
- International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) Coordinating Committee. (2011). *Criteria Manual: International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II)*.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 412(6846), 565–566. <https://doi.org/10.1038/35087627>
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011), 931–945.
- IOM (Institute of Medicine). (2012). *Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward* (C. M. Micheel, S. J. Nass, & G. S. Omenn, Eds.). The National Academies Press.
- Iranzo-Cortés, J. E., Montiel-Company, J. M. and Almerich-Silla, J. M. (2013). Caries diagnosis: Agreement between WHO and ICDAS II criteria in epidemiological surveys. *Community Dental Health*, 30(2), 108–111. https://doi.org/10.1922/CDH_3006Silla04
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M. and Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

- Kaddurah-Daouk, R. and Weinshilboum, R. (2015). Metabolomic signatures for drug response phenotypes: Pharmacometabolomics enables precision medicine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 98(1), 71–75. <https://doi.org/10.1002/cpt.134>
- Kageyama, G., Saegusa, J., Irino, Y., Tanaka, S., Tsuda, K., Takahashi, S., Sendo, S. and Morinobu, A. (2015). Metabolomics analysis of saliva from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, 182(2), 149–153. <https://doi.org/10.1111/cei.12683>
- Kandpal, R. P., Saviola, B. and Felton, J. (2009). *The era of ' omics unlimited*. <https://doi.org/10.2144/000113137>
- Katsavochristou, A. and Koumoulis, D. (2020). Current status of magnetic resonance on saliva for oral and dental health early diagnosis. *Magnetochemistry*, 6(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry6020018>
- Kawanishi, N., Hoshi, N., Masahiro, S., Enomoto, A., Ota, S., Kaneko, M., Soga, T., Tomita, M. and Kimoto, K. (2019). Effects of inter-day and intra-day variation on salivary metabolomic profiles. *Clinica Chimica Acta*, 489(August 2018), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.11.030>
- Keshavarz, M., Solaymani-Mohammadi, F., Namdari, H., Arjeini, Y., Mousavi, M. J. and Rezaei, F. (2020). Metabolic host response and therapeutic approaches to influenza infection. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 25(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00211-2>
- Kidd, E. A. M. and Fejerskov, O. (2016). *Essentials of Dental Caries* (4th editio). Oxford University Press.
- Kim, S., Song, Y., Kim, S., Kim, S., Na, H., Lee, S., Chung, J. and Kim, S. (2023). Identification of a Biomarker Panel for Diagnosis of Early Childhood Caries Using Salivary Metabolic Profile. *Metabolites*, 13(3), 356. <https://doi.org/10.3390/metabo13030356>
- Kirwan, J. A., Brennan, L., Broadhurst, D., Fiehn, O., Cascante, M., Dunn, W. B., Schmidt, M. A. and Velagapudi, V. (2018). Preanalytical Processing and Biobanking Procedures of Biological Samples for Metabolomics Research: A White Paper, Community Perspective (for “Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group”—The Metabolomics Society

- Initiative). *Clinical Chemistry*, 64(8), 1158–1182.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.287045>
- Klassen, A., Faccio, A. T., Canuto, G. A. B., da Cruz, P. L. R., Ribeiro, H. C., Tavares, M. F. M. and Sussulini, A. (2017). Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. In A. Sussulini (Ed.), *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications* (pp. 3–17). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_1
- Larsen, T. and Fiehn, N.-E. (2017). Dental biofilm infections – an update. *APMIS*, 125(4), 376–384. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/apm.12688>
- Lay, J. O., Liyanage, R., Borgmann, S. and Wilkins, C. L. (2006). Problems with the “omics.” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(11), 1046–1056. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.10.007>
- Lee, Y.-H., Kim, J. H., Zhou, H., Kim, B. W. and Wong, D. T. (2012). Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. *Journal of Molecular Medicine*, 90(4), 427–434. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0829-0>
- Letieri, A. S., Freitas-Fernandes, L. B., Souza, I. P. R., Valente, A. P. and Fidalgo, T. K. S. (2022). Metabolomic Signatures of In Vitro Biofilm Maturation of *Streptococcus mutans*. *Current Microbiology*, 79(3), 86. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02778-9>
- Li, K., Wang, J., Du, N., Sun, Y., Sun, Q., Yin, W., Li, H., Meng, L. and Liu, X. (2023). Salivary microbiome and metabolome analysis of severe early childhood caries. *BMC Oral Health*, 23(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-02722-8>
- Liang, Q., Liu, H., Zhang, T., Jiang, Y., Xing, H. and Zhang, A. (2015). Metabolomics-based screening of salivary biomarkers for early diagnosis of Alzheimer’s disease. *RSC Advances*, 5(116), 96074–96079. <https://doi.org/10.1039/C5RA19094K>
- Linke, H. A. B., Moss, S. J., Arav, L. and Chiu, P.-M. (1997). Intra-oral lactic acid production during clearance of different foods containing various carbohydrates. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, 36(2), 191–197. <https://doi.org/10.1007/BF01611399>

- Llena-Puy, C. (2006). The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, 449–455.
- Lohavanichbutr, P., Zhang, Y., Wang, P., Gu, H., Nagana Gowda, G. A., Djukovic, D., Buas, M. F., Raftery, D. and Chen, C. (2018). Salivary metabolite profiling distinguishes patients with oral cavity squamous cell carcinoma from normal controls. *PLoS ONE*, 13(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204249>
- Long, N. P., Yoon, S. J., Anh, N. H., Nghi, T. D., Lim, D. K., Hong, Y. J., Hong, S. S. and Kwon, S. W. (2018). A systematic review on metabolomics-based diagnostic biomarker discovery and validation in pancreatic cancer. *Metabolomics*, 14(8), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1404-2>
- López Jornet, P. (2010). Capítulo 5. Técnicas de exploración salival: Sialometría. In José Vicente Bagán Sebastián & Y. Jiménez Soriano (Eds.), *Fisiopatología de las glándulas salivales* (pp. 67–79). Medicina oral S. L.
- Lygidakis, N. A., Garot, E., Somani, C., Taylor, G. D., Rouas, P. and Wong, F. S. L. (2021). Best clinical practice guidance for clinicians dealing with children presenting with molar - incisor - hypomineralisation (MIH): an updated European Academy of Paediatric Dentistry policy document. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s40368-021-00668-5>
- Lygidakis, N. A., Wong, F., Jälevik, B., Vierrou, A. M., Alaluusua, S. and Espelid, I. (2010). Best Clinical Practice Guidance for clinicians dealing with children presenting with Molar-Incisor-Hypomineralisation (MIH). *European Archives of Paediatric Dentistry*, 11(2), 75–81. <https://doi.org/10.1007/BF03262716>
- Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., Maltz, M., Manton, D. J., Martignon, S., Martinez-Mier, E. A., Pitts, N. B., Schulte, A. G., Splieth, C. H., Tenuta, L. M. A., Ferreira Zandona, A. and Nyvad, B. (2020). Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Research*, 54(1), 7–14. <https://doi.org/10.1159/000503309>

- Magrin, G. L., Di Summa, F., Strauss, F.-J., Panahipour, L., Mildner, M., Magalhães Benfatti, C. A. and Gruber, R. (2020). Butyrate Decreases ICAM-1 Expression in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051679>
- Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D. and Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>
- Marsh, P. D. (1994). Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. *Advances in Dental Research*, 8(2), 263–271. <https://doi.org/10.1177/08959374940080022001>
- Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149(2), 279–294. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0>
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6(1), S14. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>
- Masoudi Rad, H., Rabiei, M., Sobhani, A., Sadegh Khanjani, M., Rahbar Taramsar, M. and Kazemnezhad Leili, E. (2014). Free amino acids in stimulated and unstimulated whole saliva: advantages or disadvantages. *Journal of Oral Rehabilitation*, 41(10), 759–767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/joor.12197>
- Mata, M., Donet, E. and Cortijo, J. (2010). Capítulo 12. Técnicas biomoleculares en el diagnóstico salival. In José Vicente. Bagán Sebastián & Y. Jiménez Soriano (Eds.), *Fisiopatología de las glándulas salivales* (pp. 173–188). Medicina oral S. L.
- Mikkonen, J., Singh, S., Akhi, R., Salo, T., Lappalainen, R., Gonzalez-Arriagada, W., Ajudarte Lopes, M., Kullaa, A. and Myllymaa, S. (2018). Potential role of nuclear magnetic resonance spectroscopy to identify salivary metabolite alterations in patients with head and neck cancer. *Oncology Letters*, 16(5), 6795–6800. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9419>
- Montiel-Company, J. M., Almerich-Silla, J. M. and Montiel-Nicholas, A. W. (2023). *Oral Health Data Bank Insights*. www.uv.es/ohdbi/

- Musalem-Dominguez, O., Montiel-Company, J. M., Ausina-Márquez, V., Morales-Tatay, J. M. and Almerich-Silla, J. M. (2023). Salivary metabolomic profile associated with cariogenic risk in children. *Journal of Dentistry*, 136(June), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104645>
- Narad, P. and Kirthanashri, S. V. (2018). Introduction to Omics. In P. Arivaradarajan & G. Misra (Eds.), *Omics Approaches, Technologies And Applications: Integrative Approaches For Understanding OMICS Data* (pp. 1–10). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2925-8_1
- Nascimento, M. M., Alvarez, A. J., Huang, X., Hanway, S., Perry, S., Luce, A., Richards, V. P. and Burne, R. A. (2019). Arginine Metabolism in Supragingival Oral Biofilms as a Potential Predictor of Caries Risk. *JDR Clinical & Translational Research*, 4(3), 262–270. <https://doi.org/10.1177/2380084419834234>
- Navazesh, M. (1993). Methods for Collecting Saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694(1), 72–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x>
- Neyraud, E., Cabaret, S., Brignot, H., Chabanet, C., Labouré, H., Guichard, E. and Berdeaux, O. (2017). The basal free fatty acid concentration in human saliva is related to salivary lipolytic activity. *Scientific Reports*, 7(1), 5969. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06418-2>
- Neyraud, E., Tremblay-Franco, M., Gregoire, S., Berdeaux, O. and Canlet, C. (2013). Relationships between the metabolome and the fatty acid composition of human saliva; effects of stimulation. *Metabolomics*, 9(1), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0440-6>
- Nyvad, B. and Takahashi, N. (2020). Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1), 1710953. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1710953>
- Orfao, A., Benítez, J., Corrales, F., Martín-Subero, I., Ordovás, J. M., Carracedo, Á. and Lapunzina, P. (2019). Ciencias ómicas. In *Fundación Instituto Roche*. https://www.institutoroche.es/static/archivos/Informes_anticipando_CIENCIAS_OMICAS.pdf

- Padilla, G. A., Calvi, J. L., Taylor, M. K. and Granger, D. A. (2020). Saliva Collection, Handling, Transport, and Storage: Special Considerations and Best Practices for Interdisciplinary Salivary Bioscience Research. In D. A. Granger & M. K. Taylor (Eds.), *Salivary Bioscience* (pp. 21–47). Springer Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35784-9_3
- Pappa, E., Kousvelari, E. and Vastardis, H. (2019). Saliva in the “Omics” era: A promising tool in paediatrics. *Oral Diseases*, 25(1), 16–25. <https://doi.org/10.1111/odi.12886>
- Pappa, E., Vastardis, H., Mermelekas, G., Gerasimidi-Vazeou, A., Zoidakis, J. and Vougas, K. (2018). Saliva Proteomics Analysis Offers Insights on Type 1 Diabetes Pathology in a Pediatric Population. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00444>
- Pedersen, A. M. L., Sørensen, C. E., Proctor, G. B., Carpenter, G. H. and Ekström, J. (2018). Salivary secretion in health and disease [Article]. *Journal of Oral Rehabilitation*, 45(9), 730–746. <https://doi.org/10.1111/joor.12664>
- Percival, B. C., Wann, A., Masania, J., Sinclair, J., Sullo, N. and Grootveld, M. (2018). Detection and Determination of Methanol and Further Potential Toxins in Human Saliva Collected from Cigarette Smokers: a ¹H NMR Investigation. *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering*, 5(1), 1081.
- Pereira, J. L., Duarte, D., Carneiro, T. J., Ferreira, S., Cunha, B., Soares, D., Costa, A. L. and Gil, A. M. (2019). Saliva NMR metabolomics: Analytical issues in pediatric oral health research. *Oral Diseases*, 25(6), 1545–1554. <https://doi.org/10.1111/odi.13117>
- Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benzian, H., Allison, P. and Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)
- Peydró Olaya, A. and Carda Batalla, C. (2010). Capítulo 2. Histología de las glándulas salivales. In José Vte. Bagán Sebastián & Y. Jiménez Soriano (Eds.), *Fisiopatología de las glándulas salivales* (pp. 15–33). Medicina oral S. L.

- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G. and Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17030. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
- Plaza, N., García-Galbis, M. and Martínez-Espinosa, R. (2017). Impact of the “Omics Sciences” in Medicine: New Era for Integrative Medicine. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 3, 009–013. <https://doi.org/10.17352/jcmbt.000018>
- Pondaven Letourmy, S. (2022). Rinofaringitis en el niño. *EMC - Otorrinolaringología*, 51(3), 1–15. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1632-3475\(22\)46709-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1632-3475(22)46709-9)
- Prindle, A., Liu, J., Asally, M., Ly, S., Garcia-Ojalvo, J. and Süel, G. M. (2015). Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature*, 527(7576), 59–63. <https://doi.org/10.1038/nature15709>
- Priya, Y. and Prathibha, M. (2017). Methods of collection of saliva - A Review. *International Journal of Oral Health Dentistry*, 3(3), 149–153. <https://doi.org/10.18231/2395-499X.2017.0032>
- Proctor, G. B. (2016). The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*, 70(1), 11–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12116>
- Putri, S. P., Nakayama, Y., Matsuda, F., Uchikata, T., Kobayashi, S., Matsubara, A. and Fukusaki, E. (2013). Current metabolomics : Practical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(6), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.12.007>
- Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H. and Fukusaki, E. (2013). Current metabolomics: Technological advances. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.004>
- Ramos-Jorge, J., Alencar, B. M., Pordeus, I. A., Soares, M. E. da C., Marques, L. S., Ramos-Jorge, M. L. and Paiva, S. M. (2015). Impact of dental caries on quality of life among preschool children: emphasis on the type of tooth and stages of progression. *European Journal of Oral Sciences*, 123(2), 88–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/eos.12166>

- Reich, M., Kümmerer, K., Al-Ahmad, A. and Hannig, C. (2013). Fatty Acid Profile of the Initial Oral Biofilm (Pellicle): an In-Situ Study. *Lipids*, 48(9), 929–937. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3822-2>
- Reichert, F. L. and Poth, E. J. (1933). Pathways for the Secretory Fibers of the Salivary Glands in Man. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 30(7), 973–977. <https://doi.org/10.3181/00379727-30-6758>
- Ribbenstedt, A., Ziarrusta, H. and Benskin, J. P. (2018). Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS ONE*, 13(11), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207082>
- Righolt, A. J., Jevdjevic, M., Marcenes, W. and Listl, S. (2018). Global-, Regional-, and Country-Level Economic Impacts of Dental Diseases in 2015. *Journal of Dental Research*, 97(5), 501–507. <https://doi.org/10.1177/0022034517750572>
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E. and Clish, C. B. (2012). Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 98(1), 1–24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
- Rumbaugh, K. P. and Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Saini, R., Saini, S. and Sharma, S. (2011). Biofilm: A dental microbial infection. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2(1), 71–75. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.82317>
- Schneyer, L. H. (1955). Method for the Collection of Separate Submaxillary and Sublingual Salivas in Man. *Journal of Dental Research*, 34(2), 257–261. <https://doi.org/10.1177/00220345550340021301>
- Schulz, A., Lang, R., Behr, J., Hertel, S., Reich, M., Kümmerer, K., Hannig, M., Hannig, C. and Hofmann, T. (2020). Targeted metabolomics of pellicle and saliva in children with different caries activity. *Scientific Reports*, 10(1), 697. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57531-8>

- Schulz, K. F. and Grimes, D. A. (2002). Case-control studies: research in reverse. *The Lancet*, 359(9304), 431–434. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07605-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07605-5)
- Sedgwick, P. (2015). Bias in observational study designs: case-control studies. *BMJ: British Medical Journal*, 350, h560. <https://doi.org/10.1136/bmj.h560>
- Sengupta, A. and Narad, P. (2018). Metabolomics. In P. Arivaradarajan & G. Misra (Eds.), *Omics Approaches, Technologies and Applications: Integrative Approaches for Understanding OMICS Data* (pp. 75–97). Springer Singapore.
- Setti, G., Righi, V., Mucci, A., Panari, L., Bernardelli, G., Tarentini, E., Gambini, A., Consolo, U., Generali, L., Magnoni, C., Meleti, M., Sandri, G. and Bellini, P. (2023). Metabolic Profile of Whole Unstimulated Saliva in Patients with Sjögren's Syndrome. *Metabolites*, 13(3), 348. <https://doi.org/10.3390/metabo13030348>
- Shi, W., Tian, J., Xu, H., Wang, G., Zhou, Q. and Qin, M. (2020). Carbon source utilization patterns in dental plaque and microbial responses to sucrose, lactose, and phenylalanine consumption in severe early childhood caries. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1), 1782696. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1782696>
- Silwood, C. J. L., Lynch, E., Claxson, A. W. D. and Grootveld, M. C. (2002). 1H and 13C NMR Spectroscopic Analysis of Human Saliva. *Journal of Dental Research*, 81(6), 422–427. <https://doi.org/10.1177/154405910208100613>
- Silwood, Christopher J L, Lynch, E. J., Seddon, S., Sheerin, A., Claxson, A. W. D. and Grootveld, M. C. (1999). 1H-NMR analysis of microbial-derived organic acids in primary root carious lesions and saliva. *NMR in Biomedicine*, 12(6), 345–356. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1492\(199910\)12:6<345::AID-NBM580>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1492(199910)12:6<345::AID-NBM580>3.0.CO;2-C)
- Simon-Soro, A., Zhi, R., Krom, B. P., Hoogenkamp, M. A., Cabello-Yeves, P. J., Daniel, S. G., Bittinger, K., Tomas, I., Koo, H. and Mira, A. (2022). Polymicrobial Aggregates in Human Saliva Build the Oral Biofilm. *MBio*, 13(1), e00131-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.00131-22>

- Singer, D. L. and Kleinberg, I. (1983). The free amino acids in human dental plaque. *Archives of Oral Biology*, 28(9), 873–878. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9969\(83\)90046-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9969(83)90046-8)
- Singh, D. D. and Datta, M. (2018). Genomics. In P. Arivaradarajan & G. Misra (Eds.), *Omics Approaches, Technologies And Applications: Integrative Approaches For Understanding OMICS Data* (pp. 11–38). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2925-8_2
- Skarke, C., Lahens, N. F., Rhoades, S. D., Campbell, A., Bittinger, K., Bailey, A., Hoffmann, C., Olson, R. S., Chen, L., Yang, G., Price, T. S., Moore, J. H., Bushman, F. D., Greene, C. S., Grant, G. R., Weljie, A. M. and FitzGerald, G. A. (2017). A Pilot Characterization of the Human Chronobiome. *Scientific Reports*, 7(1), 17141. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17362-6>
- Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000, 28(1), 12–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x>
- Song, X., Yang, X., Narayanan, R., Shankar, V., Ethiraj, S., Wang, X., Duan, N., Ni, Y.-H., Hu, Q. and Zare, R. N. (2020). Oral squamous cell carcinoma diagnosed from saliva metabolic profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(28), 16167–16173. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001395117>
- Strimbu, K. and Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Sugimoto, M., Wong, D. T., Hirayama, A., Soga, T. and Tomita, M. (2010). Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*, 6(1), 78–95. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0178-y>
- Suzuki, I., Shimizu, T. and Senpuku, H. (2018). Role of SCFAs for Fimbrillin-Dependent Biofilm Formation of *Actinomyces oris*. *Microorganisms*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040114>
- Takahashi, N. (2015). Oral microbiome metabolism: From “who are they?” to “what are they doing?” *Journal of Dental Research*, 94(12), 1628–1637. <https://doi.org/10.1177/0022034515606045>

- Takeda, I., Stretch, C., Barnaby, P., Bhatnager, K., Rankin, K., Fub, H., Weljie, A., Jha, N. and Slupsky, C. (2009). Understanding the human salivary metabolome. *NMR in Biomedicine*, 22(6), 577–584. <https://doi.org/10.1002/nbm.1369>
- Takis, P. G., Ghini, V., Tenori, L., Turano, P. and Luchinat, C. (2019). Uniqueness of the NMR approach to metabolomics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115300. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.036>
- Tanaka, S., Machino, M., Akita, S., Yokote, Y. and Sakagami, H. (2010). Changes in Salivary Amino Acid Composition During Aging. *In Vivo*, 24(6), 853 LP – 856. <http://iv.iijournals.org/content/24/6/853.abstract>
- Teng, Q. (2013). NMR-Based Metabolomics. In Q. Teng (Ed.), *Structural Biology* (pp. 311–392). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3964-6_9
- Thaysen, J. H., Thorn, N. A. and Schwartz, I. L. (1954). Excretion of Sodium, Potassium, Chloride and Carbon Dioxide in Human Parotid Saliva. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 178(1), 155–159. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1954.178.1.155>
- Tomita, Y., Miyake, N. and Yamanaka, S. (2008). Lipids in Human Parotid Saliva with Regard to Caries Experience. *Journal of Oleo Science*, 57(2), 115–121. <https://doi.org/10.5650/jos.57.115>
- Tzimas, K. and Pappa, E. (2023). Saliva Metabolomic Profile in Dental Medicine Research: A Narrative Review. In *Metabolites* (Vol. 13, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/metabo13030379>
- Uwiera, R. R. E., Egyedy, A. F. and Ametaj, B. N. (2017). Laminitis: A Multisystems Veterinary Perspective with Omics Technologies. In B. N. Ametaj (Ed.), *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach* (pp. 185–200). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_9
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V. and Loor, J. J. (2017). What Are Omics Sciences? In B. N. Ametaj (Ed.), *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach* (pp. 1–7). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1

- Vinayavekhin, N. and Saghatelian, A. (2010). Untargeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, SUPPL. 90, 1–24.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3001s90>
- Vujicic, M. and Listl, S. (2020). *An Economic perspective of the global burden of dental caries*. 17(7), 1707257. <https://doi.org/10.3390/ijerph1707257>
- Wallner-Liebmann, S., Tenori, L., Mazzoleni, A., Dieber-Rotheneder, M., Konrad, M., Hofmann, P., Luchinat, C., Turano, P. and Zatloukal, K. (2016). Individual Human Metabolic Phenotype Analyzed by ¹H NMR of Saliva Samples. *Journal of Proteome Research*, 15(6), 1787–1793.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01060>
- Walsh, M. C., Brennan, L., Malthouse, J. P. G., Roche, H. M. and Gibney, M. J. (2006). Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(3), 531–539.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ajcn/84.3.531>
- Wang, T. J., Larson, M. G., Vasan, R. S., Cheng, S., Rhee, E. P., McCabe, E., Lewis, G. D., Fox, C. S., Jacques, P. F., Fernandez, C., O'Donnell, C. J., Carr, S. A., Mootha, V. K., Florez, J. C., Souza, A., Melander, O., Clish, C. B. and Gerszten, R. E. (2011). Metabolite profiles and diabetes. *Nature Medicine*, 17(4), 448–453.
<https://doi.org/10.1038/nm.2307>.Metabolite
- Wang, Y., Zhang, Y., Pan, T., Lin, H. and Zhou, Y. (2022). Metabolic differences of the oral microbiome related to dental caries – A pilot study. *Archives of Oral Biology*, 141(105471), 105471.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105471>
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171(4356), 737–738.
<https://doi.org/10.1038/171737a0>
- WHO. (2013). *Oral Health Surveys: Basic Methods* (5th ed.).
- WHO. (2020). *Report by the Director-General. Oral Health: Achieving better oral health as part of the universal health coverage and noncommunicable disease agendas towards 2030-EB148/8*.
<https://pdfs.semanticscholar.org/d2f8/23d3bd0204ebd8d893a202936ff335535b79.pdf>

- WHO. (2021). *Seventy-fourth World Health Assembly: resolutions and decisions, annexes.* World Health Organization.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/352594>
- WHO. (2022). *Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030.*
- WHO International Programme on Chemical Safety. (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.*
<https://incchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm#SectionNumber:1.1>
- WHO International Programme on Chemical Safety. (2001). *Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation.*
<https://incchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm#1.0>
- Wishart, D. S. (2011). Advances in metabolite identification. *Bioanalysis*, 3(15), 1769–1782. <https://doi.org/10.4155/bio.11.155>
- Wishart, D. S. (2016). Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(7), 473–484. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.32>
- Wishart, D. S. (2019). NMR metabolomics: A look ahead. *Journal of Magnetic Resonance*, 306, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.013>
- Wishart, D. S., Guo, A., Oler, E., Wang, F., Anjum, A., Peters, H., Dizon, R., Sayeeda, Z., Tian, S., Lee, B. L., Berjanskii, M., Mah, R., Yamamoto, M., Jovel, J., Torres-Calzada, C., Hiebert-Giesbrecht, M., Lui, V. W., Varshavi, D., Varshavi, D., ... Gautam, V. (2022). HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D622–D631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062>
- Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M. A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., ... Querengesser, L. (2007). HMDB: The human metabolome database. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), 521–526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl923>

- Wolf, T. G., Cagetti, M. G., Fisher, J.-M., Seeberger, G. K. and Campus, G. (2021). Non-communicable Diseases and Oral Health: An Overview. *Frontiers in Oral Health*, 2. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.725460>
- Yilmaz, A., Geddes, T., Han, B., Bahado-Singh, R. O., Wilson, G. D., Imam, K., Maddens, M. and Graham, S. F. (2017). Diagnostic Biomarkers of Alzheimer's Disease as Identified in Saliva using ¹H NMR-Based Metabolomics. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(2), 355–359. <https://doi.org/10.3233/JAD-161226>
- Zhang, X., Zhu, X., Wang, C., Zhang, H. and Cai, Z. (2016). Non-targeted and targeted metabolomics approaches to diagnosing lung cancer and predicting patient prognosis. *Oncotarget*, 7(39), 63437–63448. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11521>
- Zijnga, V., van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R. and M. Harmsen, H. J. (2010). Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PLOS ONE*, 5(2), e9321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009321>

ANEXOS

Anexos

Anexo I: Registro Clínico

Ficha de exploración INICIAL

Fecha de exploración						Hora				Nº de ID				Lote	
d	d	m	m	a	a	h	h	m	m						

Nombre: _____ Género: Masculino (1) Femenino (2) ☐

Fecha de nacimiento:
d d m m a a

Centro de Salud: Malva-Rosa (1) ☐ Natzaret (2) ☐ Muestras: Saliva ☐ Biofilm ☐

Necesidad de tratamiento

☐

- 0 = Sin necesidad de tratamiento
1 = Necesidad de tratamiento preventivo o de rutina
2 = Necesidad de tratamiento inmediato, incluido el raspado
3 = Necesidad de tratamiento inmediato (urgente) debido a dolor o infección de origen dental y/o bucal
4 = Remitido para una evaluación completa o un tratamiento médico/dental (condición sistémica)

Índice periodontal comunitario

- 0 = Sano
1 = Sangrado

16	11	26
46	31	36

LESIONES DE MUCOSA ORAL

Condición

Localización

0 = Sin anormalidades

1 = Ulceración

2 = Gingivitis ulcerativa necrotizante aguda

3 = Candidiasis

4 = Absceso

8 = Otras condiciones

9 = Sin registro

0 = Borde el bermellón

1 = Comisuras

2 = Labios

3 = Surcos

4 = Mucosa bucal

5 = Piso de boca

6 = Lengua

7 = Paladar dura/blando

8 = reborde alveolar/gingival

9 = Sin registro

FLUOROSIS

Severidad

--

0 = Normal

1 = Discutible

2 = Muy leve

3 = Leve

4 = Moderada

5 = Severa

8 = Excluido (corona, restauración, "bracket")

9 = No registrada (No erupcionado)

TRAUMA DENTAL

Estado

--

0 = Sano

1 = Lesión tratada

2 = Fractura solo de esmalte

3 = Fractura de esmalte y dentina

4 = Lesión con compromiso pulpar

5 = Diente perdido a causa de un trauma

6 = Otras lesiones

9 = No registrado

Nº de dientes

--

MIH

16	55	12	11	21	22	65	26
46	85	42	41	31	32	75	36

Estado de erupción

A = No visible o menos de 1/3 de la superficie oclusal o de la longitud de la corona del incisivo es visible.

Estado Clínico

0 = Sin defectos del esmalte

1 = Defecto del esmalte, no-MIH/HSPM

2 = Opacidades blancas, cremosas demarcadas, amarillas o marrones demarcadas

3 = Pérdida de esmalte post-eruptiva (PEB).

4 = Restauración atípica

5 = Caries atípica

6 = Diente ausente por MIH/HSPM

7 = No puede ser registrado

Extensión

I = Menos de 1/3 del diente afectado

II = Al menos 1/3 pero menos de 2/3 del diente

III = Al menos 2/3 del diente afectado

Examen intraoral

		55	54	53	52	51	61	62	63	64	65	
	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26
O				X	X	X	X	X	X			
M												
D												
V												
P												
G												

		75	74	73	72	71	81	82	83	84	85	
	36	35	34	33	32	31	41	42	43	44	45	46
O				X	X	X	X	X	X			
M												
D												
V												
L												
G												

ICDAS - II

1º Dígito

0 = Sano; sin sellado ni obturaciones

1 = Sellado parcial

2 = Sellado total

3 = Obturación estética

4 = Obturación de amalgama

5 = Corona de acero inoxidable

6 = Corona o carilla ceramometálica o porcelana

7 = Obturación rota o perdida

8 = Obturación provisoria

2º Dígito

A / 0 = Diente sano

B / 1 = Cambio visual en esmalte con diente seco

C / 2 = Cambio visual en esmalte con diente húmedo

D / 3 = Fractura de esmalte, sin dentina expuesta

E / 4 = Sombra oscura subyacente de la dentina

F / 5 = Cavidad visible con dentina expuesta

G / 6 = Cavidad extensa, más de 50% de la superficie, con dentina expuesta

Códigos 9

96 = No se puede examinar la superficie del diente

97 = Diente perdido por caries

98 = Diente perdido por otra causa

99 = Diente no erupcionado

Anexo II: Cuestionario de salud oral

Cuestionario de salud oral

Nº de identificación

--	--	--	--

Ocupación del padre: _____

Ocupación de la madre: _____

1. ¿Cómo describirías la salud de los dientes y encías de tu hijo/a?

	Dientes	Encía
Excelente		
Muy buena		
Buena		
Promedio		
Pobre		
Muy pobre		
No lo sé		

2. ¿Con qué frecuencia durante los últimos 12 meses tu hijo/a tuvo dolor de muelas o se sintió incómodo con sus dientes? **Marca con una cruz una de las siguientes alternativas.**

Frecuentemente	
Ocasionalmente	
Raramente	
Nunca	
No lo sé	

3. ¿Con qué frecuencia fue tu hijo/a al dentista durante los últimos 12 meses? **Marca con una cruz una de las siguientes alternativas.**

Una vez	
Dos veces	
Tres veces	
Cuatro veces	
Más de cuatro veces	
No ha visitado al dentista en los últimos 12 meses	
Nunca ha recibido atención dental / Visitado al dentista	
No lo sé / No lo recuerdo	

Si no ha acudido a un dentista durante los últimos 12 meses, pase a la pregunta cinco (5)

4. ¿Cuál fue la razón de la última visita al dentista de tu hijo/a? **Marca con una cruz una de las siguientes alternativas.**

Por dolor o problema con los dientes, encías o boca	
Por tratamiento / Seguimiento de tratamiento	
Revisión de control de los dientes/tratamiento	
No lo sé / No lo recuerdo	

5. ¿Qué tan frecuente se lava los dientes tu hijo/a? **Marca con una cruz una de las siguientes alternativas.**

Nunca	
Varias veces al mes (2-3 veces)	
Una vez a la semana	
Varias veces a la semana (2-6 veces)	
Una vez al día	
2 o más veces al día	

6. ¿Utiliza tu hijo/a alguno de los siguientes para realizar su limpieza dental o de encías? **Puedes marcar más de una alternativa.**

	Sí	No
Cepillo de dientes		
Hilo (seda) dental		
Otros (especificar):		

7. Marca las siguientes alternativas según corresponda

	Sí	No	No lo sé
¿Usa pasta de dientes para lavarse los dientes?			
¿Utiliza pasta dental que contenga flúor?			

8. Debido al estado de los dientes y boca, ¿su hijo/a ha experimentado alguno de los siguientes problemas durante el último año?

	Sí	No	No lo sé
No está satisfecho con la apariencia de sus dientes			
Frecuentemente evita sonreír y reír a causa de sus dientes			
Otros niños/as se burlan de él/ella por sus dientes			
El dolor de muelas o las molestias causadas por los dientes lo/la obligaron a faltar a las clases en el colegio o a faltar al colegio por días enteros			
Tiene dificultades para masticar comidas duras			
Tiene dificultades en la masticación			

9. ¿Con qué frecuencia come o bebe alguno de los siguientes alimentos, incluso en pequeñas cantidades? (Lee atentamente cada ítem)

	Varias veces al día	Todos los días	Varias veces por semana	Una vez por semana	Varias veces al mes	Nunca
Fruta fresca						
Galletas, tartas, pasteles, bollos						
Limonada, Coca-Cola, otras bebidas						
Mermelada / Miel						
Chicle con azúcar						
Caramelos / Chucherías / Gominolas						
Leche con azúcar						
Té con azúcar						
Café con azúcar						

10. ¿Con qué frecuencia fuman los familiares **convivientes** del niño/a?

Cigarrillos	Más de 20 al día	Entre 10 - 20 al día	Menos de 10 día	No fuma
Padre				
Madre				
Otro familiar				

11. ¿Qué nivel de educación ha completado el padre? (O padrastro, tutor u otro adulto masculino que viva con el menor). **Marca una de las siguientes alternativas.**

Escuela primaria completada	
Escuela secundaria completada	
Formación profesional	
Estudios Universitarios	
No hay ningún adulto de género masculino en el hogar	

12. ¿Qué nivel de educación ha completado la madre? (O madrastra, tutora u otro adulto femenino que viva con el menor). **Marca una de las siguientes alternativas.**

Escuela primaria completada	
Escuela secundaria completada	
Formación profesional	
Estudios Universitarios	
No hay ningún adulto de género femenino en el hogar	

Con esto completamos nuestro cuestionario.

¡Muchas gracias por su colaboración!

Anexo III: Consentimiento informado Centro de Salud Malva-rosa

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: <i>"Perfil metabólico de saliva y biofilm en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental "</i>	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	1885726
PROMOTOR	Universitat de València
INVESTIGADOR PRINCIPAL	JOSÉ MANUEL ALMERICH SILLA
SERVICIO	Unidad de Odontología Preventiva
CENTRO	Malvarrosa

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de su centro, de acuerdo con la legislación vigente, Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Lea esta hoja de información con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. José Manuel Almerich en el teléfono 963983565.

1. Participación voluntaria

Le invitamos a participar en el estudio porque ha acudido al Centro de Salud Malvarrosa y nos ha permitido explorar su boca en busca de caries.

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

2. Justificación y Objetivo del estudio

La caries dental es la enfermedad crónica no transmisible más prevalente en todo el mundo, donde su distribución y severidad varía dentro y entre las diferentes poblaciones.

La aparición de caries puede ser a temprana edad y su evolución, si ésta no es tratada a tiempo, puede presumir un reto económico y para la salud general, provocando modificaciones alimenticias, del sueño, dolor, mal posiciones dentarias, como también, afectar la salud psicológica, afectando la calidad de vida inmediata y al largo plazo de los niños y niñas.

En la última década, se han promovido los estudios de los resultados de determinados procesos y actividades salivales y de placa dental, y su relación con la caries dental, proporcionándonos información para la identificación temprana y de ayuda a la comprensión de su aparición y progresión.

Por lo anterior, consideramos que es de suma importancia para entender y detectar tempranamente la caries, la realización de un estudio que permita la caracterización de estos procesos de la saliva y de la placa dental, y su relación con esta enfermedad.

El objetivo principal del estudio es poder determinar los resultados que determinados procesos celulares crean durante su actividad en la saliva y en la placa dental. Para ello, se obtendrán muestras biológicas de saliva y placa dental con el objetivo de procesarlas y analizarlas mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

3. Descripción del estudio

Las personas que son incluidas en este estudio son los pacientes entre 6 y 12 años que asistan al **Centro de Salud Malvarrosa**. Sin embargo, serán excluidos aquellos que tengan gingivitis moderada/severa, pacientes que hayan recibido tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses, pacientes con enfermedades autoinmunes, sistémicas o discapacidad, y también aquellos portadores de aparatos de ortodoncia.

El número total de sujetos que se prevé para el estudio es 60 individuos.

El estudio compromete un **registro clínico, encuesta de hábitos, toma de muestra salival y toma de muestra de placa dental**. Será realizado en los Centros de Salud Malva-rosa y Nazaret, ubicados en Valencia. Los participantes serán pacientes de los Centros de Salud que hayan sido derivados al servicio de Odontopediatría.

El registro clínico será cumplimentado con los datos que se obtendrán de la exploración intraoral visual que se les realice a los participantes. Los datos recogidos serán: información sociodemográfica, lesiones de caries, índice periodontal comunitario, fluorosis dental, hipomineralización incisivo molar, traumatismo dental, lesiones de mucosa oral y necesidades de tratamiento.

La encuesta de hábitos sobre salud oral será autocumplimentada por los padres y/o cuidadores de los menores, mediante un formulario que les será entregado de manera presencial. La información recogida será sobre los hábitos de higiene, alimentarios y salud oral.

La muestra de saliva será obtenida previo al registro clínico, por método de drenaje de forma manual.

La toma de muestra de placa, al igual que la muestra de saliva, será previo a la exploración oral, utilizando puntas de papel estériles.

Existen dos grupos de estudio: el grupo casos, integrado por pacientes que presentan caries, y el grupo control, compuesto por individuos libres de caries. En ambos grupos la herramienta de evaluación de caries será la misma, ICDAS II.

4. Actividades del estudio

El estudio en su totalidad tiene previsto un periodo de duración de 12 meses.

Una vez aceptada la participación en el estudio, el paciente deberá concurrir dos veces al Centro de Salud para la continuidad del estudio, incluyendo la toma de muestra salival y de placa.

La investigación conlleva un registro clínico, mediante un examen intraoral, y de forma complementaria, la recolección de las muestras de saliva y de placa dental, como también, la cumplimentación de una encuesta sobre higiene, salud oral y alimenticia.

5. Riesgos y molestias derivados de su participación en el estudio

La participación en el estudio no genera molestias ni riesgos al individuo examinado.

6. Posibles beneficios

Es muy posible que usted no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

7. Protección de datos personales

El investigador/promotor y el centro son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor; la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD).

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal identificada quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades competentes, al Comité de Ética de la Investigación y personal autorizado por el promotor (monitores del estudio, auditores), cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

De acuerdo con lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de

datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos, pero sí se utilizarán los que ya se hayan recogido.

Además, puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, diríjase al investigador principal del estudio o al delegado/a de Protección de Datos del centro/institución en dpd@gva.es. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Los datos codificados pueden ser transmitidos a terceros y a otros países, pero en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito o para su uso en publicaciones científicas, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

El promotor/investigador adoptará las medidas pertinentes para garantizar la protección de su privacidad y no permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación.

Si el promotor/investigador no puede confirmar esta demanda, el paciente deberá ser informado del riesgo de re-identificación derivado de la reutilización de sus datos en futuros estudios no definidos en este momento.

8. INFORMACION RELATIVA A MUESTRAS BIOLÓGICAS

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011 de Biobancos, normativas que garantizan el respeto a los derechos que le asisten.

Al firmar este documento, revisado y evaluado favorablemente por el Comité de Ética de Investigación de su centro, usted acepta que se utilicen sus muestras para las finalidades del presente estudio.

8.1 Procedimientos de obtención de muestras, molestias y posibles riesgos

Las muestras serán obtenidas durante el seguimiento habitual de su enfermedad o proceso.

Muestra de saliva: Se obtendrá 1 muestra de saliva mediante método de drenaje pasivo, la cantidad en cada análisis será de 1,5-2 ml. No genera molestias ni riesgos al individuo examinado.

Muestra de placa dental (biofilm): Se obtendrá 1 muestra de placa recogida de superficies dentales específicas, mediante puntas de papel estéril por cada análisis. No genera molestias ni riesgos al individuo examinado.

Las muestras estarán asociadas a un código que solo podrá ser relacionado con su identidad por personal autorizado, de la misma manera que se ha explicado previamente con los datos obtenidos durante el estudio.

Los datos que se deriven de la utilización de estas muestras se tratarán del mismo modo que el resto de los datos que se obtengan durante este estudio en cuanto a la protección de datos.

Las muestras y los datos asociados se mantendrán bajo las condiciones de seguridad adecuadas y se garantiza que los sujetos no podrán ser identificados a través de medios considerados razonables por personas distintas a las autorizadas.

Es posible que sea necesario algún dato o muestras adicionales. En ese caso, su médico se pondrá en contacto con usted para solicitarle de nuevo su colaboración. Se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

8.2 Beneficios esperados

No se espera un beneficio directo por su participación en el estudio. No obstante, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de sus muestras y de muchas otras pueden ayudar al avance científico.

No percibirá ningún beneficio económico por la donación de las muestras y la cesión de los datos proporcionados, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación efectuada.

8.3. Lugar de análisis y almacenamiento de las muestras

Durante el desarrollo del estudio el almacenamiento y la manipulación de las muestras de saliva y placa serán estrictamente estandarizadas: las muestras se mantendrán a -20 °C en neveras portátiles con hielo hasta un máximo de 3 horas y serán transferidas al almacenamiento en congelador a -80 °C. Sus muestras serán analizadas en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica del INCLIVA.

Durante este proceso el responsable de las muestras será el promotor/investigador del estudio.

8.4. Implicaciones de la información obtenida al analizar las muestras

En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información acerca de los estudios generales del presente estudio.

En el caso de que en este estudio se obtengan datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted, e interesar a su salud o a la de su familia, podrá solicitar que le sean comunicados por su médico del estudio.

No obstante, si usted manifiesta su negativa ser informado, pero según criterio del médico responsable, la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta al Comité de Ética Asistencial del centro. La comunicación de esta información se llevará a cabo por profesionales que le podrán explicar adecuadamente su relevancia y las opciones que se pudieran plantear. En caso de información genética clínicamente relevante podrá recibir el preceptivo consejo genético.

8.5. Uso futuro de las muestras

Una vez finalizado el estudio, las muestras sobrantes serán destruidas.

CONSENTIMIENTO INFORMADO REPRESENTANTE LEGAL (Copia para el representante legal)

TÍTULO DEL ESTUDIO: <i>"Perfil metabolómico de saliva y biofilm en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental "</i>	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	1885726
PROMOTOR	Universitat de València
INVESTIGADOR PRINCIPAL	JOSÉ MANUEL ALMERICH SILLA
SERVICIO	Unidad de Odontología Preventiva
CENTRO	Malvarrosa

Yo, _____ <<nombre y apellidos del representante>>,

(Nombre de puño y letra por el representante)

en calidad de _____ <<indicar parentesco>>, de

_____ <<nombre y apellidos del participante>>

(Nombre de puño y letra por el representante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>

(Nombre de puño y letra por el representante)

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para su participación en el estudio

Consiento al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

☐ SI

☐ NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

☐ SI

☐ NO

Teléfono o e-mail de contacto

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

☐ SI

☐ NO

Teléfono o e-mail de contacto

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del representante legal, familiar o
persona vinculada de hecho

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

Fecha: ____/____/____

(Firma y fecha de puño y letra por el
representante)

CONSENTIMIENTO INFORMADO REPRESENTANTE LEGAL (Copia para el investigador)

TÍTULO DEL ESTUDIO: <i>"Perfil metabolómico de saliva y biofilm en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental "</i>	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	1885726
PROMOTOR	Universitat de València
INVESTIGADOR PRINCIPAL	JOSÉ MANUEL ALMERICH SILLA
SERVICIO	Unidad de Odontología Preventiva
CENTRO	Malvarrosa

Yo, _____ <<nombre y apellidos del representante>>,

(Nombre de puño y letra por el representante)

en calidad de _____ <<indicar parentesco>>, de

_____ <<nombre y apellidos del participante>>

(Nombre de puño y letra por el representante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>

(Nombre de puño y letra por el representante)

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para su participación en el estudio

Consiento al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

☐ SI

☐ NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

☐ SI

☐ NO

Teléfono o e-mail de contacto

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

☐ SI

☐ NO

Teléfono o e-mail de contacto

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del representante legal, familiar o
persona vinculada de hecho

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

Fecha: ____/____/____

(Firma y fecha de puño y letra por el
representante)

Anexo IV: Consentimiento informado Centro de Salud Nazaret

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: <i>"Perfil metabólico de saliva y biofilm en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental "</i>	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	1885726
PROMOTOR	Universitat de València
INVESTIGADOR PRINCIPAL	JOSÉ MANUEL ALMERICH SILLA
SERVICIO	Unidad de Odontología Preventiva
CENTRO	Nazaret

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de su centro, de acuerdo con la legislación vigente, Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Lea esta hoja de información con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. José Manuel Almerich en el teléfono 963983565.

1. Participación voluntaria

Le invitamos a participar en el estudio porque ha acudido al Centro de Salud Nazaret y nos ha permitido explorar su boca en busca de caries.

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

2. Justificación y Objetivo del estudio

La caries dental es la enfermedad crónica no transmisible más prevalente en todo el mundo, donde su distribución y severidad varía dentro y entre las diferentes poblaciones.

La aparición de caries puede ser a temprana edad y su evolución, si ésta no es tratada a tiempo, puede presumir un reto económico y para la salud general,

provocando modificaciones alimenticias, del sueño, dolor, mal posiciones dentarias, como también, afectar la salud psicológica, afectando la calidad de vida inmediata y al largo plazo de los niños y niñas.

En la última década, se han promovido los estudios de los resultados de determinados procesos y actividades salivales y de placa dental, y su relación con la caries dental, proporcionándonos información para la identificación temprana y de ayuda a la comprensión de su aparición y progresión.

Por lo anterior, consideramos que es de suma importancia para entender y detectar tempranamente la caries, la realización de un estudio que permita la caracterización de estos procesos de la saliva y de la placa dental, y su relación con esta enfermedad.

El objetivo principal del estudio es poder determinar los resultados que determinados procesos celulares crean durante su actividad en la saliva y en la placa dental. Para ello, se obtendrán muestras biológicas de saliva y placa dental con el objetivo de procesarlas y analizarlas mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

3. Descripción del estudio

Las personas que son incluidas en este estudio son los pacientes entre 6 y 12 años que asistan al **Centro de Salud Nazaret**. Sin embargo, serán excluidos aquellos que tengan gingivitis moderada/severa, pacientes que hayan recibido tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses, pacientes con enfermedades autoinmunes, sistémicas o discapacidad, y también aquellos portadores de aparatos de ortodoncia.

El número total de sujetos que se prevé para el estudio es 60 individuos.

El estudio compromete un **registro clínico, encuesta de hábitos, toma de muestra salival y toma de muestra de placa dental**. Será realizado en los Centros de Salud Malva-rosa y Nazaret, ubicados en Valencia. Los participantes serán pacientes de los Centros de Salud que hayan sido derivados al servicio de Odontopediatría.

El registro clínico será cumplimentado con los datos que se obtendrán de la exploración intraoral visual que se les realice a los participantes. Los datos recogidos serán: información sociodemográfica, lesiones de caries, índice periodontal comunitario, fluorosis dental, hipomineralización incisivo molar, traumatismo dental, lesiones de mucosa oral y necesidades de tratamiento.

La encuesta de hábitos sobre salud oral será autocumplimentada por los padres y/o cuidadores de los menores, mediante un formulario que les será entregado de manera presencial. La información recogida será sobre los hábitos de higiene, alimentarios y salud oral.

La muestra de saliva será obtenida previo al registro clínico, por método de drenaje de forma manual.

La toma de muestra de placa, al igual que la muestra de saliva, será previo a la exploración oral, utilizando puntas de papel estériles.

Existen dos grupos de estudio: el grupo casos, integrado por pacientes que presentan caries, y el grupo control, compuesto por individuos libres de caries. En ambos grupos la herramienta de evaluación de caries será la misma, ICDAS II.

4. Actividades del estudio

El estudio en su totalidad tiene previsto un periodo de duración de 12 meses.

Una vez aceptada la participación en el estudio, el paciente deberá concurrir dos veces al Centro de Salud para la continuidad del estudio, incluyendo la toma de muestra salival y de placa.

La investigación conlleva un registro clínico, mediante un examen intraoral, y de forma complementaria, la recolección de las muestras de saliva y de placa dental, como también, la cumplimentación de una encuesta sobre higiene, salud oral y alimenticia.

5. Riesgos y molestias derivados de su participación en el estudio

La participación en el estudio no genera molestias ni riesgos al individuo examinado.

6. Posibles beneficios

Es muy posible que usted no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

7. Protección de datos personales

El investigador/promotor y el centro son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor, la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD).

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal identificada quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades competentes, al Comité de Ética de la Investigación y personal autorizado por el promotor (monitores del estudio, auditores), cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos, pero sí se utilizarán los que ya se hayan recogido.

Además, puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, diríjase al investigador principal del estudio o al delegado/a de Protección de Datos del centro/institución en dpd@gva.es. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Los datos codificados pueden ser transmitidos a terceros y a otros países, pero en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito o para su uso en publicaciones científicas, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

El promotor/investigador adoptará las medidas pertinentes para garantizar la protección de su privacidad y no permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación.

Si el promotor/investigador no puede confirmar esta demanda, el paciente deberá ser informado del riesgo de re-identificación derivado de la reutilización de sus datos en futuros estudios no definidos en este momento.

8. INFORMACION RELATIVA A MUESTRAS BIOLÓGICAS

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011 de Biobancos, normativas que garantizan el respeto a los derechos que le asisten.

Al firmar este documento, revisado y evaluado favorablemente por el Comité de Ética de Investigación de su centro, usted acepta que se utilicen sus muestras para las finalidades del presente estudio.

8.1 Procedimientos de obtención de muestras, molestias y posibles riesgos

Las muestras serán obtenidas durante el seguimiento habitual de su enfermedad o proceso.

Muestra de saliva: Se obtendrá 1 muestra de saliva mediante método de drenaje pasivo, la cantidad en cada análisis será de 1,5-2 ml. No genera molestias ni riesgos al individuo examinado.

Muestra de placa dental (biofilm): Se obtendrá 1 muestra de placa recogida de superficies dentales específicas, mediante puntas de papel estéril por cada análisis. No genera molestias ni riesgos al individuo examinado.

Las muestras estarán asociadas a un código que solo podrá ser relacionado con su identidad por personal autorizado, de la misma manera que se ha explicado previamente con los datos obtenidos durante el estudio.

Los datos que se deriven de la utilización de estas muestras se tratarán del mismo modo que el resto de los datos que se obtengan durante este estudio en cuanto a la protección de datos.

Las muestras y los datos asociados se mantendrán bajo las condiciones de seguridad adecuadas y se garantiza que los sujetos no podrán ser identificados a través de medios considerados razonables por personas distintas a las autorizadas.

Es posible que sea necesario algún dato o muestras adicionales. En ese caso, su médico se pondrá en contacto con usted para solicitarle de nuevo su colaboración. Se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

8.2 Beneficios esperados

No se espera un beneficio directo por su participación en el estudio. No obstante, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de sus muestras y de muchas otras pueden ayudar al avance científico.

No percibirá ningún beneficio económico por la donación de las muestras y la cesión de los datos proporcionados, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación efectuada.

8.3. Lugar de análisis y almacenamiento de las muestras

Durante el desarrollo del estudio el almacenamiento y la manipulación de las muestras de saliva y placa serán estrictamente estandarizadas: las muestras se mantendrán a -20 ° C en neveras portátiles con hielo hasta un máximo de 3 horas y serán transferidas al almacenamiento en congelador a -80 °C. Sus muestras serán analizadas en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica del INCLIVA.

Durante este proceso el responsable de las muestras será el promotor/investigador del estudio.

8.4. Implicaciones de la información obtenida al analizar las muestras

En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información acerca de los estudios generales del presente estudio.

En el caso de que en este estudio se obtengan datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted, e interesar a su salud o a la de su familia, podrá solicitar que le sean comunicados por su médico del estudio.

No obstante, si usted manifiesta su negativa ser informado, pero según criterio del médico responsable, la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta al Comité de Ética Asistencial del centro. La comunicación de esta información se llevará a cabo por profesionales que le podrán explicar adecuadamente su relevancia y las opciones que se pudieran plantear. En caso de información genética clínicamente relevante podrá recibir el preceptivo consejo genético.

8.5. Uso futuro de las muestras

Una vez finalizado el estudio, las muestras sobrantes serán destruidas.

CONSENTIMIENTO INFORMADO REPRESENTANTE LEGAL (Copia representante legal)

TÍTULO DEL ESTUDIO: <i>"Perfil metabolómico de saliva y biofilm en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental "</i>	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	1885726
PROMOTOR	Universitat de València
INVESTIGADOR PRINCIPAL	JOSÉ MANUEL ALMERICH SILLA
SERVICIO	Unidad de Odontología Preventiva
CENTRO	Nazaret

Yo, _____ <<nombre y apellidos del representante>>,

(Nombre de puño y letra por el representante)

en calidad de _____ <<indicar parentesco>>, de

_____ <<nombre y apellidos del participante>>

(Nombre de puño y letra por el representante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>

(Nombre de puño y letra por el representante)

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para su participación en el estudio

Consiento al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

☐ SI

☐ NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

☐ SI

☐ NO

Teléfono o e-mail de contacto

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

☐ SI

☐ NO

Teléfono o e-mail de contacto

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del representante legal, familiar o
persona vinculada de hecho

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

Fecha: ____/____/____

(Firma y fecha de puño y letra por el
representante)

CONSENTIMIENTO INFORMADO REPRESENTANTE LEGAL (Copia investigador)

TÍTULO DEL ESTUDIO: <i>"Perfil metabolómico de saliva y biofilm en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental "</i>	
CÓDIGO DEL ESTUDIO	1885726
PROMOTOR	Universitat de València
INVESTIGADOR PRINCIPAL	JOSÉ MANUEL ALMERICH SILLA
SERVICIO	Unidad de Odontología Preventiva
CENTRO	Nazaret

Yo, _____ <<nombre y apellidos del representante>>,

(Nombre de puño y letra por el representante)

en calidad de _____ <<indicar parentesco>>, de

_____ <<nombre y apellidos del participante>>

(Nombre de puño y letra por el representante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>

(Nombre de puño y letra por el representante)

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para su participación en el estudio

Consiento al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

☐ SI

☐ NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

☐ SI ☐ NO Teléfono o e-mail de contacto

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

☐ SI ☐ NO Teléfono o e-mail de contacto

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del representante legal, familiar o
persona vinculada de hecho

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

Fecha: ____/____/____

(Firma y fecha de puño y letra por el
representante)

Anexo V: Informe del Comité de Ética de investigación en Humanos de la Universitat de València

El comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité d'Ètica d'Investigació en Humans , en la reunió celebrada el día 02 de Diciembre de 2021 , una vez estudiado el proyecto de tesis doctoral : *"Perfil metabolómico de saliva y biofilm en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental "* , con número de registro 1885726 .

Cuyo/a responsable es D/Dña.

OSCAR MUSALEM DOMÍNGUEZ , dirigida por D/Dña. JOSE MANUEL ALMERICH SILLA

ha acordado informar favorablemente el mismo.

Y para que conste, se firma el presente certificado

Av. Blasco Ibáñez, 13 tel: 963864109 vicerec.investigacio@uv.es
València 46010 fax: 963983221 www.uv.es/serinves

Firmado digitalmente por
PEDRO JESUS PEREZ ZAFRILLA
Cargo: Presidente del Comité de Ética de la Investigación en Humanos
Fecha: 09/12/2021 22:56:50 CET



Anexo VI: Informe del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia



Hospital Clínic Universitari



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Doña Marina Soro Domingo, Presidenta del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión ordinaria, de fecha 27 de enero de 2022 (Acta nº377), se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación:

Nº DE ORDEN: 2022/008

TITULO: Perfil metabolómico de saliva y biofilm en pacientes de edad infantil y su relación con la caries dental.

PROTOCOLO: Versión 1.0 de fecha 17 de diciembre de 2021

HIP/CI Nazaret: Versión 1.0 de fecha 17 de diciembre de 2021

HIP/CI Malvarrosa: Versión 1.0 de fecha 17 de diciembre de 2021

PETICIÓN DE AYUDA A LA INVESTIGACIÓN: Tesis Doctoral Musalem Dominguez

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE**

Este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por el Dr. Jose Manuel Almerich Silla, en el Servicio de Atención Primaria, investigador principal, acordando que reúnen las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación biomédica.

Valencia, a 1 de febrero de 2022

**Marina
Soro**

Firmado digitalmente
por Marina Soro
Fecha: 2022.02.02
07:42:11 +01'00'

Fdo. : Doña Marina Soro Domingo

Anexo VII: Recordatorio cita

RECORDAR
NO comer ni tomar líquidos 2 horas antes de la cita NO cepillarse los dientes el día de la cita Traer la hoja de información al paciente y encuesta Traer cepillo dental

Anexo VIII: Artículo

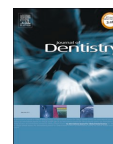
Journal of Dentistry 136 (2023) 104645



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Dentistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jdent



Salivary metabolomic profile associated with cariogenic risk in children

Oscar Musalem-Dominguez^a, José María Montiel-Company^{a,*}, Verónica Ausina-Márquez^b, José Manuel Morales-Tatay^{c,d}, José Manuel Almerich-Silla^a

^a Departament d'Estomatologia, Facultat de Medicina i Odontologia, Universitat de València, Gascó Oliag, 1, Valencia 46010, Spain

^b Department of Dentistry, European University of Valencia, Passeig de l'Albereda, 7, Valencia 46010, Spain

^c Department of Pathology, Medicine and Odontology Faculty, University of Valencia, Valencia 46010, Spain

^d Research Unit, INCLIVA Health Research Institute, Valencia 46010, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Biomarkers
NMR spectroscopy
Dental caries
Saliva
Diagnosis
Metabolomics

ABSTRACT

Objectives: To identify the metabolomic differences in the saliva of healthy children versus children with active carious lesions and to estimate the predictive capacity of a model based on the salivary metabolomic profile.

Methods: A study of cases ($n = 31$) and controls ($n = 37$) was designed for children aged between 6 and 12 (mean age of the cases: 8.9; controls: 8.7). The said children attended public health centers in Valencia, Spain. Intraoral examinations were performed by a single examiner using ICDAS II diagnostic criteria. Unstimulated total saliva samples were analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Results: The dft index for cases was 2.84 while it was 0.19 for the control group, the DMFT index was 1.13 and 0.11, respectively. The predictive model generated by the multivariate PLS-DA analysis projects a separation between the cases and the controls on the score chart with a predictive capacity and generating an area under the curve of 0.71. The metabolites: 3-methyl-2-oxovalerate, 3-hydroxybutyrate, lactate, acetone, citrate, ornithine, ethanolamine, taurine, proline, glycine, mannose, glucose, 1-6-Anhydro- β -D-glucose and citraconate, are those that show greater significance in the model. In the controls, glycine (Cohen's $d = 0.430$) and glucose (Cohen's $d = 0.560$) present higher means compared to the cases. On the contrary, taurine (Cohen's $d = -0.474$) and mannose (Cohen's $d = -0.456$) show higher means in cases compared to controls.

Conclusions: Our findings show a difference in the salivary metabolomic profiles, specifically in the groups of saccharides and amino acids, suggesting an association of these with the level of caries risk.

Clinical significance: The results reported in the present study reinforce the use of salivary metabolomics as a research method for the search for salivary biomarkers that allow the evaluation of caries risk in patients. Furthermore, it brings us closer to a personalized medicine that will help in dental caries prevention strategies.

1. Introduction

Dental caries belongs to the group of non-communicable diseases. The disease is defined as a dynamic and multifactorial one, mediated by biofilm, and modulated by diet, and which results in a loss of minerals from the hard tissues of the teeth [1,2]. Recent reports from the World Health Organization report that approximately 500 million children have untreated caries in their primary teeth [3], thereby impacting on their quality of life [4]. Regarding the etiology of dental caries, its understanding is currently directed towards the metabolic activity that occurs in the microbial community, making it the main modulator of the environment [5]. This is reflected in the results given by Wang et al., where a change in the metabolism of individuals with active dental

caries was identified, indicating an interrelationship between the microbiota and the metabolism of the biofilm [6].

Total saliva is a biofluid made up of elements derived from the oral mucosa, crevicular fluid, microorganisms, and other exogenous compounds [7,8]. Its analysis provides the opportunity to observe the internal workings of the body, having the potential to be an important indicator of health and disease. The use of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy makes it possible to identify and quantify metabolomic profiles, providing a measure of the changes resulting from processes involving the genome, transcriptome, proteome, and environment, providing a representation of the phenotype at the molecular level [9]. Likewise, this technique has as its main advantages: excellent reproducibility, quantification, and simplicity in sample preparation

* Corresponding author.

E-mail address: jose.maria.montiel@uv.es (J.M. Montiel-Company).

<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104645>

Received 24 June 2023; Received in revised form 27 July 2023; Accepted 28 July 2023

Available online 29 July 2023

0300-5712/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

[10].

Currently, there are 3 main methods for metabolomic processing of biological samples, which include: LC-MS (liquid chromatography coupled with single-stage mass spectrometry), GC-MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry), and NMR spectroscopy [11]. NMR allows the determination of a global metabolomic profile, detecting a wide spectrum of molecules, including peptides, amino acids, nucleic acids, carbohydrates, organic acids, etc. Among the main advantages of NMR spectroscopy we find an excellent reproducibility and highly automatable, which makes large-scale studies more feasible than with LC-MS or GC-MS, it is intrinsically quantitative, the sample preparation is simple and it is suitable for the characterization of compounds that are less susceptible to analysis by LC-MS, such as sugars, organic acids, alcohols, among others [10–13]. However, one of its main disadvantages is its low sensitivity [12,13]. It also requires relatively large sample sizes (~500 μ L) and expensive instrumentation [10,14]. Nevertheless, considering the design of our study and its objectives, an untargeted metabolomic analysis strategy has been selected. Therefore, NMR spectroscopy is the technique of choice for this approach.

Furthermore, salivary analysis by NMR spectrometry associated with multivariate statistical techniques, constitutes a state-of-the-art for the analysis of metabolomic profiles and has potential use in research related to diseases, such as cancer [15], neurodegenerative [16], autoimmune [17] and periodontal disease [18,19], among others. Several authors [20–22], have observed metabolic profiles associated with dental caries. However, investigations of the salivary metabolic profile through NMR are less used compared to other biofluids, such as urine and plasma [23]. The use of saliva presents a line of research with great potential and a range of opportunities for the future. For all these reasons, the main objective of our study was to identify the metabolomic differences in the saliva of healthy children versus children with active caries lesions and to estimate the predictive capacity of a model based on the salivary metabolomic profile.

2. Materials and methods

The study design is based on case-control. Study participants were obtained from the Pediatric Dentistry Unit of the Malvarrosa and Nazaret Health Centers in Valencia, Spain, between February and May 2022. The subjects were boys and girls between the ages of 6 and 12 who attended for routine check-ups or had been referred by doctors for presenting oral pathologies. Patients with moderate/severe gingivitis, systemic or autoimmune diseases, antibiotic treatment in the last 3 months, disabilities and/or orthodontic wearers were excluded. The parents and/or caregivers of the participants were given an informed consent with all the necessary basic information.

Cases were considered to be those individuals who presented ICDAS II lesions codes III, IV, V and VI after the examination and those patients free of caries or with ICDAS I and II lesions codes were assigned as controls, although the presence of fillings was allowed in the control group, both in permanent dentition as well as temporary dentition.

An examination form was used that has been adapted from the Oral Health Survey recommended by the WHO [24]. Additionally, a question about the occupation of the parents was added, thereby analyzing the social class of the participant. In this regard, the Spanish adaptation of the British Registrar General classification proposed by Domingo and Marcos [25] was used. Likewise, the ICDAS II caries classification method [26] was used for the caries registration of the participants. The means of the epidemiological indices DMFT/S for the permanent dentition and the dmft/s for the temporary dentition were calculated. The ICDAS III-VI/D-G codes were used as cut-off criteria for the calculation of the D/d component.

To determine the sample size, we based ourselves on previous studies similar to ours reported in the literature [20–22,27,28] who presented a sample of between 33 and 57 participants. In addition, using R software and package pwr (function pwr.t.test) a minimum of $n = 29$ has been

estimated in each group for a comparison scenario between two normalized means (cases vs controls) with the assumptions of a significance level=0.05, power=0.8 and a Cohen's $d = 0.7$ (moderate to high effect size). The sample size of the study is made up of 31 cases and 37 controls.

The study was approved by the local Ethics Committees in Research (Registration No. 1,885,726 and No. 2022/008), complying with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and the current regulations on personal data protection.

Authorization to participate in the study was requested through an Informed Consent from the parents and/or guardians. All the participants were examined by a single examiner (an experienced dentist) in the dental surgeries of the public health centers, thereby guaranteeing optimal conditions concerning lighting, ergonomics, and the control of the setting.

2.1. Collection of salivary samples

Saliva samples were collected following the same general instructions described in the literature [20,21,29]. The samples were collected in a quiet environment and during the same time range in the afternoon to avoid fluctuations in the results. The instructions included not consuming food and/or liquids two hours before sample collection and not performing any oral hygiene on the day of the appointment to avoid any exogenous element that could interfere with the results.

The collection of the unstimulated saliva sample has been obtained through the “□draining method,” in which the patient sits in a resting position; they then tilt their head slightly forward and open their lips slightly, allowing saliva to fall passively into a sterilized 1.5 ml Eppendorf tube [29,30]. The storage and handling of the samples were strictly standardized, keeping them at -20°C in portable refrigerators and then transferred and stored in a deep freezer at -80°C until the day the NMR measurements were conducted.

2.2. Acquisition and processing of data with nmr

Saliva samples were thawed and then centrifuged in a Sigma 1–14 minicentrifuge at 14,800 rpm for 5 min. 55 μ L of a KH_2PO_4 solution (1.5 M) / trimethylsilylpropanoic acid-d4 (TSP, 5.8 mM) in D_2O was added to 495 μ L of saliva. A total of 500 μ L of the previous mixture was introduced into a 5 mm NMR tube.

Spectra were acquired on a Bruker Avance III DRX 600 spectrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany) operating at a ^1H frequency of 600.13 MHz. For all samples, a single-pulse experiment with water presaturation was acquired, 3 min duration, 64 replicates, 65,000 points, 2 s relaxation time, and 3.94 s acquisition time at a nominal temperature of 298 K. The width for all spectra was set to 8000 Hz. Before the Fourier data transformation, each of the free induction decay signals (FID_c) was multiplied by □0.3 Hz of exponential line-broadening.

2.3. Spectra processing

Using the MestReNova 10 software (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spain) a manual phase correction, a baseline adjustment was applied to each spectrum, and the chemical shift was referenced to the TSP signal (0 ppm).

2.4. Assignment and integration of spectra

The signals of the spectra were assigned according to the references given in the available literature [18], of the specialized databases: The Human Metabolome Database [31] and the database spectral data set included in the fitting and quantification program contained in Chenomx NMR Suite 8.1 (Chenomx Inc, Alberta, Canada). The concentration of the metabolites was expressed in normalized concentration units

Table 1
Baseline characteristics of cases and controls. Cut-off criteria for epidemiological indices ICDAS code 3–6/D-G. *p-significant value < 0.05.

	CONTROL n = 37 Mean [IC-95%]/ n (%)	CASE n = 31 Mean [IC-95%]/ n (%)	Test
Age	8.70 [7.92 – 9.47]	8.93 [8.32 – 9.54]	Mann-Whitney's U p = 0.671
Sex	M = 18 (48.6) [33.5 – 64.1] F = 19 (51.4) [35.9 – 66.6]	M = 16 (51.6) [34.8 – 68.0] F = 15 (48.4) [32.0 – 65.2]	χ^2 test p = 0.808 Fisher p = 1
SES	A = 13 (35.1) [21.8 – 51.2] B = 17 (45.9) [31.0 – 61.6] C = 7 (18.9) [9.5 – 34.2]	A = 7 (22.6) [11.4 – 40.0] B = 13 (41.9) [26.4 – 59.2] C = 11 (35.5) [21.1 – 53.1]	χ^2 p = 0.257
DMFS	0.30 [0 – 0.63]	2.0 [0.88 – 3.12]	Mann-Whitney's U p = < 0.001*
dmfs	0.35 [0 – 0.78]	4.68 [3.14 – 6.22]	Mann-Whitney's U p = < 0.001*
DMFT	0.11 [0 – 0.24]	1.13 [0.67 – 1.59]	Mann-Whitney's U p = < 0.001*
dmft	0.19 [0 – 0.44]	2.84 [2.04 – 3.64]	Mann-Whitney's U p = < 0.001*

SES (Socioeconomic status): A (codes I and II), B (codes III and IVa) and C (codes IVb, V and VI). M (Male). F (Female).

to the sum of the total metabolic content, in order to make all the samples directly comparable with each other.

2.5. Statistical analysis

The statistical analysis of the quantitative and qualitative variables was conducted with the IBM SPSS v 29 program. For the quantitative variables, their means were estimated, while for the qualitative variables their percentages were calculated and in accordance with 95% confidence intervals for both. For the comparisons of the means after checking for normality with the *Kolmogorov-Smirnoff* and *Shapiro-Wilk* tests, the Student's t-test for independent parametric samples and the *Mann-Whitney U* test for independent non-parametric samples were used. Likewise, for the comparison between proportions, the χ^2 test and *Fisher's* exact test were used. The statistical significance level was established for a p-value <0.05. In addition, to estimate the magnitude of the effect size between two normalized means, Cohen's d was used, which represents the number of standard deviations that separate two groups. A small effect size is interpreted when $d = 0.2$; medium effect size $d = 0.5$ and large effect size when $d > 0.8$.

For the chemometric analysis, the MATLAB 2019b program (Math-Works, Natick, United States) was used. The models have been built using proprietary routines in Matlab and the PLS_Toolbox package (Eigenvector Research, Inc.). An unsupervised Principal Component Analysis (PCA) was applied to the data sets obtained by NMR for the global study of the samples, evaluating the homogeneity within the groups and identifying possible atypical samples. Likewise, a supervised analysis was conducted using a Partial Least Squares-Discriminant

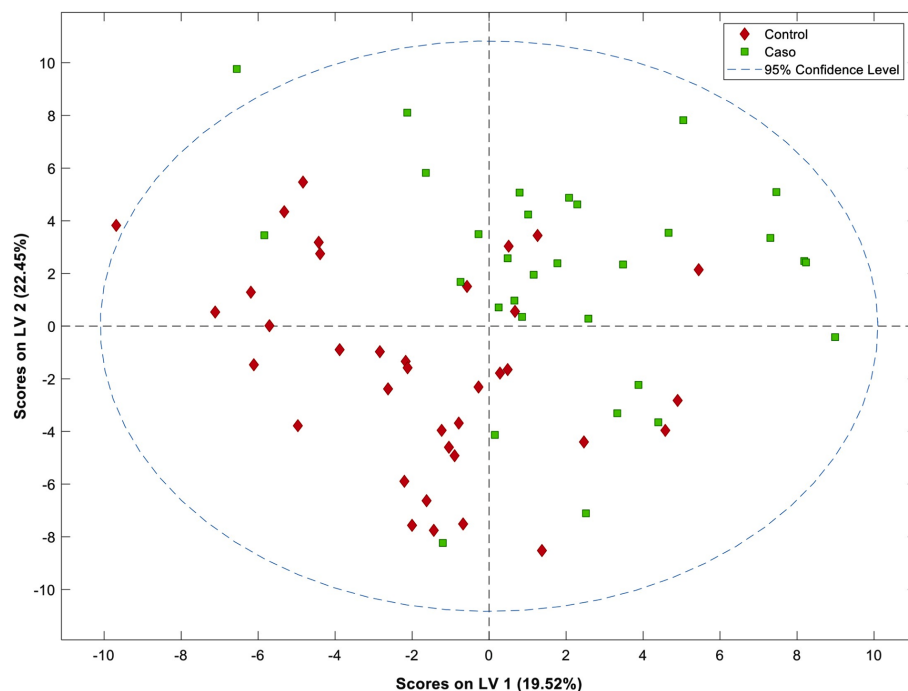


Fig. 1. Scatter plot of the first and second latent variables (LV 1 and LV 2) of the PLS-DA of the saliva samples analyzed. Controls are represented in red with a diamond shape, and cases in green with a square shape. The circumference surrounding the samples (—) represents a 95% confidence level. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

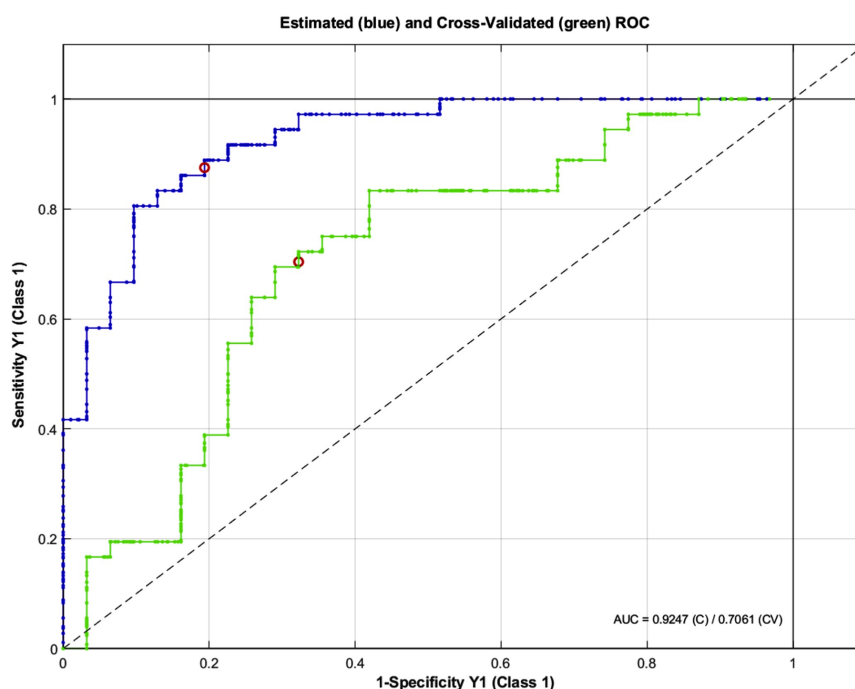


Fig. 2. ROC curves given by the cross-validation of the PLS-DA model that discriminates between cases and controls. The Y axis represents sensitivity, and the X axis symbolizes specificity. The line marked as (—) from point 0,0 to point 1,1 is the so-called reference diagonal.

Analysis (PLS-DA), which facilitates the detection of subgroups and the spectral regions that have the greatest contribution to the separation between them. From the previous model, a list was obtained with the K-variables used in the model and their corresponding VIP value (Variable Importance to Projection). Descriptors with VIP values > 1 were considered to be the ones that contributed the most to the discrimination between the study groups. The chemometric models were cross-validated using 10-fold Venetian blinds to evaluate the accuracy of each classification model. In each run, one sample of the data is left out of the training calculations and used to test the model. The whole cross validation process was run 10 times. The area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve for discrimination between cases and controls was calculated using all the variables included in the predictive model.

3. Results

The mean age of the subjects/patients was 8.8 years, and no significant differences were observed between cases and controls for age, sex, or socioeconomic status. Regarding the caries indices in the permanent dentition, mean DMFS and DMFT, and in temporary dentition, dmft and dmfs, statistically significant differences were observed for the two study groups (Table 1).

Principal component analysis did not show a distribution indicating a spontaneous separation between cases and controls (one outlier sample was excluded). However, using the PLS-DA analysis, a model was built based on the two latent variables (LV1 and LV2) that explain 41.9% of the total variability. In Fig. 1, the PLS-DA shows a considerable tendency to separate in relation to the two groups with a slight overlap,

mainly in the central area of the Fig. 1.

The discriminative capacity of the model was analyzed using a Venetian blind cross-validation, represented by ROC curves. The blue curve represents the training values, while the green curve represents the cross-validation. The area under the ROC curve (AUC) had a value of 0.7061 (Fig. 2) and a sensitivity of 0.72 and specificity of 0.68.

Fig. 3 shows the metabolites that show a significant difference between cases and controls (p -value < 0.1), among which are identified: 3-methyl-2-oxovalerate, 3-hydroxybutyrate, lactate, acetone, citrate, ornithine, ethanolamine, proline, 1-6-Anhydro- β -D-glucose, citraconate, glycine, glucose, taurine, and mannose.

Table 2 shows the mean normalized concentrations of the metabolites, observing glycine and glucose with higher means in the control group compared to the cases. Values for glycine of 1.66E^{-2} versus 1.48E^{-2} (p -value = 0.039) and glucose of 8.10E^{-4} versus 5.98E^{-4} (p -value = 0.015) are recorded, respectively. Additionally, a Cohen's d of 0.430 for glycine and 0.546 for glucose is indicated; these values refer to a medium effect size. Similarly, it should be noted that the load analysis of the PLS-DA revealed that glucose was the one that obtained the highest VIP value within the metabolites analyzed.

On the contrary, both taurine and mannose show more increments in the means in the cases compared to the controls. Thus, in taurine 6.21E^{-3} versus 5.16E^{-3} (p -value = 0.029) and in mannose 2.78E^{-4} versus 1.80E^{-4} (p -value = 0.034), respectively. Cohen's d shows values of -0.474 for taurine and -0.456 for mannose, indicating a medium effect size. Likewise, mannose and taurine contributed significantly in the PLS-DA discriminative model, obtaining second and third place, respectively, within the set of metabolites with VIP values > 1 (Table 2).

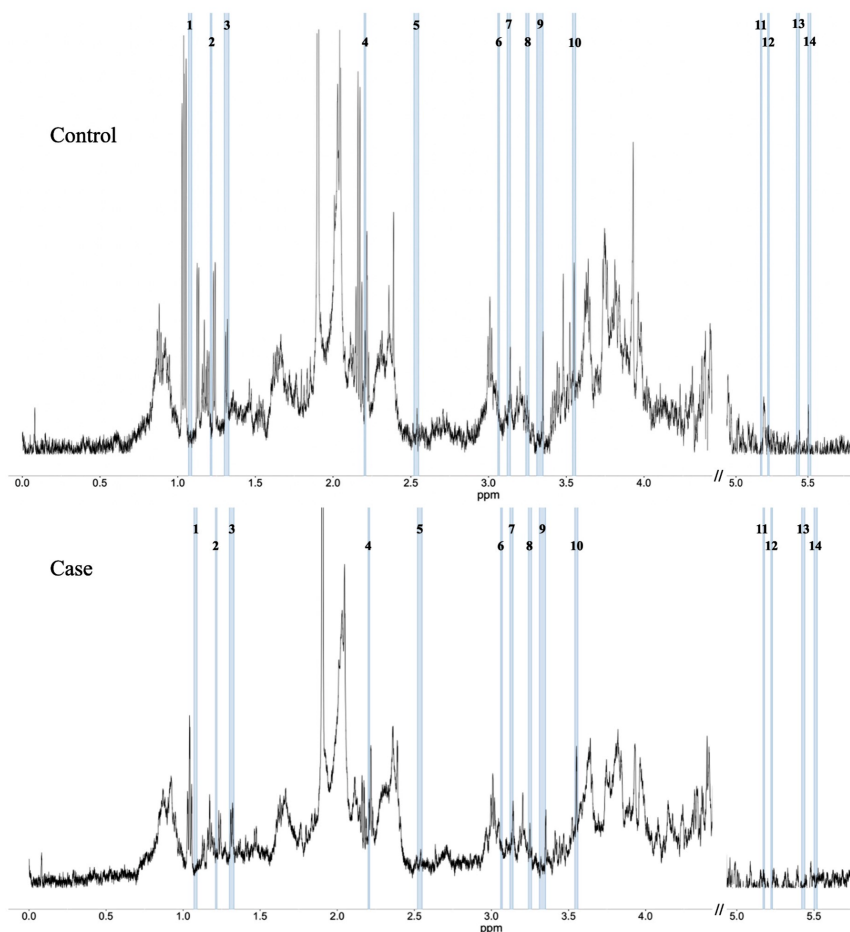


Fig. 3. Representation of the ^1H NMR spectrum of the total saliva of a control and of a case, respectively. Assignments of metabolites with p-value < 0.1 are noted; 1. 3-methyl-2-oxovalerate 2. 3-hydroxybutyrate 3. Lactate 4. Acetone 5. Citrate 6. Ornithine 7. Ethanolamine 8. Taurine 9. Proline 10. Glycine 11. Mannose 12. Glucose 13. 1-6- Anhydrous- β -D-glucose 14. Citrateonate.

4. Discussion

Our results show that mannose, glucose, glycine, and taurine showed a statistically significant difference between cases and controls (p-value < 0.05). A lower glucose concentration is observed in the cases group, coinciding with Fidalgo et al., who state that patients with active caries present a decrease in saccharide concentration [20]. Similarly, other studies [6,32] report an increase in the metabolic activity of carbohydrates in patients with caries, such as glucose and galactose. On the contrary, mannose presented higher levels in cases compared to controls, similar to the result of another study [22], which found a specific increase in monosaccharides in the group of patients with caries.

On the other hand, unlike the results found in other investigations that report higher lactate concentrations in patients with caries [20,27,33], our work shows an inverse trend, registering higher levels of lactate in the controls. Gardner et al. [34], suggest in their study that, in the

absence of carbohydrate exposure, the entry of lactate into total saliva comes from the surrounding plasma circulation and that its concentration has no correlation with the load of saccharolytic bacteria.

Due to the results presented, it is essential to exercise caution in the interpretation of carbohydrates and their final products, since there are numerous factors that influence their availability at the salivary level, food intake being one of the factors that could contribute the most to the observed differences [35,36].

Regarding free amino acids, specific differences of proline and glycine have been observed, indicating a presence of proline and an absence of glycine in caries patients [37]. The reason for a higher presence of proline in carious patients could be due to degradation of the dentin collagen matrix by oral bacteria [37,38]. However, these results have not been consistent with other investigations [27,32]. Our results show lower proline levels in children with caries, coinciding with the data reported by Kim et al. [33].

Table 2

Units of normalized concentrations of the significant metabolites in the PLS-DA model. Standard deviation (SD). *Significant p-value < 0.05.

Metabolite	Group	Mean	SD	t-test	Cohen's d	VIP value
Ornithine	Control	0.00260777	0.00049218	$p = 0.100$	0.317	1.172
	Case	0.00246085	0.00042594			
Ethanolamine	Control	0.00640498	0.00131409	$p = 0.084$	0.341	1.309
	Case	0.00592010	0.00153530			
Acetone	Control	0.00790822	0.00172945	$p = 0.100$	0.318	1.350
	Case	0.00742218	0.00125860			
Citrate	Control	0.00400269	0.00118783	$p = 0.062$	0.381	1.424
	Case	0.00358411	0.00098286			
Proline	Control	0.00717827	0.00266946	$p = 0.054$	0.385	1.436
	Case	0.00633275	0.00146542			
3-hydroxybutyrate	Control	0.00258800	0.00050339	$p = 0.059$	-0.389	1.509
	Case	0.00281605	0.00067029			
1-6-Anhydro- β -D-glucose	Control	0.00015982	0.00031113	$p = 0.087$	0.337	1.510
	Case	0.00005264	0.00032517			
Citrateonate	Control	0.00025105	0.00047020	$p = 0.056$	0.383	1.538
	Case	0.00009655	0.00030881			
Glycine	Control	0.01661271	0.00480035	$p = 0.039^*$	0.430	1.701
	Case	0.01480133	0.00341291			
3-methyl-2-oxovalerate	Control	0.00213939	0.00039588	$p = 0.052$	-0.404	1.858
	Case	0.00232668	0.00053128			
Lactate	Control	0.01528647	0.01064428	$p = 0.070$	0.353	2.004
	Case	0.01218975	0.00589646			
Taurine	Control	0.00516801	0.00117081	$p = 0.029^*$	-0.474	2.045
	Case	0.00621135	0.00298487			
Mannose	Control	0.00018038	0.00019347	$p = 0.034^*$	-0.456	2.658
	Case	0.00027808	0.00023581			
Glucose	Control	0.00081049	0.00040157	$p = 0.015^*$	0.546	2.900
	Case	0.00059827	0.00037268			

Regarding glycine, the controls presented higher levels versus the cases, obtaining a statistically significant difference, a situation that could correspond to the protective role that has been associated with the presence of glycine in saliva and the reduction of the risk of caries [37]. On the other hand, significantly elevated levels of taurine are detected in the group of cases, as reported by Pereira et al. [22], therefore, it is suggested that future research focus on confirming this metabolite as a potential caries biomarker.

It has been observed ever since the first investigations in this field that there is an association between short-chain fatty acids (SCFAs), i.e., acetate, propionate and butyrate, and caries activity [39], with altered levels reported, both in biofilm [28,40] and in saliva [20–22]. Our results also support a difference, observing higher levels of these metabolites in the group of cases. This could reflect a higher proteolytic and/or saccharolytic bacterial load in the cases, considering that the concentration of SCFA in total saliva has a strong correlation with the bacterial load of the host [34].

Based on the literature, a greater presence of fatty acids should be observed in the patients belonging to the case group [20,21,33,41], however and in line with what was reported by Schulz et al. [27], this variation was not found in our results. One hypothesis about the difference in results may be due to certain salivary characteristics, such as lipolytic activity, which could modulate the profiles of fatty acids in saliva, generating inter-individual variation [42,43].

The predictive capacity of our model, obtained based on the 25 metabolites that contributed the most (VIP value >1), proved to be moderate [44], with an AUC value of 0.71. A similar value was obtained by Li et al. [32], reaching an AUC value of 0.73.

Among the main limitations of our study, we would find a small sample size, although similar to the rest of the publications with which it can be compared [20–22,33], its cross-section, as well as the impossibility of verifying compliance with the indication not to consume food or drinks before sample collection. It is important to highlight that the interpretation of the final products of carbohydrates must be done carefully, due to the discrepancies of their results in the different investigations.

5. Conclusions

The present study found significant differences in the salivary metabolic composition between the groups, particularly found higher levels of taurine and mannose in the cases, and glycine and glucose in the controls, nevertheless, it should be considered that these results do not have the capacity to be directly translated into clinical use as a biomarker. Furthermore, it is worth noting the possible protective effect of glycine against dental caries and the potential use of taurine as a potential caries risk biomarker should be considered in future research.

CRedit authorship contribution statement

Oscar Musalem-Dominguez: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing. **José María Montiel-Company:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – review & editing, Project administration. **Verónica Ausina-Márquez:** Investigation, Resources, Writing – review & editing. **José Manuel Morales-Tatay:** Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. **José Manuel Almerich-Silla:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are especially grateful to Dr. Isabel Ferrer at the Nazaret Health Center, for providing and caring for study patients. We would also like to thank all the children and families for their collaboration and time.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- [1] V. Machiulskiene, G. Campus, J.C. Carvalho, I. Dige, K.R. Ekstrand, A. Jablonski-Momeni, M. Maltz, D.J. Manton, S. Martignon, E.A. Martinez-Mier, N.B. Pitts, A. G. Schulte, C.H. Splieth, L.M.A. Tenuta, A. Ferreira Zandona, B. Nyvad, Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and cariology research group of IADR, *Caries Res.* 54 (2020) 7–14, <https://doi.org/10.1159/000503309>.
- [2] R.A. Giacaman, C.E. Fernández, C. Muñoz-Sandoval, S. León, N. García-Manríquez, C. Echeverría, S. Valdés, R.J. Castro, K. Gambetta-Tessini, Understanding dental caries as a non-communicable and behavioral disease: management implications, *Front. Oral Health* 3 (2022), 764479, <https://doi.org/10.3389/froh.2022.764479>.
- [3] World Health Organization, Global Oral Health Status report: Towards Universal Health Coverage For Oral Health By 2030, Geneva, 2022.
- [4] B.W. Chaffee, P.H. Rodrigues, P.F. Kramer, M.R. Vitolo, C.A. Feldens, Oral health-related quality-of-life scores differ by socioeconomic status and caries experience, *Community Dent. Oral Epidemiol.* 45 (2017) 216–224, <https://doi.org/10.1111/cdoe.12279>.
- [5] B. Nyvad, N. Takahashi, Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases, *J. Oral Microbiol.* 12 (2020), 1710953, <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1710953>.
- [6] Y. Wang, Y. Zhang, T. Pan, H. Lin, Y. Zhou, Metabolic differences of the oral microbiome related to dental caries – A pilot study, *Arch. Oral. Biol.* 141 (2022), 105471, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105471>.
- [7] G.B. Proctor, The physiology of salivary secretion, *Periodontol* 2000 70 (2016) 11–25, <https://doi.org/10.1111/prd.12116>.
- [8] A.M.L. Pedersen, C.E. Sørensen, G.B. Proctor, G.H. Carpenter, J. Ekström, Salivary secretion in health and disease, *J. Oral Rehabil.* 45 (2018) 730–746, <https://doi.org/10.1111/joor.12664>.
- [9] A. Sengupta, P. Narad, *Metabolomics*, in: P. Arivaradarajan, G. Misra (Eds.), *Metabolomics, Omics Approaches, Technologies and Applications: Integrative Approaches For Understanding OMICS Data* (2018) 75–97.
- [10] D.S. Wishart, NMR metabolomics: a look ahead, *J. Magnetic Resonance* 306 (2019) 155–161, <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.013>.
- [11] A.H. Emwas, R. Roy, R.T. McKay, L. Tenori, E. Saccenti, G.A.N. Gowda, D. Raftery, F. Alahmari, L. Jaremkó, M. Jaremkó, D.S. Wishart, NMR spectroscopy for metabolomics research, *Metabolites* 9 (2019) 123, <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>.
- [12] W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, H.J. Atherton, R. Goodacre, J.L. Griffin, Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 387–426, <https://doi.org/10.1039/b906712b>.
- [13] S.P. Putri, S. Yamamoto, H. Tsugawa, E. Fukusaki, Current metabolomics: technological advances, *J. Biosci. Bioeng.* 116 (2013) 9–16, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.004>.
- [14] D.S. Wishart, Advances in metabolite identification, *Bioanalysis* 3 (2011) 1769–1782, <https://doi.org/10.4155/bio.11.155>.
- [15] J. Mikkonen, S. Singh, R. Akhi, T. Salo, R. Lappalainen, W. GonzalezArriagada, M. Ajudarte Lopes, A. Kullaa, S. Myllymaa, Potential role of nuclear magnetic resonance spectroscopy to identify salivary metabolite alterations in patients with head and neck cancer, *Oncol. Lett.* 16 (2018) 6795–6800, <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9419>.
- [16] A. Yilmaz, T. Geddes, B. Han, R.O. Bahado-Singh, G.D. Wilson, K. Imam, M. Maddens, S.F. Graham, Diagnostic biomarkers of alzheimer's disease as identified in saliva using 1H NMR-based metabolomics, *J. Alzheimer's Dis.* 58 (2017) 355–359, <https://doi.org/10.3233/JAD-161226>.
- [17] G. Setti, V. Righi, A. Mucci, L. Panari, G. Bernardelli, E. Tarentini, A. Gambini, U. Consono, L. Generali, C. Magnoni, M. Meleti, G. Sandri, P. Bellini, Metabolic Profile of Whole Unstimulated Saliva in Patients with Sjögren's Syndrome, *Metabolites* 13 (2023) 348, <https://doi.org/10.3390/metabo13030348>.
- [18] A. García-Villaescusa, J.M. Morales-Tatay, D. Monleón-Salvado, J.M. González-Darder, C. Bellot-Arcis, J.M. Montiel-Company, J.M. Almerich-Silla, Using NMR in saliva to identify possible biomarkers of glioblastoma and chronic periodontitis, *PLoS One* 13 (2018), e0188710, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188710>.
- [19] K. Gawron, W. Wojtowicz, K. Łazarz-Bartyzel, A. Łamasz, B. Qasem, P. Mydel, M. Chomyszyn-Gajewska, J. Potempa, P. Mlynarz, Metabolomic status of the oral cavity in chronic periodontitis, *In Vivo (Brooklyn)* 33 (2019) 1165–1174, <https://doi.org/10.21873/invivo.11587>.
- [20] T.K.S. Fidalgo, L.B. Freitas-Fernandes, R. Angeli, A.M.S. Muniz, E. Gonsalves, R. Santos, J. Nadal, F.C.L. Almeida, A.P. Valente, I.P.R. Souza, Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions, *Metabolomics* 9 (2013) 657–666, <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0484-7>.
- [21] T.K.S. Fidalgo, L.B. Freitas-Fernandes, F.C.L. Almeida, A.P. Valente, I.P.R. Souza, Longitudinal evaluation of salivary profile from children with dental caries before and after treatment, *Metabolomics* 11 (2015) 583–593, <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0717-z>.
- [22] J.L. Pereira, D. Duarte, T.J. Carneiro, S. Ferreira, B. Cunha, D. Soares, A.L. Costa, A. M. Gil, Saliva NMR metabolomics: analytical issues in pediatric oral health research, *Oral Dis.* 25 (2019) 1545–1554, <https://doi.org/10.1111/odi.13117>.
- [23] A. Gardner, H.G. Parkes, G.H. Carpenter, P.W. So, Developing and standardizing a protocol for quantitative proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR) spectroscopy of saliva, *J. Proteome Res.* 17 (2018) 1521–1531.
- [24] World Health Organization, Oral Health Surveys: Basic Methods, 5th ed., Geneva, 2013.
- [25] A. Domingo Salvany, J. Marcos Alonso, Propuesta de un indicador de la «clase social» basado en la ocupación, *Gac. Sanit.* 3 (1989) 320–326.
- [26] International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) Coordinating Committee, Criteria Manual: International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II), Baltimore, Maryland, 2011.
- [27] A. Schulz, R. Lang, J. Behr, S. Hertel, M. Reich, K. Kümmerer, M. Hannig, C. Hannig, T. Hofmann, Targeted metabolomics of pellicle and saliva in children with different caries activity, *Sci. Rep.* 10 (2020) 697, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57531-8>.
- [28] K. Havsd, M. Stensson, H. Jansson, M. Carda-Díez, A. Pedersen, J. Neilands, G. Svensäter, A. Mira, Bacterial composition and metabolomics of dental plaque from adolescents, *Front. Cell Infect. Microbiol.* 11 (2021) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.716493>.
- [29] P. López Jornet, Capítulo 5. Técnicas de exploración salival: sialometría, in: J. V. Bagán Sebastián, Y. Jiménez Soriano (Eds.), *Fisiopatología De Las Glándulas Salivales*, Medicina oral S. L., Valencia, 2010, pp. 67–79.
- [30] Y. Priya, M. Prathibha, Methods of collection of saliva - a review, *Int. J. Oral Health Dentistry* 3 (2017) 149–153, <https://doi.org/10.18231/2395-499X.2017.0032>.
- [31] D.S. Wishart, A. Guo, E. Oler, F. Wang, A. Anjum, H. Peters, R. Dizon, Z. Sayeeda, S. Tian, B.L. Lee, M. Berjanskii, R. Mah, M. Yamamoto, J. Jovel, C. Torres-Calzada, M. Hiebert-Giesbrecht, V.W. Lui, D. Varshavi, D. Varshavi, D. Allen, D. Arndt, N. Khetarpal, A. Sivakumaran, K. Harford, S. Sanford, K. Yee, X. Cao, Z. Budinski, J. Liigand, L. Zhang, J. Zheng, R. Mandal, N. Karu, M. Dambrova, H.B. Schiöth, R. Greiner, V. Gautam, HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022, *Nucleic. Acids. Res.* 50 (2022) D622–D631, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062>.
- [32] K. Li, J. Wang, N. Du, Y. Sun, Q. Sun, W. Yin, H. Li, L. Meng, X. Liu, Salivary microbiome and metabolome analysis of severe early childhood caries, *BMC Oral Health* 23 (2023) 30, <https://doi.org/10.1186/s12903-023-02722-8>.
- [33] S. Kim, Y. Song, S. Kim, S. Kim, H. Na, S. Lee, J. Chung, S. Kim, Identification of a biomarker panel for diagnosis of early childhood caries using salivary metabolic profile, *Metabolites* 13 (2023) 356, <https://doi.org/10.3390/metabo13030356>.
- [34] A. Gardner, H.G. Parkes, P.W. So, G.H. Carpenter, Determining bacterial and host contributions to the human salivary metabolome, *J. Oral Microbiol.* 11 (2019), 1617014.
- [35] H.A.B. Linke, S.J. Moss, L. Arav, P.M. Chiu, Intra-oral lactic acid production during clearance of different foods containing various carbohydrates, *Z. Ernährungswiss.* 36 (1997) 191–197, <https://doi.org/10.1007/BF01611399>.
- [36] Z.T. Dame, F. Aziat, R. Mandal, R. Krishnamurthy, S. Bouatra, S. Borzouie, A. C. Guo, T. Sajed, L. Deng, H. Lin, P. Liu, E. Dong, D.S. Wishart, The human saliva metabolome, *Metabolomics* 11 (2015) 1864–1883, <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0840-5>.
- [37] C.S.R. Fonteles, M.H. Guerra, T.R. Ribeiro, D.N. Mendonça, C.B.M. de Carvalho, A. J. Monteiro, D.O. Toyama, M.H. Toyama, M.C. Fonteles, Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries, *Arch. Oral. Biol.* 54 (2009) 80–85, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.07.011>.
- [38] H.H. Hughston, L.S. Earle, F. Binkley, Amino acid composition of proteins of human dentin, *J. Dent. Res.* 38 (1959) 323–327, <https://doi.org/10.1177/00220345590380021401>.
- [39] C.J.L. Silwood, E.J. Lynch, S. Seddon, A. Sheerin, A.W.D. Claxson, M.C. Grootveld, 1H-NMR analysis of microbial-derived organic acids in primary root carious lesions and saliva, *NMR Biomed.* 12 (1999) 345–356, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1492\(199910\)12:6<345::AID-NBM580>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1492(199910)12:6<345::AID-NBM580>3.0.CO;2-C).
- [40] T. da Costa Rosa, A. de Almeida Neves, M.A. Azcarate-Peril, K. Divaris, D. Wu, H. Cho, K. Moss, B.J. Paster, T. Chen, L.B. Freitas-Fernandes, T.K.S. Fidalgo, R. Tadeu Lopes, A.P. Valente, R.R. Arnold, A. de Aguiar Ribeiro, The bacterial microbiome and metabolome in caries progression and arrest, *J. Oral Microbiol.* 13 (2021), 1886748, <https://doi.org/10.1080/20002297.2021.1886748>.
- [41] Y. Tomita, N. Miyake, S. Yamanaka, Lipids in human parotid saliva with regard to caries experience, *J. Oleo Sci.* 57 (2008) 115–121, <https://doi.org/10.5650/jos.57.115>.
- [42] M. Reich, K. Kümmerer, A. Al-Ahmad, C. Hannig, Fatty acid profile of the initial oral biofilm (Pellicle): an in-situ study, *Lipids* 48 (2013) 929–937, <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3822-2>.
- [43] E. Neyraud, S. Cabaret, H. Brignot, C. Chabanet, H. Labouré, E. Guichard, O. Berdeaux, The basal free fatty acid concentration in human saliva is related to salivary lipolytic activity, *Sci. Rep.* 7 (2017) 5969, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06418-2>.
- [44] M.J. Burguenó, J.L. García-Bastos, J.M. González-Buitrago, Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas, *Med. Clin. (Barc)* 108 (1995) 34–35.

Anexo IX: Supplementary Summary

Overview of Saliva

The understanding of salivary physiology in humans began to receive scientific scrutiny in the early 20th century. Carlson and Crittenden (1910) developed the first saliva collection system, which involved obtaining saliva secreted by the parotid gland. This paved the way for subsequent advancements in this field, leading to studies related to salivary flow (Becks and Wainwright, 1943), salivary collection systems for sublingual, submandibular glands (Schneyer, 1955), minor salivary glands (Dawes and Wood, 1973), as well as investigations into saliva composition (Thaysen et al., 1954) and salivary secretion mechanisms.

Saliva is a complex biofluid composed of elements derived from oral mucosa, crevicular fluid, microorganisms, and other exogenous compounds. It provides insights into the host and its interaction with the environment (Ekström et al., 2019; Hemadi et al., 2017; Humphrey and Williamson, 2001; Llana-Puy, 2006; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). To better understand the components and functions of saliva, let's explore the structures involved in its formation and secretion.

Anatomy and Structures of Salivary Glands

Salivary glands are primarily composed of two elements: the parenchyma and the stroma. The parenchyma, or functional portion, consists of the secretory unit of the gland, called the adenomere, and the system of excretory ducts. The adenomere is composed of a set of secretory cells with diverse morphology, which determine the type of salivary secretion to be produced. Based on this, three varieties of adenomers are classified: serous, mucous, and mixed (Arriaga et al., 2019). On the other hand, the ductal system of the major glands, is grouped into intercalated, striated, and excretory ducts. Intercalated ducts form the first network of ducts - originating from each acinus - and play a passive role in the transport of primary saliva. They are followed by striated ducts, originating from the fusion of two or more intercalated ducts; these ducts show active involvement of their cells,

leading to ion exchange that modifies primary saliva into secondary saliva. The last segment of the ductal system is assigned to excretory ducts or collectors, which also play an active role in modifying saliva and ultimately lead it to the oral cavity (Arriaga et al., 2019; Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018). As for the minor glands, they are generally distinguished between intra and extralobular ducts (Arriaga et al., 2019).

Additionally, within the basal membrane of the various glands are myoepithelial cells, which surround the secretory cells and sometimes the intercalated ducts (Arriaga et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018). Their primary function is to facilitate the expulsion of secretion from the acinar cells through contraction, which is mediated by stimulation from the Autonomic Nervous System (ANS) (Arriaga et al., 2019; Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Proctor, 2016).

In the meanwhile, the stroma is composed of connective tissue that divides, supports, and encapsulates the glandular parenchyma. Through this supportive tissue, the salivary glands are irrigated and innervated. It also forms septa that divide the parenchyma into lobes and lobules. In the minor glands, this connective tissue is observed amalgamated with the surrounding connective tissue, and there is no true capsule or lobule-lobular architecture (Arriaga et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Peydró Olaya and Carda Batalla, 2010).

Salivary glands are exocrine in nature, like sweat, mammary, and sebaceous glands, and are classified according to their size and functional importance as major and minor salivary glands (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016). Additionally, they can be categorized based on the type of secretion they produce according to their histology: serous, mucous, and mixed glands (Hernández and Taylor, 2020).

Major salivary glands consist of three pairs of bilateral glands, including the parotid, submandibular, and sublingual glands (Contreras-Aguilar and Gómez-

García, 2020; Hemadi et al., 2017; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018). These glands contribute the most in terms of electrolytes and volume (approximately 90%) to unstimulated saliva (Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018).

The parotid gland is the largest in relation to the other two major glands, weighing approximately 25 grams. However, it produces only 20-25% of the total unstimulated whole saliva (UWS) (Humphrey and Williamson, 2001). The acinar cells of the parotid gland produce mainly serous secretion, with very little or no mucin, and rich in enzymes, making it a watery saliva (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016).

The submandibular gland is the second largest and contributes approximately 60% of the UWS (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001). It is a mixed gland, meaning it contains a mixed cellular population of acini that produce a viscous fluid rich in enzymes and mucins (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016).

Finally, the sublingual gland is of mixed secretion (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020), with a predominance of mucous, tending to be more viscoelastic (Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016). This gland contributes 5-10% of the UWS (Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018).

On the other hand, minor salivary glands, named for their size, are located just beneath the surface of the oral mucosa or submucosa and are distributed in different areas of the oral cavity, such as the lower lip, tongue, palate, cheeks, pharynx, and retromolar area (Arriaga et al., 2019; Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). It is estimated that they are responsible for less than 10% of the daily production of UWS, and except for the Von Ebner's lingual glands - which are serous - they are considered to be predominantly mucous in nature due to their secretion rich in mucin (Arriaga et al., 2019; Contreras-Aguilar

and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

Lastly, it is worth noting that some of these minor salivary glands are primarily responsible for producing protective components, such as antibacterial and antimicrobial agents (Hernández and Taylor, 2020). Additionally, they supply most of the blood substances found in saliva, such as C-reactive protein and certain immunoglobulins (Hernández and Taylor, 2020).

Neuronal Regulation Mechanism

Salivary secretion and its various cellular types are closely associated with both functional divisions of the Autonomic Nervous System (ANS), namely its sympathetic and parasympathetic branches (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Proctor, 2016). The activation and functioning of both branches of the ANS result in a synergistic - not antagonistic - interaction that allows for meeting salivary physiological demands (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020). Its regulation occurs through reflexes consisting of an afferent pathway, by salivation nuclei or centers, and an efferent pathway, which leads to the activation of salivary gland cells (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Pedersen et al., 2018).

In the oral cavity, a wide variety of sensory receptors are found, which are activated in response to various stimuli. Taste buds, located in various regions such as the tongue, soft palate, vestibular zones, etc., allow for the identification of tastes such as sweet, bitter, salty, and sour. The latter two generate the greatest stimulation of the gustatory-salivary reflex (Ekström et al., 2019).

On the other hand, mechanoreceptors located in the periodontal ligament and gingival mucosa are stimulated during chewing, activating the masticatory-salivary reflex, which predominantly involves stimulation of the parasympathetic innervation, thereby increasing salivary secretion (Ekström et al., 2019). Additionally, receptors located in the region of the nasal cavity roof, specifically on

the cribriform plate, are olfactory receptors that react to volatile molecules in the nasal and retronasal airflow (Ekström et al., 2019).

Nociceptors can also be activated, for example, during the ingestion of spicy foods or in cases of swallowing dysfunction that cause pain, and in conjunction with mechanoreceptors, they increase salivary secretion (Ekström et al., 2019). Similarly, thermal stimuli can influence the stimulation of salivary secretion, with colder liquids producing a greater volume. Likewise, dryness acts as another stimulus to increase salivary secretion (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018).

Regarding the gustatory-salivary reflex, it sends afferent signals from taste, originating from the activation of chemoreceptors located in the taste buds of the tongue, transmitted by the facial nerve, glossopharyngeal nerve, and vagus nerve to the nucleus of the solitary tract, which then relays interneurons towards the superior and inferior salivary centers (Bagán Sebastián, Gavalda Esteve, et al., 2010; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Excitation through taste allows for the activation of both branches of the ANS (Ekström et al., 2019).

Furthermore, the masticatory-salivary reflex conveys somatosensory impulses induced by the activation of mechanoreceptors in the periodontal ligament, and proprioceptors and/or nociceptors of the oral mucosa. These signals are conducted by the trigeminal nerve to its trigeminal nucleus, which then communicates with the salivary centers and higher brain structures (Bagán Sebastián, Gavalda Esteve, et al., 2010; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

In summary, afferent sensory impulses are transmitted to the salivary centers and higher brain structures, with the intention of subsequently sending excitatory or inhibitory efferent projections to the salivary centers (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018).

Regarding the efferent pathway, it is comprised of parasympathetic and sympathetic secretomotor neurons that innervate the salivary glands. The secretory structures of a gland, i.e., the acini, ducts, and myoepithelial cells, are richly and

regularly innervated by parasympathetic nerves and variably by sympathetic innervation (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018).

On one hand, parasympathetic innervation is responsible for the secretion of large volumes of saliva, while sympathetic innervation generates a generally scant salivary flow (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Consequently, a higher concentration of proteins is reflected in sympathetic saliva compared to parasympathetic saliva (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

The parasympathetic branch of the ANS controls the salivary glands through its superior, inferior, and intermediate salivary centers (Ekström et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020). The superior salivary center is part of the facial nerve, which through its intracranial branch, called the chorda tympani nerve, joins with the lingual nerve, providing efferent parasympathetic fibers to the submandibular ganglion. This ganglion, through its postganglionic nerve fibers, provides innervation to the submandibular and sublingual glands (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016).

On the other hand, the inferior salivary center, belonging to one of the nuclei of the glossopharyngeal nerve (IX cranial nerve), delivers, through its tympanic nerve branch, the preganglionic parasympathetic innervation of the parotid gland to the otic ganglion (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016). Similarly, there are studies suggesting the existence of nerve fibers belonging to the chorda tympani nerve that contribute to preganglionic innervation (Diamant and Wiberg, 1965; Reichert and Poth, 1933). Subsequently, through its postganglionic fibers, specifically through the auriculotemporal nerve, the parotid gland is finally innervated (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Hernández and Taylor, 2020; Proctor, 2016).

Minor salivary glands are provided with efferent parasympathetic nerve fibers from the buccal branch of the mandibular nerve, innervating the glands of the molar, buccal, and labial regions. Similarly, the lingual nerve, responsible for innervating the areas of the lingual glands; finally, the palatine glands regions are innervated by the palatine nerve (Ekström et al., 2019; Proctor, 2016).

The sympathetic salivary centers, located in the upper thoracic segments of the spinal cord (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Proctor, 2016), transmit their efferent pathways through the paravertebral sympathetic trunk, which carries ascending preganglionic fibers from the thoracic ganglion to synapse in the superior cervical ganglion (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Pedersen et al., 2018). Then, the postganglionic fibers branch out, which through the plexus of the external carotid artery and its branches, such as the facial artery, allow them to reach the three pairs of major salivary glands (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019).

However, the anatomical innervation is not yet fully determined, for example, the parotid gland may be innervated by the external carotid artery as an intracranial route (Ekström et al., 2019). The discrepancy described above is because in humans, the neuroanatomical pathways connecting the salivary centers and forebrain structures are not precisely known, with most knowledge derived from animal studies (Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018).

Salivary Secretion Mechanism and Flow

The activation of salivary secretion is mediated by neurotransmitters, primarily acetylcholine (ACh) and noradrenaline (NA), which elicit cholinergic and adrenergic responses, respectively (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020). Additionally, other neuropeptides, such as vasoactive intestinal peptide, nitric oxide, substance P, neuropeptide Y, etc., act as co-transmitters, exerting effects on blood vessels and acinar cells, either inducing secretion themselves or enhancing the effects of classical neurotransmitters. This can result in modifications of protein

and/or fluid secretion (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018).

The receptors targeted by neurotransmitters are located on the cell membrane of acinar cells, specifically on their basolateral surface. NA acts on $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -adrenergic receptors, while ACh acts on muscarinic receptors, mainly on subtypes M1 and M3 (Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

Salivary secretion is an active process that largely depends on energy, enabling the activation of fluid and protein transport from acinar cells. In the formation process, two stages or phases can be identified: primary or initial salivary secretion and secondary or final salivary secretion (Arriaga et al., 2019; Bagán Sebastián et al., 2010).

Regarding the initial process of saliva secretion in the first phase, an increase in intracellular calcium (Ca^{2+}) concentration is required to facilitate the activation of ion transport mechanisms. This is achieved in response to stimulation of muscarinic receptors, especially M1 and M3, mediated by ACh, and stimulation of $\alpha 1$ adrenergic receptor, which evokes a mechanism similar to the activation of M1 and M3 receptors, leading to an increase in intracellular Ca^{2+} (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Most of the salivary fluid production is mediated by acetylcholine, which activates parasympathetic muscarinic receptors (Pedersen et al., 2018).

The increase in Ca^{2+} following receptor stimulation immediately opens chloride (Cl^{-}) and potassium (K^{+}) channels (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018), located in the luminal and basolateral regions of the acinar cell, respectively. This results in potassium efflux, leading to hyperpolarization, creating a driving force for Cl^{-} efflux into the acinar lumen. Additionally, the increase in intraluminal chloride ion concentration creates a negative transepithelial potential difference, which drives sodium (Na^{+}) into the lumen through a paracellular pathway (Ekström et al., 2019).

Furthermore, the resulting high intraluminal concentration of sodium chloride causes an osmotic movement of water into the lumen through both transcellular mechanisms, via water channels - primarily aquaporin 5 - and paracellularly, through passive ultrafiltration transport, allowing water to pass between the cells (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Conversely, at the level of the ducts, water mobility and permeability are very low due to tight junctions between ductal cells (Ekström et al., 2019; Proctor, 2016).

Simultaneously, a transient intracellular acidification occurs, caused by the discharge of bicarbonate ions into the lumen, contributing to a certain extent to the formation of first-phase saliva. However, the epithelial cells of the salivary ducts play a fundamental role in providing bicarbonate to salivary secretion (Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

On the other hand, the process of protein secretion, which is predominantly produced and secreted by acinar cells, occurs through two main mechanisms. The first and primary source of proteins is through exocytosis of proteins stored in granules within acinar cells. This process begins when neurotransmitters, primarily through sympathetic stimulation, act on $\alpha 1$ and $\beta 1$ adrenergic receptors, allowing fusion of the granules with the acinar lumen membrane, resulting in the release of stored proteins into the acinar lumen. Additionally, the vasoactive intestinal peptide receptor, through parasympathetic activation, can also participate in the exocytosis process (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019; Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

The second form is what is called constitutive or vesicular secretion, which involves the release of proteins synthesized by the Golgi complex directly into the lumen through a transporter protein that mobilizes the protein (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Ekström et al., 2019). Although most protein secretion occurs at the acinar level, ductal cells also release various proteins, such as growth factors, immunoglobulins, and kallikrein (Pedersen et al., 2018).

Regarding the second phase of the saliva formation process, there is mainly a modification in primary saliva. This change occurs because the epithelial cells of the duct express transport pathways that favor the absorption of sodium and chloride. The sodium is absorbed from the ductal lumen into the cells through sodium channels located on the apical membrane due to a low intracellular Na^+ concentration. Then, this absorbed Na^+ is removed from the ductal cells to the interstitium through the sodium pump (Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016). Simultaneously, ion transporter proteins on the membrane of ductal cells also absorb Cl^- from the initial saliva. The mechanism, not yet fully resolved, involves the use of chloride channels that enable absorption and its release through basolateral pathways into the interstitium (Pedersen et al., 2018; Proctor, 2016).

In summary, once the acini are stimulated, they produce a primary salivary secretion isotonic with respect to plasma, meaning it is similar to plasma in terms of ionic components, which is accumulated in their lumen. This initial secretion gradually modifies its composition as it progresses through the ductal system, ending in the oral cavity with a final saliva that is hypotonic compared to plasma.

Salivary Components and Functions

The combination of elements composing unstimulated whole saliva is dynamic, dependent, and influenced by a range of physiological stimuli and individual habits or behaviors (Hernández and Taylor, 2020; Tzimas and Pappa, 2023). Moreover, its compounds are multifunctional and work together to fulfill the main salivary functions, which include maintaining oral health and creating an appropriate ecological balance (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001).

Saliva possesses antibacterial and immunity activity by containing both immunological and non-immunological agents that protect teeth and mucosal surfaces. One of the main elements found in total saliva, in high concentration, is immunoglobulin A (IgA), which provides significant protection and immune function against external agents from the environment. IgA neutralizes viruses,

serves as an antibody against bacterial antigens, and even acts as a bacterial aggregator, preventing bacterial adhesion to host tissues (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pappa et al., 2019). Other immunoglobulins present in saliva include IgG and IgM, although they are found in low concentrations and likely originate from gingival crevicular fluid (Humphrey and Williamson, 2001).

On the other hand, non-immunological antibacterial components are found in saliva, providing protection to teeth and mucous membranes. One of these components is lactoferrin, which reacts by depriving bacteria of nutrients, such as iron, thereby generating what is called nutritional immunity (Humphrey and Williamson, 2001). Similarly, lysozyme is present, which destroys and inhibits bacterial growth by disrupting the bacterial cell wall during division; in addition to this, it also promotes the elimination of bacteria through its bacterial aggregation function. Also mucins have a role in selectively modulating microbial adhesion to oral tissues, controlling bacterial and fungal colonization (Humphrey and Williamson, 2001). Additionally, expressed cystatins help inhibit processes of periodontal disease pathogenesis. Similarly, peroxidases catalyze bacterial metabolic byproducts and protect mucous membranes from the oxidative effects of hydrogen peroxide produced by bacteria (Humphrey and Williamson, 2001). Finally, proteins found in saliva, such as glycoproteins, staterins, agglutinins, histidine-rich proteins, and proline-rich proteins, function in bacterial aggregation, preventing bacteria from adhering to the surfaces of hard and soft intraoral tissues (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001).

Another important component within the composition of saliva is epidermal growth factor, which promotes the proliferation and migration of epithelial cells, aiding in wound healing (Hernández and Taylor, 2020; Pedersen et al., 2018). Similarly, fibroblast growth factor is found, acting as a representative of tissue repair (Pedersen et al., 2018).

From a different perspective, saliva also plays a different role in buffering action. This buffering action helps maintain neutral pH ranges of saliva and

promotes and maintains a balanced oral microbiota. It accomplishes this through the provision of bicarbonates, phosphates, urea, and amphoteric proteins and enzymes present in saliva (Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001; Pedersen et al., 2018). The most important buffering system is attributed to bicarbonates, which diffuse into the biofilm and act as acid-neutralizing buffers. These bicarbonates generate ammonia that forms amines, which help neutralize acids. Additionally, as a result of urea metabolism by urease from the biofilm, ammonia is released, further contributing to its buffering action at the level of dental plaque (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Humphrey and Williamson, 2001). While in a state of unstimulated whole saliva, bicarbonate and phosphate buffer systems contribute in similar proportions, when present in a state of stimulated whole saliva (SWS), the bicarbonate system accounts for more than 90% of the total buffering capacity (Pedersen et al., 2018). Therefore, phosphate may be important only during unstimulated saliva flow (Humphrey and Williamson, 2001).

Simultaneously, saliva contributes to lubricating and protecting tissues through elements such as mucins, which provide significant lubrication, creating a film akin to a physical barrier for protection and lubrication against excessive wear or acidic attacks. Specifically, the latter function is attributed to the MG1 subtype mucin. At the same time, saliva facilitates speech, chewing, and swallowing (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001). Likewise, saliva plays a limited but initial role in the digestion process by initiating starch breakdown through the action of salivary amylase. Salivary enzymes, like lingual lipase, also contribute to the digestive process, focusing on fats. In these same capacities, saliva aids in food bolus formation, thanks to its moistening property and its ability to bind food particles, simultaneously facilitating swallowing (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Humphrey and Williamson, 2001).

Finally, one of saliva's most relevant functions is its participation in the dental demineralization-remineralization process. The high concentrations of elements like calcium and phosphate in saliva are maintained stable thanks to staterin, reducing enamel demineralization, and promoting subsurface

remineralization. Additionally, staterin, in collaboration with other proteins in the protective film (histatins, cystatins, and proline-rich proteins), binds to hydroxyapatite on the enamel surface, allowing them to modulate enamel crystalline growth through the remineralization process. This permits the entry and limits the exit of minerals, supporting the balance and maintenance of tooth integrity (Contreras-Aguilar and Gómez-García, 2020; Hernández and Taylor, 2020; Humphrey and Williamson, 2001).

Saliva Collection Methods

Obtaining saliva samples is reasonably straightforward, involving a non-invasive procedure that is comfortable for the patient and ideal for individuals experiencing anxiety about clinical procedures, as well as for children and those with disabilities (Bellagambi et al., 2020; Duarte et al., 2020; Hyvärinen et al., 2021; Pappa et al., 2019; Priya and Prathibha, 2017). Various types of saliva samples can be obtained using different techniques, either from whole saliva or from individual salivary glands, with or without stimulation (Bellagambi et al., 2020; Navazesh, 1993; Priya and Prathibha, 2017).

Unstimulated whole saliva, which is devoid of exogenous stimuli, is a mixture of compounds, including secretions from all salivary glands, shed epithelial cells, microorganisms, crevicular gingival fluid, and so on (Hernández and Taylor, 2020; López Jornet, 2010; Navazesh, 1993). Obtaining this type of saliva has advantages over SWS, as it minimizes metabolite dilution (Bellagambi et al., 2020), avoids contamination by external agents that could distort results (Grootveld et al., 2022), and is considered more representative of the oral environment (Chiappin et al., 2007).

The methods available presently for collecting whole saliva include:

A. Drainage Method: This technique, used since 1934, is considered the gold standard for UWS tests (Bellagambi et al., 2020; Padilla et al., 2020). In this procedure, the patient sits calmly in a resting position, then tilts the head slightly

forward and opens the lips slightly to allow saliva to passively flow into a sterile graduated tube (López Jornet, 2010; Priya and Prathibha, 2017).

B. Spitting Method: General instructions are similar to the previous technique; however, the individual is asked to keep the lips closed and accumulate saliva in the floor of the mouth. Subsequently, the individual is asked to spit the saliva into a sterile graduated container every 60 seconds (Bellagambi et al., 2020; López Jornet, 2010; Navazesh, 1993; Priya and Prathibha, 2017).

C. Aspiration Method: The patient accumulates saliva in the floor of the mouth, and then it is continuously aspirated using micropipettes, syringes, saliva ejectors, or a vacuum pump connected to a graduated tube (López Jornet, 2010; Navazesh, 1993; Priya and Prathibha, 2017).

D. Swab Method: For this technique, a cotton pad or swab or other absorbent material previously weighed and chosen according to the patient's tolerance is used. It is placed at the duct opening of the major salivary glands to soak up saliva. Subsequently, the pad is removed and stored in a sterile container to be weighed later (Bellagambi et al., 2020; López Jornet, 2010; Navazesh, 1993; Priya and Prathibha, 2017).

Overview of Biofilm

The relevance of understanding biofilm formation stems from its significant implications in bacterial infections, which account for approximately 65% of such infections (Dutta et al., 2021; Jamal et al., 2018). In the United States, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimates that biofilms are the causative agent in 60% of all chronic infections.

An estimated annual incidence of biofilm-related infections is around 2 million cases, resulting in approximately 268,000 deaths and generating an economic burden of over USD 18 billion in direct treatment costs (Rumbaugh and Sauer, 2020). These infections include diseases such as dental caries, periodontal disease, otitis media, bacterial prostatitis, valvular endocarditis, among others.

In the oral cavity, the first description of adherent microorganisms obtained from a dental plaque sample dates back to the 17th century when Antonie van Leeuwenhoek observed, through a basic microscope, what he portrayed as animalcules (Costerton, 1999; Donlan and Costerton, 2002; Jamal et al., 2018). Throughout the 20th century, advances in microbiology and its technologies have propelled the understanding of biofilm formation and composition. Consequently, its definition has evolved, considering not only the characteristics observable under a microscope but also the physiological properties of these microorganisms.

Nowdays, a biofilm can be defined as a three-dimensional bacterial community irreversibly adhered to a substrate and/or to each other, immersed in a matrix of exopolysaccharides that it has produced (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Larsen and Fiehn, 2017; Marsh, 2006; Socransky and Haffajee, 2002; Zijnge et al., 2010).

Stages of Biofilm Formation

The formation of dental biofilm is described as a cyclical, sequential, highly regulated process involving at least the following stages.

Initial surface adhesion

Within the mouth, various surfaces such as soft tissues, teeth, restorations, implants, etc., provide substrates for bacterial attachment (Kidd and Fejerskov, 2016; Socransky and Haffajee, 2002). The initial formation of dental biofilm begins with the adhesion of a small group of planktonic bacteria to the solid surface of the tooth, preceded by the formation of the so-called acquired pellicle, primarily composed of host elements including salivary proteins, lipids, glycoproteins, and other macromolecules (Bowen et al., 2018; Chawhuaveang et al., 2021).

The adhesion of microorganisms, predominantly oral streptococci, and gram-positive bacilli, occurs via structures called fimbriae and fibrils, strengthening the interaction between microbial cells and the adhered surface (Dutta et al., 2021; Jamal et al., 2018; Larsen and Fiehn, 2017).

Fimbriae are 2-8 nm diameter filaments composed of protein subunits called fimbrillin, found in oral bacteria such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, among others (Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002).

On the other hand, fibrils are morphologically different and shorter than fimbriae, with a non-uniform distribution on the cell surface; some oral bacteria possessing fibrils include *S. salivarius*, the *S. mitis* group, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *S. mutans* (Socransky and Haffajee, 2002).

Although fimbriae and fibrils are important for the adhesion of certain bacterial species, other factors also contribute to bacterial adherence. Examples include physical forces like van der Waals forces, the solid-liquid interface, or surface hydrophobicity, which strengthen the bond by reducing the repulsive force between bacteria and the surface (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018). Additionally, some species express active motility through flagellar production, increasing the number of initial interactions between bacteria and

surfaces, countering the repulsive forces between them. Furthermore, certain proteolytic enzymes located on cell surfaces facilitate adhesion to solid surfaces (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002). Finally, various factors such as surface type, temperature, and pressure can also influence bacterial adhesion (Gupta et al., 2016).

Subsequently, bacteria that manage to settle and transition to a sessile state change their phenotype and modify specific adhesion genes, allowing them to synthesize new material for the exopolysaccharide matrix and for binding to other bacterial cells. They also exhibit a loss of flagellar gene expression, evolving from reversible to irreversible adhesion (Costerton, 1999; Rumbaugh and Sauer, 2020).

Formation of Microcolonies

Once microorganisms have irreversibly adhered to the solid surface, accumulation begins through cellular cohesion, providing stability for the initiation of microbial cell multiplication and division. This process involves cellular signaling mechanisms and the extracellular matrix, which promote the formation of microcolonies. These microcolonies are considered the fundamental structural units of the biofilm, as they provide cellular proximity that creates an environment conducive to the formation of nutritional gradients, gene exchange, and communication via quorum sensing (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Saini et al., 2011).

Maturation

The biofilm provides bacteria with a closed environment, enabling intercellular communication through the concentration of chemical signaling molecules or autoinducers, which regulate the expression of specific genes. This communication mechanism is known as quorum sensing, which operates through the release of signaling molecules by bacteria (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Larsen and Fiehn, 2017; Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002). Consequently, quorum sensing facilitates the

addition of specific characteristics to biofilms, such as protection against assaults by antibiotic therapies, intervention in the structure of microcolonies—either promoting or discouraging the growth of bacterial species—or modifying bacterial physiological properties (Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002). Recently, evidence suggested the existence of another mode of communication apart from quorum sensing, proposing electrical signals as contributors to bacterial communication (Prindle et al., 2015).

Over time, multiple layers of microcolonies containing various combinations of bacteria are observed, ranging from initial to secondary colonizers. These microcolonies coordinate with each other, benefiting in various ways, such as substrate exchange, distribution of metabolic products, and removal of end metabolic products. An example of this occurs during the degradation of organic matter in anaerobic digestion, where a minimum of three types of bacteria are involved: fermentative bacteria initiate the production of alcohols and acids from organic compounds; acetogenic bacteria then consume these substrates, and methanogens obtain energy by converting acetate, carbon dioxide, and hydrogen into methane (Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018). In other words, the biofilm becomes an environment that facilitates the association of metabolically different but nutritionally interdependent bacteria, using substrates from others for their energy purposes, thus promoting syntrophic association (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Saini et al., 2011).

Following the formation of microcolonies and through quorum sensing, certain important genetic products are expressed for the configuration and maturation of the three-dimensional structure of the biofilm—primarily composed of the extracellular matrix. Additionally, as the biofilm matures, channels between the microcolonies are observed in its architecture, facilitating the distribution of nutrients and the removal of waste from the formed bacterial communities, functioning as a primitive "circulatory" system (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Jamal et al., 2018; Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002).

Biofilm dispersion

Finally, there is a phase of dispersion/detachment of the biofilm, in which adhered bacteria spread, leading to the translocation and colonization of new surfaces. Physical and/or chemical mechanisms are recognized to be involved in this stage (Dutta et al., 2021; Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018; Rumbaugh and Sauer, 2020).

Detachment involves the passive release of microbial cells due to shear forces (deformation in the structure of a substance caused by pressure) or mechanical tension. Within this mechanism, different processes are identified, including grazing, which is a type of bacterial predation; abrasion, caused by the collision of biofilm cells with environmental particles; erosion and "scaling," which result from the loss of biofilm structure, either partially or completely, due to friction generated by fluids (Flemming et al., 2016; Jamal et al., 2018; Rumbaugh and Sauer, 2020).

Furthermore, dispersion involves the active release of sessile cells belonging to the biofilm. Two forms of triggering this process are observed: native dispersal inducers and environmental dispersal inducers. The former occurs in response to signaling molecules self-synthesized by bacterial communities, while the latter is triggered by exposure to factors present in the environment or changing environmental conditions. However, both mechanisms rarely involve more than 80% of the total biomass removal from the biofilm (Flemming et al., 2016; Jamal et al., 2018; Rumbaugh and Sauer, 2020).

Finally, it's worth noting that during this detachment and/or dispersion stage, bacteria aid themselves by increasing the expression of proteins related to flagellar formation, providing them with the opportunity to migrate to a new colonization site, facilitating expansion, and initiating a new cycle of biofilm formation (Gupta et al., 2016; Jamal et al., 2018).

A recent multicenter study has proposed a paradigm shift in our understanding of initial biofilm formation, based on an analysis of the structure and

composition of the salivary microbial community. The study challenges the traditional view that biofilm-initiating bacteria exist primarily in a free-floating state and instead suggests that these bacteria are predominantly present as aggregates. These aggregates, according to the study, act as growth nuclei that expand across the surface, leading to biofilm formation.

This new model deviates from the previously accepted concept of a sequential and ordered bacterial succession. Phylogenetic analysis conducted in the study revealed that these initial biofilm-forming aggregates are composed of a mixed consortium of both aerobic and anaerobic bacteria, including species traditionally categorized as early and late colonizers (Simon-Soro et al., 2022).

Structure and Composition of Biofilm

The biomass of the biofilm is primarily composed of an extracellular matrix, accounting for approximately 65 to 95% of the total volume of the biofilm, while the remaining percentage consists of microorganisms (Dutta et al., 2021; Jamal et al., 2018; Saini et al., 2011).

The pioneering research on glycocalyx or matrix formation in bacteria was conducted at the Forsyth Dental Center by Ronald J. Gibbons in a study on *S. mutans* in the mid-20th century (Costerton et al., 1978). The formation of the matrix by biofilm bacteria is dynamic and dependent on nutrient availability, synthesis and secretion of extracellular material, shear stress, and social and nutritional competition (Bowen et al., 2018; Flemming et al., 2016). Additionally, matrix production involves considerable energy costs; however, it is justified due to its structural and physicochemical importance in biofilm formation and function, ultimately providing beneficial properties to the biofilm (Bowen et al., 2018; Flemming et al., 2016).

The matrix enables the generation of different chemical and nutrient gradients, promoting the creation of microenvironments within the biofilm. In these microenvironments, cooperative and antagonistic interactions will occur in a

heterogeneous environment, aiding in the formation of niches with varying pathogenic potentials (Bowen et al., 2018).

When analyzing the composition of the matrix, various components are found. These include water (97%), proteins (>2%), polysaccharides (1-2%), and other elements in percentages lower than 1%, such as extracellular DNA, RNA, among others (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Jamal et al., 2018).

Extracellular polymeric substances or exopolysaccharides, synthesized by biofilm microorganisms, directly determine, and condition the mechanical properties of the matrix and the physiological activity of organisms within the biofilm (Flemming et al., 2016). Additionally, they contribute to maintaining the integrity of the biofilm. Particularly, extracellular DNA is considered of great importance as it provides structural integrity to the matrix and consequently to the biofilm (Bowen et al., 2018; Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016; Saini et al., 2011). Similarly, the polymers form a scaffold that also grants stability to the biofilm (Bowen et al., 2018; Gupta et al., 2016). Additionally, the development of the polymeric matrix increases adhesion strength to the surface, cohesion, and microcolony formation (Bowen et al., 2018).

On the other hand, in some cases, the matrix acts as a hydrogel retaining water, providing the biofilm with tolerance to desiccation. Additionally, the upper layers of extracellular polymeric substances form a barrier that effectively responds to evaporation. It also supplies essential nutrients, creating a local environment that favors certain microorganisms (Saini et al., 2011; Socransky and Haffajee, 2002).

Finally, it is worth noting that all biofilms contain exopolysaccharides, however, their bacterial composition and extracellular matrix can be diverse. A unique aspect of oral biofilm is that a large portion of the microorganisms composing it can both synthesize and degrade exopolysaccharides (Socransky and Haffajee, 2002).

In summary, the biofilm is a primitive survival mechanism for bacteria immersed in it compared to their planktonic counterparts, expressing outstanding properties such as innate resistance to host immune defenses, increased tolerance to stress situations, resource capture by sorption, retention of enzymes that provide digestive capabilities, formation of social interactions, a higher rate of gene exchange, and an ability to tolerate and/or resist antibiotics (Dutta et al., 2021; Flemming et al., 2016). Additionally, the viscoelastic structure of the biofilm allows for the movement of cells within the matrix and also confers resistance to mechanical tension (Bowen et al., 2018; Flemming et al., 2016; Gupta et al., 2016).

Omics Sciences

The term gene was first used in the early 20th century by W. Ludvig Johannsen, who defined it as a physical and functional unit of biological inheritance. However, it was not until the description of the structure of deoxyribonucleic acid (DNA) by Watson and Crick (1953) that marked the beginning of a new area in biology: the discipline of molecular biology. This branch aims to study biologically significant molecules, such as DNA, exploring in depth their structures and functions.

This milestone indicated the start of a prompt race in the field of molecular biology. After five decades and numerous technological advances, in 2001 (Kandpal et al. 2009), a conflict erupted between two influential scientific groups leading the development of technologies related to the human genome. On one side, the Human Genome Project (HGP), developed by an international consortium, and on the other side, the initiative led by Craig Venter and the private company Celera. Under an agreement between the parties, both entities simultaneously published the first drafts of the sequencing of the human DNA, marking the beginning of what would later be called the "post-genomic era" (Craig Venter et al., 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

From this point on, the information that has been obtained is of enormous magnitude, surpassing human capabilities for analysis. Consequently, it was necessary to create statistical and computational techniques to aid in the interpretation of the results obtained, making bioinformatics an indispensable tool for data integration in the field of biological sciences.

As for the *Era of Omics Sciences*, it began in the late 20th century with the emergence of new technologies and advances related to various areas of basic and applied sciences, such as biochemistry, genetics, molecular biology, and biotechnology (Vailati-Riboni et al., 2017). However, the determination of the complete sequence of the human genome was a pivotal step in the initiation of the

omics sciences field, introducing genomics as one of its early areas of development (Cheng and Pohl, 2007; Narad and Kirthanashri, 2018).

The term "omics" is a neologism derived from English, which in molecular biology is used as a suffix to refer to a field of study that, according to Orfao et al. (2019), encompasses "*a set of technologies that enable the molecular-level study of the various elements that make up biological systems (cells, tissues, individuals) in all their complexity, including the result of the interactions and relationships that occur between the internal components of the individual and the external elements with which it interacts*". This term encompasses different areas of knowledge, primarily including genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics (Figure S1) (Franco-Martínez et al., 2020; Uwiera et al., 2017).

Therefore, omics sciences allow a complete and integrated characterization of normal and pathological biological processes. They also facilitate the discovery of biomarkers that aid in the detection, diagnosis, prognosis, and monitoring of diseases, contributing to the development of precision personalized medicine (Narad and Kirthanashri, 2018; Orfao et al., 2019; Plaza et al., 2017). Additionally, the advancement and intrinsic characteristics of omics sciences have driven a paradigm shift in the approach to and resolution of biomedical problems. They move from a classical reductionist approach, which analyzes the parts of a biological system separately, to a systems biology-based approach, which provides a holistic view and understanding of biological systems (Antonio et al., 2019; Dunn et al., 2011; Orfao et al., 2019).

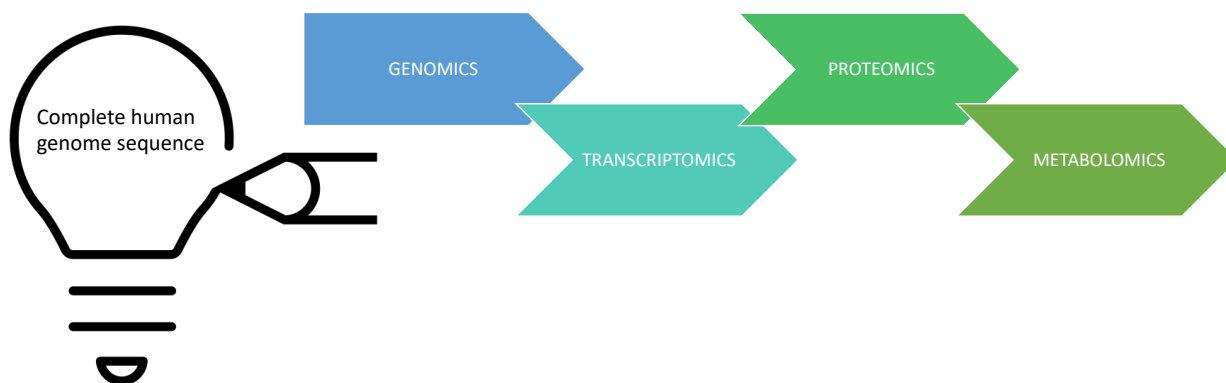


Figure S1. Flow chart of the omics sciences.
Source: Author's elaboration

Regarding biomarkers, it is worth noting that the framework of the International Programme on Chemical Safety, sponsored by the United Nations Environment Programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization (WHO), defines them as *"any substance, structure, or process that can be measured in the body or its products and that influences or predicts the incidence of a health outcome or disease"* (WHO International Programme on Chemical Safety, 2001). Similarly, a working group of the National Institutes of Health in 2001 established that biomarkers are a *"characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathological processes, or pharmacological responses to a therapeutic intervention"* (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

Therefore, biomarkers are objective, quantifiable, and reproducible medical signs detectable in tissues, blood, lymph, saliva, urine, etc., that demonstrate an interaction between a biological system and disease, risk factor, or pharmacological treatment, and their evaluation describes a response of a normal or abnormal biological state of an organism (IOM (Institute of Medicine), 2012; Strimbu and Tavel, 2010; WHO International Programme on Chemical Safety, 1993).

Genomics

Genomics, a term coined by Tom Roderick in 1986 (Narad and Kirthanashri, 2018), refers to the comprehensive study of the structure, organization, functions, and evolution of the genome - a word derived from the conjunction of "gene" and "chromosome" - and how these characteristics determine traits and phenotype expression (Franco-Martínez et al., 2020; Orfao et al., 2019; Vailati-Riboni et al., 2017).

Branches investigated under genomics include structural genomics, aimed at characterizing and locating the sequences that make up DNA, and functional genomics, which aims to assign corresponding functions to identified genes. Consequently, these branches provide an opportunity to understand genome heterogeneity at various levels (Bernal Ruiz, 2015; Orfao et al., 2019; Singh and Datta, 2018).

Its primary goal is to identify the association between a particular trait or phenotype and a specific genetic marker. An example of this is in cancer patients, where circulating tumor DNA in body fluids is studied, allowing for monitoring of tumor burden throughout the process (Franco-Martínez et al., 2020).

Transcriptomics

Transcriptomics is the science that quantitatively and qualitatively studies the markers of total RNA (Ribonucleic Acid) existing in a cell, tissue, or organ, primarily providing information about gene activity at a specific moment and environment (Franco-Martínez et al., 2020; Orfao et al., 2019; Vailati-Riboni et al., 2017). In other terms, this discipline facilitates the understanding and analysis of changes in gene expression through the study of RNA, especially in response to different conditions.

Currently, saliva is widely used for transcriptomic analysis, as messenger RNA and microRNA enter the oral cavity through various sources such as salivary

glands, gingival crevicular fluid, epithelial cell shedding, etc. (Franco-Martínez et al., 2020). This allows for the performance of salivary transcriptomics through various techniques such as Northern-Blot, Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, and DNA Microarrays (Mata et al., 2010). Regarding its use, a significant number of biomarkers for the detection of diseases are described nowadays, such as ovarian cancer (Lee et al., 2012), Zika virus (Hu et al., 2010), Sjögren's syndrome (Hu et al., 2010), among others.

Proteomics

Proteins play a fundamental role in the structure, function, and regulation of living organisms, constituting one of the essential elements of cellular metabolic pathways (Bernal Ruiz, 2015).

The term proteome, coined by Marc Wilkins in 1994, is defined as the characterization of the set of proteins expressed by a cell, tissue, or organism, including their post-translational modifications (Bernal Ruiz, 2015; IOM (Institute of Medicine), 2012; Vailati-Riboni et al., 2017). On the other hand, proteomics refers to the study that allows understanding the functions, expression, and interaction of proteins in biological systems (Barallobre-barreiro et al., 2013; Bernal Ruiz, 2015; Franco-Martínez et al., 2020; Narad and Kirthanashri, 2018; Orfao et al., 2019).

Today, one of the most widely used techniques for the development and consolidation of proteomics is mass spectrometry (MS), which involves ionizing all chemical compounds in a sample, and analyzing the resulting charged molecules - ions - based on their mass-to-charge ratio (m/z), allowing for qualitative and quantitative evaluation of the proteins in a sample (Franco-Martínez et al., 2020; Vailati-Riboni et al., 2017).

In proteomics, three branches can be distinguished: expression proteomics, which is responsible for qualitatively and quantitatively studying protein expression; structural proteomics, which aims to characterize the three-dimensional structure of proteins; and functional proteomics, which plays the role

of locating and determining the subcellular distribution of proteins and the interactions that occur between proteins and other molecules in order to determine their function (Bernal Ruiz, 2015; Orfao et al., 2019).

The application and analysis of proteomics, in general terms, involve the identification of proteins, which, depending on their presence, absence, or alteration, can diagnose and/or predict the progression of a disease. Its current clinical applicability is focused on different types of cancer (Bernal Ruiz, 2015) and research related to metabolic diseases (Cabras et al., 2010; Pappa et al., 2018).

Metabolomics

Human metabolism is controlled by biochemical regulators derived from metabolic processes, known as metabolites. Metabolites are low molecular weight elements - ranging in mass from 50 to 1500 daltons - such as lipids, sugars, amino acids, among others, which act as reactive elements, intermediates, or products of biochemical reactions mediated by enzymes (Dunn et al., 2011; Tzimas and Pappa, 2023). These are present in different types of biological samples, for example, urine, saliva, and plasma (Bernal Ruiz, 2015; Orfao et al., 2019; Sengupta and Narad, 2018; Vailati-Riboni et al., 2017).

That being said, the suffix -ome derives from Latin and means "set or mass," and is used to refer to the fields of study of various omics sciences. In specific, the metabolome represents the set of metabolites under specific genetic and environmental conditions of a biological system at a specific time. Its size and composition depend on the organism and the type of sample selected (Dunn et al., 2011; EMBL-EBI, 2020b; Haug et al., 2013; Sengupta and Narad, 2018).

According to the principles of classical molecular biology and its levels of organization, the metabolome has traditionally been considered as the final level of the so-called "omic cascade". This is because information flows from the genome to the transcriptome, then to the proteome, and ends "downstream" with the metabolome, which ultimately reflects the combined effect of the other molecular

levels that precede it, providing a more direct portrait of the biological phenotype expressed by an organism (Dunn et al., 2011; Lay et al., 2006; Teng, 2013; Vailati-Riboni et al., 2017).

Regarding metabolomics itself, this is a recent branch of analytical biochemistry that has played a fundamental role since the "post-genomic era", becoming the complementary science to the study of other functional levels - genome, transcriptome, and proteome (Dunn et al., 2011). This omic science allows, through sophisticated analytical techniques such as nuclear magnetic resonance (NMR) or mass spectrometry, to obtain an instant image of the metabolites present in a biological system (Dunn et al., 2011; Franco-Martínez et al., 2020; Haug et al., 2013; Markley et al., 2017; Wishart, 2016).

At the present time, as Sengupta and Narad (2018) point out, "metabolomics has made metabolites obtained from biological samples ideal biomarkers by making them visible in most biological and medical databases," allowing them to be applicable in various areas of biomedicine. Indeed, its usability is found in prevention (Takis et al., 2019; Wang et al., 2011), disease diagnosis (Long et al., 2018), studying the effects of a drug (Kaddurah-Daouk and Weinshilboum, 2015), as well as monitoring health treatments and following up on a specific condition (Putri et al., 2013; Wishart, 2016).

Now then, metabolomic studies offer two alternative approaches, which will mainly depend on the research objectives intended. Therefore, if the goal is to determine a global metabolomic profile, a strategy called untargeted or non-directed will be chosen. This approach is oriented towards formulating new hypotheses or ideas, such as the discovery of new biomarkers that distinguish between cases and controls. This is achieved through the detection and quantification of a wide range of metabolites present in a sample, whether previously identified or still unknown (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018; Vinayavekhin and Saghatelian, 2010; Zhang et al., 2016).

Among its main advantages is that prior knowledge of the sample's metabolome composition is not necessary, and sample preparation for analysis is usually straightforward, ensuring minimal loss of potentially identifiable metabolites. Additionally, its results provide information that serves as a basis for subsequent studies requiring previously validated data, such as large-scale research requiring greater funding (Dunn et al., 2011). However, it has some limitations. For example, in the effort to ensure the detection of a greater number of metabolites, precision and accuracy are compromised, as well as the absolute quantification of metabolites (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018). Additionally, due to its intrinsic nature of addressing a large dataset, more time is required to process and analyze the information, necessitating the use of chemometric techniques to facilitate its execution and, likewise, presenting a greater challenge for identifying and characterizing unknown molecules (Roberts et al., 2012).

In contrast, if the aim is to measure a predefined set of specific known metabolites that respond to a specific hypothesis, an approach called targeted will be chosen. This approach has the advantage of providing absolute knowledge of the selected metabolites, providing their quantitative concentrations with high specificity, precision, and accuracy, facilitating subsequent inter-laboratory and/or inter-day comparisons. It also enables the discovery of new associations between metabolites in a given physiological context (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018; Roberts et al., 2012; Vinayavekhin and Saghatelian, 2010).

However, its disadvantages include the requirement of prior knowledge of the metabolites to be examined, reducing the coverage of metabolite analysis, which increases the risk of overlooking a metabolomic response of interest and additionally limits the number of molecules that can be subsequently compared. Furthermore, sample preparation is more complex because the selected metabolites must be separated from the rest in the sample (Dunn et al., 2011; Ribbenstedt et al., 2018; Roberts et al., 2012; Vinayavekhin and Saghatelian, 2010; Zhang et al., 2016). Therefore, the analytical approach to which the samples will be subjected should be selected during the design and planning of the research.

On the other hand, in recent years, with the growth and development of metabolomics, the creation of metabolomic databases and reference libraries has been promoted, enhancing, and facilitating research in this area. These databases provide researchers with diverse content, allowing them to compare, contrast, and make inferences from the results obtained in their research.

One of the largest, most comprehensive, and widely used metabolite databases, thanks to its open and free access, is The Human Metabolome Database (HMDB) (Alonso et al., 2015; Sengupta and Narad, 2018). Since its creation in 2007, identifying only 2180 metabolites (Wishart et al., 2007), it has been continuously improved and updated over the past 15 years. It has evolved not only into a database with more than 217,920 metabolites but also into an online encyclopedia containing information on chemical structures, names and identifiers, chemical taxonomy, biological functions, disease associations, genetic associations, metabolic pathways, among others, of human metabolites and metabolism (Wishart et al., 2022).

In addition to HMDB, among the most consulted options are Chenomx NMR Suite, Birmingham Metabolite Library, COLMAR, and BMRB (Alonso et al., 2015; Heude et al., 2017; Klassen et al., 2017). In addition to the online databases, scientific publications also serve as sources of references that facilitate access to high-quality data.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

One significant difference among the genome, proteome, and metabolome lies in the chemical diversity, particularly in the quantity of elements to be analyzed using high-throughput automated techniques. Specifically, we find that there are only four different bases in the genome, twenty amino acids in the proteome, and hundreds of thousands of compounds in the metabolome (Wishart, 2011). As a result, metabolomics requires high-end technologies to encompass the array of metabolites present in samples.

Currently, there are two main tools for identifying and quantifying metabolomic profiles: mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (Bernal

Ruiz, 2015; Clish, 2015; Sengupta and Narad, 2018; Vailati-Riboni et al., 2017). These provide an expanded and dynamic measure of the changes resulting from processes involving the genome, transcriptome, proteome, and the environment, directly reflecting underlying biochemical activity and the state of cells and tissues, providing a representation of the molecular-level phenotype (Haug et al., 2020; Sengupta and Narad, 2018).

Regarding nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, it has played a fundamental role in understanding metabolism and metabolic processes since 1974, becoming one of the techniques that provides a unique and simultaneous view of the array of molecules in a biological sample (EMBL-EBI, 2020a; Wishart, 2019). This technique aims to measure specific resonance signals resulting from the protons emitted by excited molecules within a magnetic field, enabling the determination of a wide spectrum of molecules, including peptides, amino acids, nucleic acids, carbohydrates, organic acids, and more (Barallobre-barreiro et al., 2013; EMBL-EBI, 2020b; Putri et al., 2013). Similarly, the intensity of the signal expressed by such a molecule will be related to its relative concentration in the biological sample and the number of protons present in the molecule (Takis et al., 2019).

Among the advantages of using NMR spectroscopy is its non-invasive and non-destructive nature, allowing the same sample to be analyzed multiple times. Additionally, it possesses fundamental properties such as high reproducibility and automation, as well as rapid analysis times, making large-scale studies more feasible than with mass spectrometry. Furthermore, NMR is inherently quantitative, sample preparation is simple, it allows for the identification of new compounds, and it is suitable for characterizing compounds less amenable to analysis by mass spectrometry, such as sugars, organic acids, alcohols, among others. Finally, it is worth noting that NMR is the most suitable tool for untargeted metabolomic analysis (Dunn et al., 2011; EMBL-EBI, 2020b; Emwas et al., 2019; Markley et al., 2017; Putri et al., 2013; Wishart, 2011, 2019).

However, several authors point out that one of its main and significant disadvantages is its low sensitivity, as it can reliably identify and quantify only metabolites at relatively high concentrations, resulting in a lower number of metabolites detected per sample. It can even be between 10 and 100 times less sensitive than mass spectrometry (MS) (Dunn et al., 2011; Emwas et al., 2019; Markley et al., 2017; Putri et al., 2013; Wishart, 2011). Additionally, David Wishart (2011, 2019) adds that relatively large sample sizes (~500 µl) and higher instrumentation and maintenance costs are required. Furthermore, he mentions that it requires a significant amount of space for installation, and the existing databases are smaller compared to those found for mass spectrometry (Table S1).

Table S1. Summary of the advantages and disadvantages of Nuclear Magnetic Resonance compared to Mass Spectrometry in metabolomic applications.

	NMR	MS
Sensitivity	Low	High
Sample preparation	Simple	Intricate
Reproducibility	High	Low
Targeted analysis	Not optimal	Optimal
Time of analysis	Lower	Higher
Tissue samples	Non-destructive technique	Destructive Technique
Cost of instruments	High Cost	Lower Cost
Cost per sample	Low	High
Number of detectable Metabolites	< 200	300 – 1000+

Overview of Dental Caries

The World Health Organization defines oral health as "the state of the mouth, teeth, and orofacial structures that enables individuals to perform essential functions such as eating, breathing, and speaking, and encompasses psychosocial dimensions such as self-esteem, well-being, and the ability to socialize and work without pain, discomfort, or embarrassment" (WHO, 2022). Consequently, oral health plays an important role in people's quality of life, including their social and professional integration and educational attainment.

Current reports indicate that oral health is a significant public health issue worldwide that requires immediate action. Approximately 3.5 billion cases of oral health conditions have been recorded, making it one of the most prevalent health conditions globally, surpassing even the combined total of cases of mental illnesses, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, chronic respiratory diseases, and cancers by about one billion (Bernabe et al., 2020; WHO, 2022). Of these oral health conditions, it is estimated globally that approximately 2 billion cases involve dental caries lesions in permanent teeth, with a median prevalence of 29%, while around 500 million cases among 1-9 year of age exhibit dental caries lesions in primary teeth, corresponding to a median prevalence of 43% (WHO, 2022).

At the national level, the indicators from the latest Oral Health Survey in Spain 2020 report a prevalence of caries in deciduous teeth in children aged 5-6 years of 35.5% with a dmft index of 1.28, and at 12 years a caries prevalence of 28.6% with a DMFT index (Decayed, Missing, and Filled Teeth) of 0.58 (Bravo Pérez et al., 2020). Similarly, in the Valencian Community in 2018, the prevalence for caries shows similar values at the age of 5-6 years with 37.4% and a dmft index of 1.23, and at 12 years a caries prevalence of 30.1% and a DMFT index of 0.66 (Almerich-Torres et al., 2020).

Currently, the most accepted concept of caries is agreed upon by a group of experts who defined it as follows: "it is a dynamic, non-communicable, multifactorial disease, mediated by biofilm and modulated by diet, which causes a net loss of

minerals in hard dental tissues. It is determined by biological, behavioral, psychosocial, and environmental factors. As a consequence of this process, a caries lesion develops" (Machiulskiene et al., 2020). Additionally, it is now conceived within the group of non-communicable diseases (NCDs), due to the multidimensionality that encompasses its current concept, because of the general characteristics it shares with other NCDs, as well as the common risk factors that exist among them, such as an unhealthy diet, poor hygiene, or underlying social and commercial determinants (FDI & IADR, 2022; Giacaman et al., 2022; WHO, 2020, 2021; Wolf et al., 2021).

As for the manifestation of caries lesions, these can occur at an early age, and their progression, if not treated in time, can pose a challenge to overall health, causing nutritional disturbances, sleep disturbances, pain, malocclusions, as well as affecting mental health, and the immediate and long-term quality of life of children (Chaffee et al., 2017; Peres et al., 2019; Ramos-Jorge et al., 2015). Additionally, dental caries represents a significant economic burden for healthcare systems in all countries and for families (Peres et al., 2019). In 2015, the global cost of dental diseases was estimated to be USD 544.410 billion (Righolt et al., 2018). In line with this, it can be estimated that 45% of the total global burden of dental diseases is directly or indirectly attributable to untreated caries lesions, valued at approximately USD 245 billion (Vujicic and Listl, 2020). This includes both direct costs, i.e., those related to disease treatment; indirect costs, associated with lost productivity due to absenteeism from work and school, and intangible costs, involved in social and family activities, such as pain, problems with biting, chewing, and eating, among others (Peres et al., 2019).

Regarding the etiology of dental caries, one of the most accepted hypotheses is the one proposed by Philip Marsh in 1994, called the ecological plaque hypothesis. This describes the process as a disease of polymicrobial nature, resulting from ecological dysbiosis, that is, a microbial imbalance or disruption caused by environmental change due to exposure to high frequency and quantity of sugars. Consequently, the biofilm is exposed to a more acidic environment, leading to a shift

from commensal to pathogenic bacteria, which can eventually cause the disease (Marsh, 1994, 2003, 2006).

However, today there is a broader view regarding Philip Marsh's original postulate, emphasizing the importance of metabolic activity occurring in the microbial community, making it the main modulator of the environment (Nyvad and Takahashi, 2020). This is reflected in recent research identifying a change in the metabolism of individuals with active dental caries, showing an interrelation between microbiota and biofilm metabolism (Wang et al., 2022).

Metabolomics and Dental Caries

Saliva provides a unique opportunity to observe the internal functioning of the body through various analyses that have the potential to be important indicators of health and disease. Currently, its use is suggested in research related to diseases such as cancer (Lohavanichbutr et al., 2018; Mikkonen et al., 2018; Song et al., 2020; Sugimoto et al., 2010), neurodegenerative diseases (Liang et al., 2015; Yilmaz et al., 2017), autoimmune diseases (Herrala et al., 2021; Kageyama et al., 2015; Setti et al., 2023), periodontal disease (Baima et al., 2021; García-Villaescusa et al., 2018; Gawron et al., 2019), caries (Fidalgo et al., 2013, 2015; Li et al., 2023; Pereira et al., 2019), among others.

Initially, saliva research using NMR was quite limited because the frequencies used were relatively low, 400 MHz compared to the current 600 MHz, allowing for only a small number of molecular assignments. The first works date back to 1990-1991 and were carried out by a team from the St Bartholomew's and the Royal London Hospitals School of Medicine and Dentistry in collaboration with Queen Mary College (Grootveld et al., 2022). Since then, the first publications on metabolic profiles present in human saliva have emerged. However, it is considered that the first *real* metabolomic study of saliva was in 2002 when Silwood et al. (2002) conducted a study using non-targeted NMR, which allowed them to identify more than 60 biomolecules.

Currently, there is significant progress in technologies and methods for identifying metabolites, with an increase in the number of publications related to this field. However, research utilizing saliva for evaluating metabolomic profiles is relatively scarce compared to other biofluids such as urine and plasma (Gardner et al., 2018, 2020). For this reason, it is still considered a recent area of research that presents a wide range of opportunities for the future.

Carbohydrates

Carbohydrates play a crucial role in the process of dental caries. Initially, they are broken down into monosaccharides by a group of enzymes called carbohydrate-active enzymes (Barbour et al., 2022). Subsequently, the monosaccharides enter oral bacteria intracellularly, such as *Streptococcus*, *Actinomyces*, and *Lactobacillus*, through sugar transport systems called phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase and protein-binding protein transport systems. Once inside, these monosaccharides continue their process through glycolysis or the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, resulting in the formation of phosphoenolpyruvate, which generates pyruvate, ATP (Adenosine triphosphate), and NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) (Barbour et al., 2022; Takahashi, 2015).

Together, lactate, ethanol, formate, and short-chain fatty acids (SCFAs), including acetate, propionate, butyrate, are derived from phosphoenolpyruvate or pyruvate through various pathways, including acetate, propionate, butyrate (Barbour et al., 2022; Takahashi, 2015). At the same time, oxygen is also consumed during the glycolysis process, contributing to the generation of an anaerobic environment (Takahashi, 2015).

Research has identified differences in metabolism between subjects with active dental caries and those without caries, noting that individuals with caries had an increase in metabolism activity, particularly of glucose and galactose (Li et al., 2023; Wang et al., 2022). Along the same lines, da Costa et al. (2021) concluded that the oral microbiota and metabolome associated with the progression of caries lesions is different from that found in arrested lesions. In accordance with the above,

a decrease in saccharides has been recorded in subjects with caries (Fidalgo et al., 2013), hypothesizing that there is a greater number of cariogenic bacteria that give rise to a more accelerated metabolism of these compounds. However, Fidalgo et al. (2015) report that after treatment of caries lesions, patients present a decrease in the concentration of saccharides, in addition to a decrease in cariogenic microorganisms. Additionally, Pereira et al. (2019) indicate a specific increase in monosaccharides in patients with caries, particularly fucose, galactose, glucose, and xylose.

The literature indicates that in response to sugar exposure or increased sugar intake, such as during meals, intracellular levels of compounds like fructose-1,6-bisphosphate, which actively participate in glycolysis, increase. This leads to an acceleration of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, resulting in increased lactate production (Takahashi, 2015). Consistent with this, Gardner et al. (2018a) observed an increase in saliva lactate levels after rinsing with sucrose. Additionally, it has been observed that when *S. mutans* is in a culture medium with sucrose, one of the main compounds produced from its metabolism is lactate (Letieri et al., 2022). Therefore, lactate, a product of homolactic fermentation of pyruvate, ultimately generates lactic acid. The latter reduces pH and promotes the growth of acidogenic bacteria (Barbour et al., 2022). For this reason, lactate is considered one of the main contributors to the development of caries lesions (Pitts et al., 2017).

As described in the previous paragraph, Andreadis and Kalfas (2014) have observed in paediatric patients with active caries that their biofilm produces more lactate from sucrose than those free of caries, facilitating the installation of an environment with greater cariogenic potential, which would eventually promote the formation of new caries lesions. In the same vein, Fidalgo et al. (2013) and Kim et al. (2023) found increased lactate concentrations in subjects with caries lesions. Similar results were those of Schulz et al. (2020), who observed a supposed increase in concentration compared to the rest of the study groups, however, a statistically significant difference could not be identified. However, other publications do not show significant variations with respect to lactate concentrations, preventing the validation of the results of previous studies (Fidalgo et al., 2015; Pereira et al., 2019).

The recent findings may be explained by what Gardner et al. (2019) indicated, who point out that there is no correlation between lactate concentration and the load of saccharolytic bacteria; rather, they explain that lactate is a host-derived derivative that enters total saliva from the circulation of surrounding plasma through the salivary glands. Therefore, they suggest taking into account variables that may modify plasma lactate (e.g., physical exercise) when measuring salivary lactate for diagnostic purposes (Gardner et al., 2019). On the other hand, current evidence suggests that lactate could be related to peri-implant diseases; however, further studies are needed to determine this relationship (Barbour et al., 2022).

On the other hand, the total saliva of healthy patients is predominated by SCFAs, particularly acetate, propionate, butyrate, and to a lesser extent formate (Gardner et al., 2019). Specifically, it has been stated that acetate, propionate and butyrate have strong correlations with salivary bacterial loads, mainly proteolytic, indicating that these metabolites are produced by the oral microbiota (Gardner et al., 2019).

Research reveals that concentrations of n-butyrate and acetate in saliva are expressed in increased form in caries patients (Fidalgo et al., 2013, 2015), as well as in mature biofilms compared to newly formed biofilms (da Costa Rosa et al., 2021). It has also been observed that after treatment of caries lesions there is a reducing effect on the concentrations of both metabolites (Fidalgo et al., 2015). Therefore, there would be a link between these metabolites and the metabolic activity of the microbiota associated with the progression of caries lesions. However, contrary to previous results, Pereira et al. (2019) found in their research that the concentration of butyrate was decreased in subjects with caries. Otherwise, it is suggested that butyrate alters the host immune response, modulating the inflammatory response in oral epithelial cells (Magrin et al., 2020). It has also been linked to the pathogenesis of periodontal diseases, stimulating colonization, and improving biofilm structure (Suzuki et al., 2018).

Regarding propionate concentrations, these have been found to be increased in the saliva of patients with caries (Fidalgo et al., 2015), as well as in mature biofilms (da Costa Rosa et al., 2021). However, these findings have not been consistently confirmed, as reduced concentrations have also been observed in individuals with caries lesions (Fidalgo et al., 2013). Another derivative of carbohydrate metabolism through the Embden-Meyerhof-Parnas pathway is ethanol (Silwood et al., 2002; Takahashi, 2015). This compound has been found in elevated concentrations in patients with early childhood caries (Kim et al., 2023). However, other similar studies have not found significant differences in ethanol concentrations in saliva between patients with caries and those without evidence of caries (Fidalgo et al., 2013; Pereira et al., 2019).

Finally, it is crucial to highlight that the interpretation of carbohydrates and their end products should be approached with caution due to numerous factors influencing their availability in saliva, such as ethnic origin, oral microbiota, sample collection timing, diet, among others (Dame et al., 2015). Indeed, one of the sources that could contribute significantly to the possible differences in the findings in organic acid concentrations is the intake of various types of food (Linke et al., 1997).

Lipids

Regarding lipid metabolites, it has been suggested that there may be an association between high levels of fatty acids and patients with caries lesions (Fidalgo et al., 2013, 2015). This coincides with the study by Tomita et al. (2008), in which they found elevated concentrations of lipids, particularly linoleic, stearic and docosahexaenoic acid, in the parotid saliva of patients susceptible to dental caries. However, Schulz et al. (2020) did not find such a difference in their results.

Amino acids

The breakdown pathway of proteins primarily occurs through proteases and peptidases found in the host and bacteria. This process generates peptides and

amino acids that will subsequently be deaminated and transformed into SCFAs (Short-Chain Fatty Acids) (Barbour et al., 2022; Takahashi, 2015).

At the biofilm level, glutamate and aspartate are highlighted as the most abundant free amino acids (Singer and Kleinberg, 1983). Additionally, it is important to note that glutamate is one of the most abundant amino acids in human biofluids. Therefore, oral bacteria, such as *P. gingivalis*, facilitate a series of processes for glutamate, including deamination, decarboxylation, and degradation, potentially leading to the formation of butyrate, propionate, and acetate (Takahashi, 2015). Similarly, aspartate is also degraded by oral bacteria, resulting in the production of succinate, formate, acetate, butyrate, and propionate. Additionally, other amino acids, such as cysteine and methionine, contribute to acetate and propionate production when degraded by the enzyme's cystathionine γ -lyase and methionine γ -lyase, respectively (Takahashi, 2015).

Pereira et al. (2019) report a significant increase in amino acids, particularly alanine, aspartate, glutamate, glycine, isoleucine, leucine, taurine, tyrosine, and proline, in patients with dental caries lesions. Specifically, a relationship has been observed between caries experience and the presence of proline and glycine in total saliva. Specifically, it is suggested that a higher presence of proline is associated with a higher risk of caries in patients with elevated levels of *Streptococcus mutans*, while the presence of glycine would reduce the risk of developing a caries lesion (Fonteles et al., 2009). Nonetheless, Schulz et al. (2020) and Li et al. (2023) did not observe increased concentrations of proline and glycine in patients with active caries compared to healthy subjects. Additionally, Kim et al. (2023) indicates reduced levels of these specific metabolites in subjects with early childhood caries.

On the other hand, sialidases act on salivary mucins, allowing the release of elements that will serve as nutritional sources for oral bacteria (Barbour et al., 2022). The preceding information is consistent with the study by Banderas et al. (2002), who state that patients with elevated DMFT index show a reduction in mucins compared to those with lower DMFT index. Moreover, Angwaravong et al.

(2015) indicates that schoolchildren in the mixed dentition stage exhibit a negative correlation between levels of salivary mucin, specifically MUC5B, and dental caries.

Furthermore, there are amino acids that neutralize the action of acids, promoting a balance between dental remineralization and demineralization processes. For example, arginine, an amino acid that can come from the diet or the host; arginolytic bacteria, including *S. sanguinis*, *S. mitis*, *Streptococcus gordonii*, and certain species of *Lactobacillus* and *Actinomyces*, located in supragingival plaque, use one of their main metabolic pathways, the so-called Arginine Deiminase System (ADS), to degrade arginine and produce a series of alkaline elements that counteract the acidification produced by sugar metabolism (Barbour et al., 2022; Nascimento et al., 2019; Takahashi, 2015).

Similarly, ammonia - derived from the ADS pathway - has a cariogenicity-reducing potential, promoting the development of health-compatible microorganisms and neutralizing glycolytic acids (Nascimento et al., 2019). Thus, aiming to observe the arginolytic capacity of the supragingival biofilm through the evaluation of ADS, Nascimento et al. (2019) indicate a positive correlation between caries activity and a low arginolytic capacity of the supragingival biofilm, suggesting ADS measurement as a cariogenic risk detection method.

Likewise, urea - supplied by saliva - is a vital component in the production of alkaline elements. This is metabolized through ureases from bacteria, such as *S. salivarius* and *Actinomyces naeslundii*, being reduced and transformed into ammonia and carbon dioxide (Huang et al., 2015; Takahashi, 2015). Additionally, urea has been observed to correlate inversely with bacterial load in total saliva (Gardner et al., 2019). Therefore, together with arginine, urea could be considered another protective factor against the growth of acidogenic bacteria. Additionally, another amino acid that has been related to the limitation of the dental caries process is phenylalanine, which has been proposed to have an inhibitory effect on dental caries development due to alkalinization of the medium as a result of its conversion upon deamination and derivation into phenylacetate or phenylpropionate (Masoudi Rad et al., 2014; Shi et al., 2020). This is consistent with

the study by Fidalgo et al. (2013), in which patients with caries had a lower concentration of this amino acid.

Objectives

General Objective

To determine the capacity of a caries predictive model based on the metabolomic profile of saliva in infant patients.

Specific Objectives

To analyze the oral habits and hygiene of the subjects and their relationship with dental caries.

To determine the composition of the salivary metabolic profile of the study subjects.

Identify metabolites with the greatest potential as predictive biomarkers of dental caries.

Materials and methods

The study design is based on case-control. Study participants were obtained from the Pediatric Dentistry Unit of the Malvarrosa and Nazaret Health Centers in Valencia, Spain, between February and May 2022. The subjects were boys and girls between the ages of 6 and 12 who attended for routine check-ups or had been referred by doctors for presenting oral pathologies. Patients with moderate/severe gingivitis, systemic or autoimmune diseases, antibiotic treatment in the last 3 months, disabilities and/or orthodontic wearers were excluded. The parents and/or caregivers of the participants were given an informed consent with all the necessary basic information.

Cases were considered to be those individuals who presented ICDAS II lesions codes III, IV, V and VI after the examination and those patients free of caries or with ICDAS I and II lesions codes were assigned as controls, although the presence of fillings was allowed in the control group, both in permanent dentition as well as temporary dentition.

An examination form was used that has been adapted from the Oral Health Survey recommended by the WHO (WHO, 2013). Additionally, a question about the occupation of the parents was added, thereby analyzing the social class of the participant. In this regard, the Spanish adaptation of the British Registrar General classification proposed by Domingo and Marcos (Domingo Salvany and Marcos Alonso, 1989) was used. Likewise, the ICDAS II caries classification method (International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) Coordinating Committee, 2011) was used for the caries registration of the participants. The means of the epidemiological indices DMFT/S for the permanent dentition and the dmft/s for the temporary dentition were calculated. The ICDAS III-VI/D-G codes were used as cut-off criteria for the calculation of the D/d component.

To determine the sample size, we based ourselves on previous studies similar to ours reported in the literature (Fidalgo et al., 2013, 2015; Havsed et al., 2021; Pereira et al., 2019; Schulz et al., 2020) who presented a sample of between 33 and

57 participants. In addition, using R software and package pwr (function `pwr.t.test`) a minimum of $n=29$ has been estimated in each group for a comparison scenario between two normalized means (cases vs controls) with the assumptions of a significance level=0.05, power=0.8 and a Cohen's $d=0.7$ (moderate to high effect size). The sample size of the study is made up of 31 cases and 37 controls.

The study was approved by the local Ethics Committees in Research (Registration No. 1885726 and No. 2022/008), complying with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and the current regulations on personal data protection.

Authorization to participate in the study was requested through an Informed Consent from the parents and/or guardians. All the participants were examined by a single examiner (an experienced dentist) in the dental surgeries of the public health centers, thereby guaranteeing optimal conditions concerning lighting, ergonomics, and the control of the setting.

Collection of salivary samples

Saliva samples were collected following the same general instructions described in the literature (Fidalgo et al., 2013, 2015; López Jornet, 2010). The samples were collected in a quiet environment and during the same time range in the afternoon to avoid fluctuations in the results. The instructions included not consuming food and/or liquids two hours before sample collection and not performing any oral hygiene on the day of the appointment to avoid any exogenous element that could interfere with the results.

The collection of the unstimulated saliva sample has been obtained through the “draining method,” in which the patient sits in a resting position; they then tilt their head slightly forward and open their lips slightly, allowing saliva to fall passively into a sterilized 1.5 ml Eppendorf tube (López Jornet, 2010; Priya and Prathibha, 2017). The storage and handling of the samples were strictly standardized, keeping them at -20°C in portable refrigerators and then transferred

and stored in a deep freezer at -80°C until the day the NMR measurements were conducted.

Acquisition and processing of data with NMR

Saliva samples were thawed and then centrifuged in a Sigma 1-14 minicentrifuge at 14,800 rpm for 5 minutes. 55 µL of a KH₂PO₄ solution (1.5M) / trimethylsilylpropanoic acid-d₄ (TSP, 5.8 mM) in D₂O was added to 495 µL of saliva. A total of 500 µL of the previous mixture was introduced into a 5mm NMR tube.

Spectra were acquired on a Bruker Avance III DRX 600 spectrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany) operating at a ¹H frequency of 600.13 MHz. For all samples, a single-pulse experiment with water presaturation was acquired, 3 min duration, 64 replicates, 65,000 points, 2 seconds relaxation time, and 3.94 seconds acquisition time at a nominal temperature of 298K. The width for all spectra was set to 8,000 Hz. Before the Fourier data transformation, each of the free induction decay signals (FID_s) was multiplied by 0.3 Hz of exponential line-broadening.

Spectra processing

Using the MestReNova 10 software (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spain) a manual phase correction, a baseline adjustment was applied to each spectrum, and the chemical shift was referenced to the TSP signal (0 ppm).

Assignment and integration of spectra

The signals of the spectra were assigned according to the references given in the available literature (García-Villaescusa et al., 2018), of the specialized databases: The Human Metabolome Database (Wishart et al., 2022) and the database spectral data set included in the fitting and quantification program contained in Chenomx NMR Suite 8.1 (Chenomx Inc, Alberta, Canada). The concentration of the metabolites

was expressed in normalized concentration units to the sum of the total metabolic content, in order to make all the samples directly comparable with each other.

Statistical analysis

The statistical analysis of the quantitative and qualitative variables was conducted with the IBM SPSS v 29 program. For the quantitative variables, their means were estimated, while for the qualitative variables their percentages were calculated and in accordance with 95% confidence intervals for both. For the comparisons of the means after checking for normality with the *Kolmogorov-Smirnoff* and *Shapiro-Wilk* tests, the Student's t test for independent parametric samples and the *Mann-Whitney U* test for independent non-parametric samples were used. Likewise, for the comparison between proportions, the χ^2 test and *Fisher's* exact test were used. The statistical significance level was established for a p-value <0.05. In addition, to estimate the magnitude of the effect size between two normalized means, Cohen's d was used, which represents the number of standard deviations that separate two groups. A small effect size is interpreted when $d=0.2$; medium effect size $d=0.5$ and large effect size when $d >0.8$.

For the chemometric analysis, the MATLAB 2019b program (MathWorks, Natick, United States) was used. The models have been built using proprietary routines in Matlab and the PLS_Toolbox package (Eigenvector Research, Inc.). An unsupervised Principal Component Analysis (PCA) was applied to the data sets obtained by NMR for the global study of the samples, evaluating the homogeneity within the groups and identifying possible atypical samples. Likewise, a supervised analysis was conducted using a Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA), which facilitates the detection of subgroups and the spectral regions that have the greatest contribution to the separation between them. From the previous model, a list was obtained with the K-variables used in the model and their corresponding VIP value (Variable Importance to Projection). Descriptors with VIP values > 1 were considered to be the ones that contributed the most to the discrimination between the study groups. The chemometric models were cross-validated using 10-fold Venetian blinds to evaluate the accuracy of each classification model. In each run,

one sample of the data is left out of the training calculations and used to test the model. The whole cross validation process was run 10 times. The area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve for discrimination between cases and controls was calculated using all the variables included in the predictive model.

Results

The mean age of the subjects/patients was 8.8 years, and no significant differences were observed between cases and controls for age, sex, or socioeconomic status. Regarding the caries indices in the permanent dentition, mean DMFS and DMFT, and in temporary dentition, dmft and dmfs, statistically significant differences were observed for the two study groups (Table S2).

Table S2. Baseline characteristics of cases and controls. Cut-off criteria for epidemiological indices ICDAS code 3-6/D-G. *p-significant value < 0.05.			
	CONTROL n= 37 Mean [IC-95%]/ n (%)	CASE n= 31 Mean [IC-95%]/ n (%)	Test
Age	8.70 [7.92 – 9.47]	8.93 [8.32 – 9.54]	Mann-Whitney's U p = 0.671
Sex	M = 18 (48.6) [33.5 – 64.1]	M = 16 (51.6) [34.8 – 68.0]	χ^2 test p = 0.808 Fisher p = 1
	F = 19 (51.4) [35.9 – 66.6]	F = 15 (48.4) [32.0 – 65.2]	
SES	A = 13 (35.1) [21.8 – 51.2]	A = 7 (22.6) [11.4 – 40.0]	χ^2 p = 0.257
	B = 17 (45.9) [31.0 – 61.6]	B = 13 (41.9) [26.4 – 59.2]	
	C = 7 (18.9) [9.5 – 34.2]	C = 11 (35.5) [21.1 – 53.1]	
DMFS	0.30 [0 – 0.63]	2.0 [0.88 – 3.12]	Mann-Whitney's U p = < 0.001*
dmfs	0.35 [0 – 0.78]	4.68 [3.14 – 6.22]	Mann-Whitney's U p = < 0.001*
DMFT	0.11 [0 – 0.24]	1.13 [0.67 – 1.59]	Mann-Whitney's U p = < 0.001*
dmft	0.19 [0 – 0.44]	2.84 [2.04 – 3.64]	Mann-Whitney's U p = < 0.001*
SES (Socioeconomic status); A (codes I and II), B (codes III and IVa) and C (codes IVb, V and VI). M (Male). F (Female).			

The total number of health questionnaires completed by parents and/or caregivers was 100% of the participants. Regarding the results, no statistically significant differences were observed between the cases and controls regarding the questionnaire items related to oral hygiene. For example, brushing frequency, the

use of oral hygiene aids (such as dental floss), and/or the use of fluoride toothpaste showed no significant variations. Likewise, no differences were found between the examined groups regarding dietary habits, such as consumption of sugary beverage and foods. However, it is noteworthy that the control group has a lower frequency of sugary beverage consumption during the week compared to the case group: 18.9% versus 45.3%, respectively. Similarly, the intake of sugar-sweetened milk also shows differences: 41.9% of cases report daily consumption, while controls only have 21.6%.

Principal component analysis did not show a distribution indicating a spontaneous separation between cases and controls (one outlier sample was excluded). However, using the PLS-DA analysis, a model was built based on the two latent variables (LV1 and LV2) that explain 41.9% of the total variability. In figure S2, the PLS-DA shows a considerable tendency to separate in relation to the two groups with a slight overlap, mainly in the central area of the Figure S2.

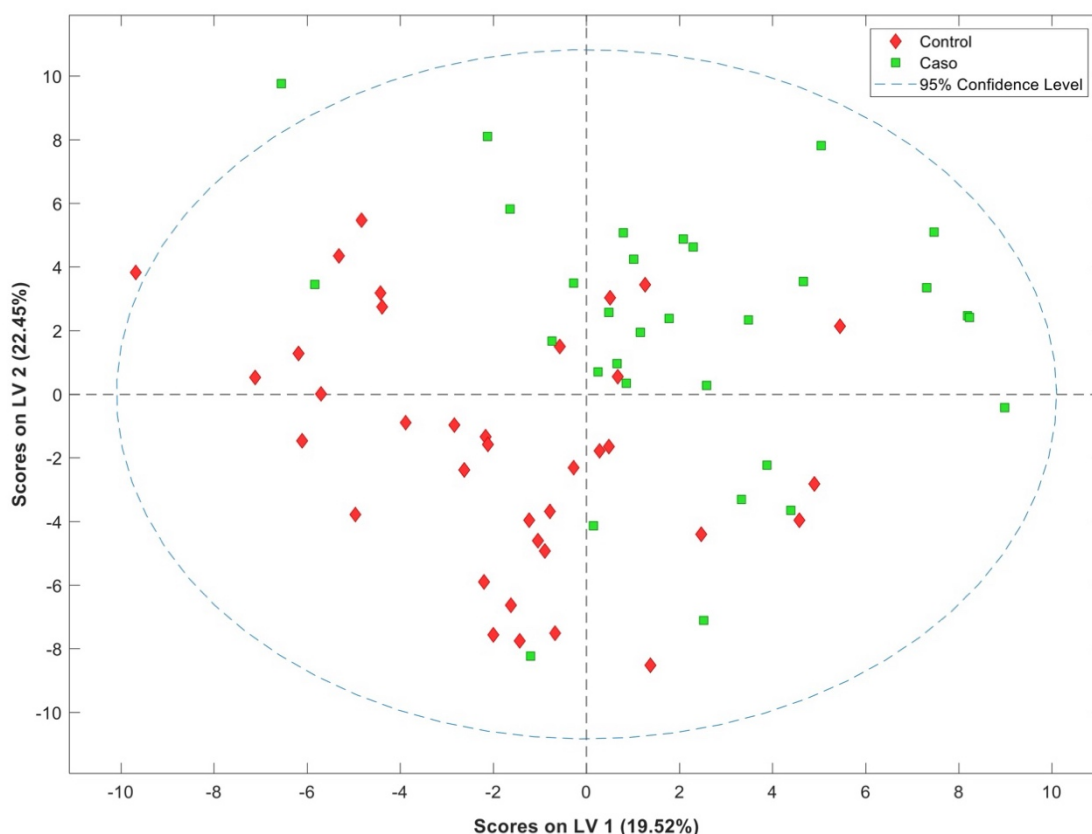


Figure S2. Scatter plot of the first and second latent variables (LV 1 and LV 2) of the PLS-DA of the saliva samples analyzed. Controls are represented in red with a diamond shape, and cases in green with a square shape. The circumference surrounding the samples (---) represents a 95% confidence level.

The discriminative capacity of the model was analyzed using a Venetian blind cross-validation, represented by ROC curves. The blue curve represents the training values, while the green curve represents the cross-validation. The area under the ROC curve (AUC) had a value of 0.7061 (Figure S3) and a sensitivity of 0.72 and specificity of 0.68.

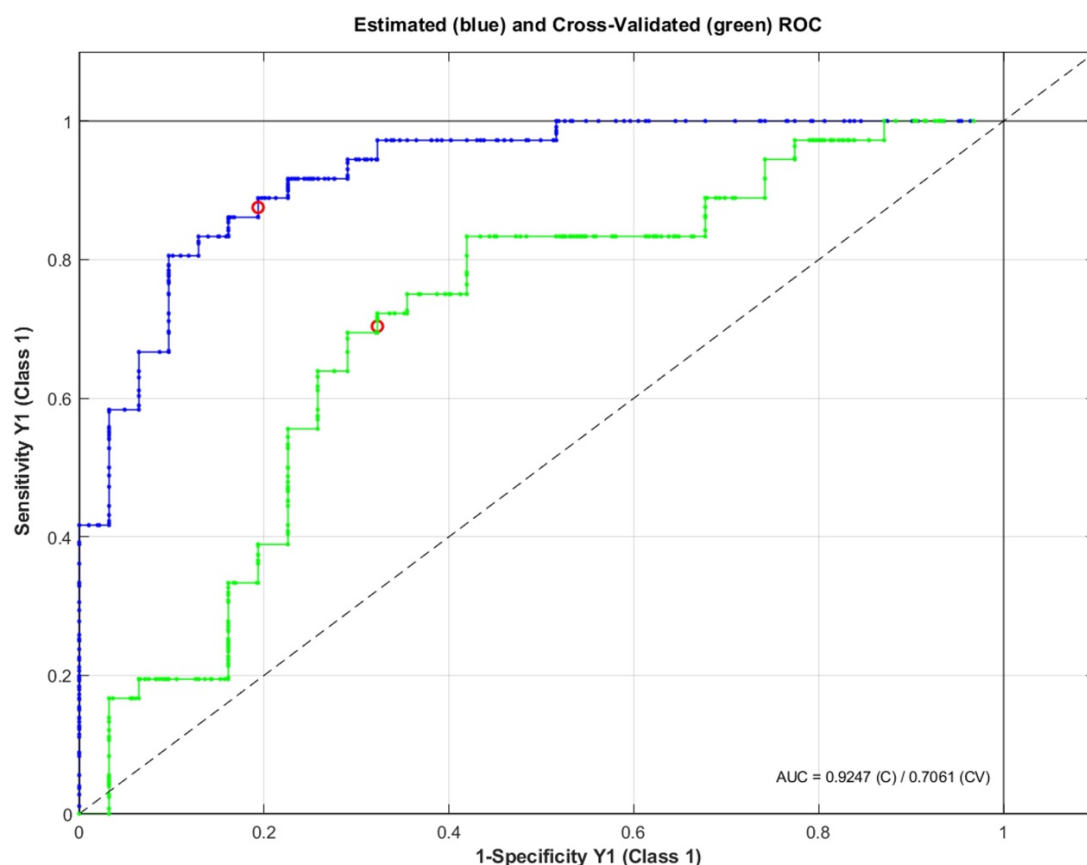


Figure S3. ROC curves given by the cross-validation of the PLS-DA model that discriminates between cases and controls. The Y axis represents sensitivity, and the X axis symbolizes specificity. The line marked as (---) from point 0,0 to point 1,1 is the so-called reference diagonal.

Figure S4 shows the metabolites that show a significant difference between cases and controls (p-value <0.1), among which are identified: 3-methyl-2-oxovalerate, 3-hydroxybutyrate, lactate, acetone, citrate, ornithine, ethanolamine, proline, 1-6-Anhydro- β -D-glucose, citraconate, glycine, glucose, taurine, and mannose.

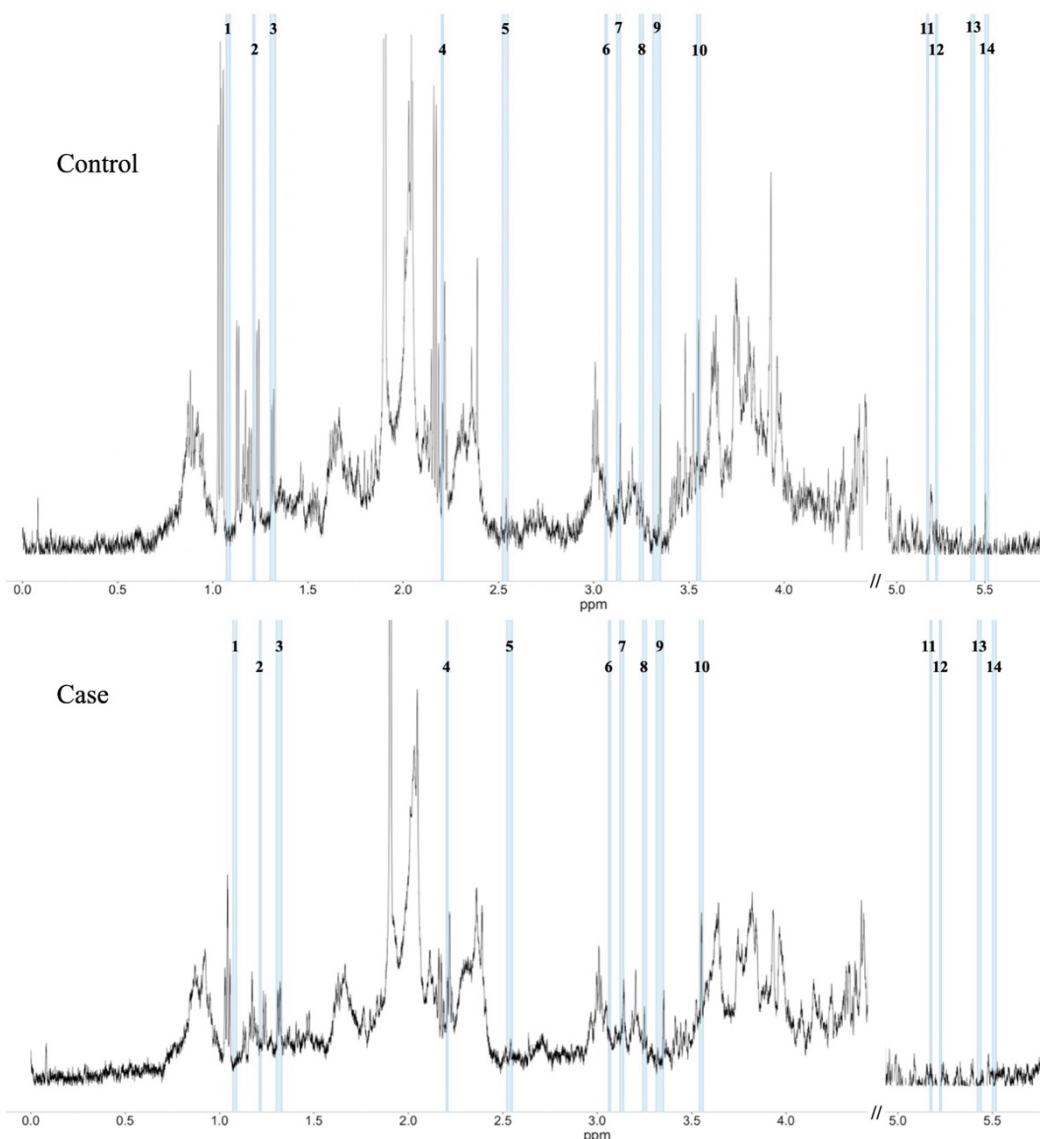


Figure S4. Representation of the ^1H NMR spectrum of the total saliva of a control and of a case, respectively. Assignments of metabolites with p-value < 0.1 are noted; 1. 3-methyl-2-oxovalerate 2. 3-hydroxybutyrate 3. Lactate 4. Acetone 5. Citrate 6. Ornithine 7. Ethanolamine 8. Taurine 9. Proline 10. Glycine 11. Mannose 12. Glucose 13. 1-6- Anhydrous- β -D-glucose 14. Citraconate.

Table S3 shows the mean normalized concentrations of the metabolites, observing glycine and glucose with higher means in the control group compared to the cases. Values for glycine of 1.66E^{-2} versus 1.48E^{-2} (p-value= 0.039) and glucose of 8.10E^{-4} versus 5.98E^{-4} (p-value= 0.015) are recorded, respectively. Additionally, a Cohen's d of 0.430 for glycine and 0.546 for glucose is indicated; these values refer to a medium effect size. Similarly, it should be noted that the load analysis of the PLS-DA revealed that glucose was the one that obtained the highest VIP value within the metabolites analyzed.

On the contrary, both taurine and mannose show more increments in the means in the cases compared to the controls. Thus, in taurine 6.21E^{-3} versus 5.16E^{-3} (p-value= 0.029) and in mannose 2.78E^{-4} versus 1.80E^{-4} (p-value= 0.034), respectively. Cohen's d shows values of -0.474 for taurine and -0.456 for mannose, indicating a medium effect size. Likewise, mannose and taurine contributed significantly in the PLS-DA discriminative model, obtaining second and third place, respectively, within the set of metabolites with VIP values >1 (Table S3).

Table S3. Units of normalized concentrations of the significant metabolites in the PLS-DA model. Standard deviation (SD). *Significant p-value < 0.05.						
Metabolite	Group	Mean	SD	t-test	Cohen's d	VIP value
Ornithine	Control	0.00260777	0.00049218	p = 0.100	0.317	1.172
	Case	0.00246085	0.00042594			
Ethanolamine	Control	0.00640498	0.00131409	p = 0.084	0.341	1.309
	Case	0.00592010	0.00153530			
Acetone	Control	0.00790822	0.00172945	p = 0.100	0.318	1.350
	Case	0.00742218	0.00125860			
Citrate	Control	0.00400269	0.00118783	p = 0.062	0.381	1.424
	Case	0.00358411	0.00098286			
Proline	Control	0.00717827	0.00266946	p = 0.054	0.385	1.436
	Case	0.00633275	0.00146542			
3-hydroxybutyrate	Control	0.00258800	0.00050339	p = 0.059	-0.389	1.509
	Case	0.00281605	0.00067029			
1-6-Anhydro- β -D-glucose	Control	0.00015982	0.00031113	p = 0.087	0.337	1.510
	Case	0.00005264	0.00032517			
Citraconate	Control	0.00025105	0.00047020	p = 0.056	0.383	1.538
	Case	0.00009655	0.00030881			
Glycine	Control	0.01661271	0.00480035	p = 0.039*	0.430	1.701
	Case	0.01480133	0.00341291			
3-methyl-2-oxovalerate	Control	0.00213939	0.00039588	p = 0.052	-0.404	1.858
	Case	0.00232668	0.00053128			
Lactate	Control	0.01528647	0.01064428	p = 0.070	0.353	2.004
	Case	0.01218975	0.00589646			
Taurine	Control	0.00516801	0.00117081	p = 0.029*	-0.474	2.045
	Case	0.00621135	0.00298487			
Mannose	Control	0.00018038	0.00019347	p = 0.034*	-0.456	2.658
	Case	0.00027808	0.00023581			
Glucose	Control	0.00081049	0.00040157	p = 0.015*	0.546	2.900
	Case	0.00059827	0.00037268			

Discussion

Our results show that mannose, glucose, glycine, and taurine showed a statistically significant difference between cases and controls (p-value <0.05). A lower glucose concentration is observed in the cases group, coinciding with Fidalgo et al. (2013), who state that patients with active caries present a decrease in saccharide concentration. Likewise, other studies (Li et al., 2023; Wang et al., 2022) report an increase in the metabolic activity of carbohydrates in patients with caries, such as glucose and galactose. On the contrary, mannose presented higher levels in cases compared to controls, like the result of another study (Pereira et al., 2019), which found a specific increase in monosaccharides in the group of patients with caries.

On the other hand, unlike the results found in other investigations that report higher lactate concentrations in patients with caries (Fidalgo et al., 2013; Kim et al., 2023; Schulz et al., 2020), our work shows an inverse trend, registering higher levels of lactate in the controls. Gardner et al. (2019), suggest in their study that, in the absence of carbohydrate exposure, the entry of lactate into total saliva comes from the surrounding plasma circulation and that its concentration has no correlation with the load of saccharolytic bacteria.

Due to the results presented, it is essential to exercise caution in the interpretation of carbohydrates and their final products, since there are numerous factors that influence their availability at the salivary level, food intake being one of the factors that could contribute the most to the observed differences (Dame et al., 2015; Linke et al., 1997).

Regarding free amino acids, specific differences of proline and glycine have been observed, indicating a presence of proline and an absence of glycine in caries patients (Fonteles et al., 2009). The reason for a higher presence of proline in carious patients could be due to degradation of the dentin collagen matrix by oral bacteria (Fonteles et al., 2009; Hughston et al., 1959). However, these results have not been consistent with other investigations (Li et al., 2023; Schulz et al., 2020). Our results

show lower proline levels in children with caries, coinciding with the data reported by Kim et al. (2023).

Regarding glycine, the controls presented higher levels versus the cases, obtaining a statistically significant difference, a situation that could correspond to the protective role that has been associated with the presence of glycine in saliva and the reduction of the risk of caries (Fonteles et al., 2009). On the other hand, significantly elevated levels of taurine are detected in the group of cases, as reported by Pereira et al. (2019), therefore, it is suggested that future research focus on confirming this metabolite as a potential caries biomarker.

It has been observed ever since the first investigations in this field that there is an association between short-chain fatty acids (SCFAs), i.e., acetate, propionate and butyrate, and caries activity (Silwood et al., 1999), with altered levels reported, both in biofilm (da Costa Rosa et al., 2021; Havsed et al., 2021) and in saliva (Fidalgo et al., 2013, 2015; Pereira et al., 2019). Our results also support a difference, observing higher levels of these metabolites in the group of cases. This could reflect a higher proteolytic and/or saccharolytic bacterial load in the cases, considering that the concentration of SCFA in total saliva has a strong correlation with the bacterial load of the host (Gardner et al., 2019).

Based on the literature, a greater presence of fatty acids should be observed in the patients belonging to the case group (Fidalgo et al., 2013, 2015; Kim et al., 2023; Tomita et al., 2008), however and in line with what was reported by Schulz et al. (2020), this variation was not found in our results. One hypothesis about the difference in results may be due to certain salivary characteristics, such as lipolytic activity, which could modulate the profiles of fatty acids in saliva, generating inter-individual variation (Neyraud et al., 2017; Reich et al., 2013).

The predictive capacity of our model, obtained based on the 25 metabolites that contributed the most (VIP value >1), proved to be moderate (Burgueño et al., 1995), with an AUC value of 0.71. A similar value was obtained by Li et al. (2023), reaching an AUC value of 0.73.

The following comparative table presents an overview of the main characteristics of studies similar to ours found in the literature (Table S4):

Table S4. Summary of studies investigating the potential of salivary metabolomics and its relationship with dental caries in pediatric patients.

Author (year)	n (Cases/ Controls)	Age in years	Salivary Collection Method	Bioanalytical technique	Biomarkers identified
Fidalgo <i>et al.</i> (2013)	33 (15 / 18)	5 - 9	UWS	NMR	Lactate [↑] , Fatty acids [↑] , butyrate [↑] / Phenylalanine [↓] , propionate [↓] , Saccharides [↓]
Pereira <i>et al.</i> (2019)	38 (15 / 23)	4 - 16	UWS / SWS	NMR	Fucose [↑] , galactose [↑] , glucose [↑] , xylose [↑] , alanine [↑] , aspartate [↑] , glutamine [↑] , glycine [↑] , isoleucine [↑] , leucine [↑] , proline [↑] , taurine [↑] , tyrosine [↑] , choline [↑] , dimethylsulfone [↑] , hypoxanthine [↑] , methanol [↑] , n-acetyl [↑] , uracil [↑] / Butyrate [↓] , acetone [↓]
Kim <i>et al.</i> (2023)	54 (25 / 29)	< 6	SWS	NMR	Ethanol [↑] , formate [↑] , glycerophosphocoline [↑] , lactate [↑] , urea [↑] , valerate [↑] / Alanine [↓] , fucose [↓] , glutamine [↓] , glycine [↓] , isoleucine [↓] , lysine [↓] , ornithine [↓] , phenylalanine [↓] , proline [↓] , tyrosine [↓] , valine [↓]
Musalem-Domínguez <i>et al.</i> (2023)	68 (31 / 37)	6 - 12	UWS	NMR	Taurine [↑] , mannose [↑] / Glycine [↓] , glucose [↓]

[↑] Increased and [↓] Decreased in cases; Unstimulated Whole Saliva (UWS); Stimulated Whole Saliva (SWS); Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

Among the main limitations of our study, we would find a small sample size, although similar to the rest of the publications with which it can be compared (Fidalgo *et al.*, 2013, 2015; Kim *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2019), its cross-section, as well as the impossibility of verifying compliance with the indication not to consume food or drinks before sample collection. It is important to highlight that the interpretation of the final products of carbohydrates must be done carefully, due to the discrepancies of their results in the different investigations.

Conclusions

In regards to the specific objectives, we can conclude the following:

1. To strengthen the proposed predictive model, we analyzed other risk factors related to oral habits and hygiene, however, no significant differences were found between the cases reviewed and the control group that would make the model more effective if incorporated.
2. As to the composition of the salivary metabolomic profile of both groups, the following metabolites may be of interest: glucose, mannose, taurine, lactate, 3-methyl-2-oxovalerate, glycine, glycyproline, citraconate, 1-6-anhydro- β -d-glucose, 3-hydroxybutyrate, proline, citrate, acetone, ethanolamine, trans-4-hydroxy-L-proline, ethanol, allantoin, putrescine, ornithine, formate, propylene glycol, fumarate, galactose, tyrosine and glutamine.
3. The metabolites that present the greatest potential to differentiate one group from the other would be taurine and mannose in the reviewed cases, and glycine and glucose in the controls.

In regards to the general objective, we identified a metabolomic profile that differentiates the reviewed cases and the controls, however, the predictive capacity of the model is considered to be moderate (AUC = 0.7061). Therefore, we suggest further advance in salivary metabolomics, in order to obtain a deeper understanding of the dental caries process, which will help -in turn- in developing strategies for the prevention of this disease.