

Concentración de α -amilasa salival en niños con diferentes índices de caries

Salivary α -Amylase Concentration in Children with Different Caries Indexes

45

Univ Odontol. 2013 Ene-Jun; 32(68): 45-50. ISSN 0120-4319

DOSSIER CARIES DENTAL: INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGÍA

Claudia Patricia Lamby Tovar
Odontóloga, magistra en Ciencias, profesora asistente e investigadora del Centro de Investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Olga Lucía Gómez González
Odontóloga, magistra en Ciencias, profesora asistente e investigadora del Centro de Investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Lorenza María Jaramillo Gómez
Ingeniera química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Magistra en Ciencias, candidata a doctora en Ciencias, profesora asistente e investigadora del Centro de Investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Antecedentes: La α -amilasa salival humana (AASH) es la proteína más abundante en la saliva; tiene varias funciones que la hacen especial desde el punto de vista cariogénico, por lo cual puede estar relacionada con el índice de caries. **Propósito:** Determinar las diferencias en la concentración de AASH en niños con diferentes índices de caries. **Métodos:** Se obtuvieron muestras de saliva de 100 niños que se clasificaron dentro de cuatro de las siete categorías del Sistema Internacional de Valoración y Detección de Caries (ICDAS), con 25 individuos por grupo: sanos, opacidad blanca, microcavidad y cavidad extensa. Se determinó la cantidad total de proteína por el método de Bradford y la concentración AASH por medio de la técnica de Elisa indirecta. Los valores obtenidos de proteína total y AASH fueron analizados por medio del *software* Stata versión 9.2. **Resultados:** Al comparar las medias de la concentración de proteína total en los cuatro grupos de estudio, no hubo diferencias estadísticamente significativas. Los promedios de la concentración de AASH en tres de los cuatro grupos: sanos, microcavidad y opacidad blanca, no presentaron diferencias estadísticamente significativas. En el grupo de cavidad extensa, este valor fue menor, diferencia que fue estadísticamente significativa con respecto a los otros tres grupos. **Conclusión:** La menor concentración de AASH en el grupo con cavidad extensa posiblemente indica que, dada la redundancia funcional de esta enzima, la protección de las superficies orales es de mayor importancia.

PALABRAS CLAVE

α -amilasa salival, índice de caries, proteína total, proteínas, enzimas salivales, índice ICDAS.

ÁREAS TEMÁTICAS

Saliva, proteínas salivales, caries dental.

ABSTRACT

Background: Human salivary α -amylase (HSAA) is the most abundant protein in saliva, has several functions that make it of special interest from a cariogenic point of view, thus may be related to the caries indexes. **Purpose:** Determine the differences according to the quantified amounts of HSAA in the saliva of children with different caries indexes. **Methods:** Salivary samples were obtained via spontaneous salivation from a total of 100 children, who were assigned into four groups (n=25 each) according to four categories of the International Caries Detection & Assessment System (ICDAS): sound, white opacity, microcavity and extensive cavity. The total quantity of protein present in each of the samples was determined through the Bradford Method and the concentration of HSAA was determined by an indirect ELISA technique. Non-parametric statistical was performed with Stata 9.2 software. **Results:** Non-significant statistical differences for variable total protein in the four groups were found. The concentration of HSAA showed statistically significant differences between groups of individuals with white opacity and extensive cavities, microcavity and extensive cavity, and sound and extensive cavity. **Conclusions:** The findings suggest that from the different functions identified for HSAA, protection of the tooth surfaces has a major relevance.

KEY WORDS

Salivary α -amylase, caries index, total protein, salivary enzymes, ICDAS index.

THEMATIC FIELDS

Saliva, salivary proteins, dental caries.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Lamby CP, Gómez OL, Jaramillo LM.
Concentración de α -amilasa salival en niños con diferentes índices de caries. Univ Odontol. 2013 Ene-Jun; 32(68): 45-50.

SICI:
2027-3444(201301)32:68<45:CASNIC>2.0.CO;2-3

Recibido para publicación: 08/03/2013
Aceptado para publicación: 24/04/2013

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

INTRODUCCIÓN

La saliva es un fluido corporal de gran importancia para la salud (1). Tiene múltiples funciones que son básicas en el mantenimiento de la integridad de los tejidos orales (2), por lo que se espera que pueda usarse como un biomarcador para el diagnóstico de enfermedades orales (3). La necesidad de identificar proteínas salivales como biomarcadores para la caries dental le da importancia especial a la α -amilasa salival humana (AASH), ya que es la proteína más abundante de la saliva (4), es secretada por varias glándulas salivales —como la parótida, las submandibulares y las sublinguales— (1) y cumple un papel importante en la digestión del almidón, el glucógeno y otros polisacáridos (5), al hidrolizar los enlaces α -1,4 de estos (6). Su nombre químico es α -1,4-D-glucano glucanohidrolasa (7).

La AASH es uno de los mayores constituyentes de la película adquirida, y dado que su distribución varía considerablemente en las diferentes partes de la cavidad oral, se sugiere que la película, en diferentes sitios, también puede contener diferentes cantidades de esta (8). Se une con alta afinidad a varias especies comensales de estreptococos, incluido el *Streptococcus gordonii*, el *Streptococcus mitis*, el *Streptococcus parasanguinis*, el *Streptococcus cristatus* y el *Streptococcus salivarius*, pero no a otros estreptococos cariogénicos como *Streptococcus mutans* y otras especies del grupo *mutans* (9).

Tiene, al menos, tres funciones biológicas distintas (10): a) es la responsable de la actividad hidrolítica del rompimiento inicial de los oligosacáridos del almidón, b) se une al esmalte dental o a la hidroxilapatita y cumple un papel importante en la formación de la placa dentobacteriana y c) esta enzima en solución puede unirse con alta afinidad a los estreptococos orales del grupo *viridans* y, unida a estos, es capaz de hidrolizar almidones que liberan glucosa, que puede ser usada como fuente de alimento y ser metabolizada a ácido láctico, a fin de disolver el esmalte dental, paso crítico en la progresión de la caries. Esta última función es de especial interés desde el punto de vista cariogénico, ya que la glucosa catalizada por la AASH es metabolizada por bacterias cariogénicas (11-13), y podría esperarse que su concentración tuviera relación con el índice de caries. Por esta razón, el propósito del presente estudio fue establecer diferencias en la concentración de AASH en niños con diferentes índices de caries.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana. Es un estudio transversal y la población fueron 100 niños en edad escolar, de ambos sexos, con dentición temporal que tenían entre 3 y 6 años de edad, pertenecientes a un mismo estrato social con ubicación geográfica en la ciudad de Bogotá, Colombia. Se realizó la evaluación de 500 escolares seleccionados por lista de asistencia en tres jardines escolares de la ciudad. Después de la profilaxis se realizó el examen clínico a cada niño y se clasificaron de acuerdo con los criterios de mayor prevalencia en el Sistema Internacional de Valoración y Detección de Caries (ICDAS, por su sigla en inglés) (14) dentro de cuatro grupos de 25 individuos: sanos, opacidad blanca, microcavidad y cavidad extensa. Los niños que presentaron otro tipo de proceso infeccioso oral diferente a caries dental o que estaban con antibioterapia fueron descartados del estudio.

Toma y recolección de las muestras

Se tomaron muestras de saliva por salivación espontánea sin estimulación, con la firma previa del consentimiento informado por parte del representante legal de cada niño. En un envase de vidrio totalmente estéril se recogieron aproximadamente 1,5 ml de saliva por cada individuo y se transportaron al laboratorio del Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, donde, por medio de los procedimientos operativos estandarizados, los investigadores con entrenamiento en las técnicas usadas procesaron y analizaron las muestras.

Tratamiento de las muestras

Las muestras de saliva se clarificaron por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 min. Se descartó el precipitado, y al sobrenadante que contenía la fracción de interés se le adicionó una solución inhibidora de proteasas a pH 7,5 (Tris [0,1 M], Na₂EDTA (2%), n-propanol (10%), fluoruro de fenilmetanosulfonilo [2 mM]) en una proporción de 0,1 ml por cada mililitro de muestra, y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas totales

Se determinó la cantidad de proteína total por el método de Bradford. Para ello se prepararon soluciones estándar de proteínas con albúmina sérica bovina, que hicieron diluciones seriadas en un rango de 50 a

1400 mg/ml. En tubos de 13 x 100 mm, se sirvieron 100 ml de cada una de las diluciones de albúmina, 100 ml de cada muestra, y para el blanco, 100 ml de agua destilada. A cada uno de los tubos en el paso anterior se le adicionó 3 ml del reactivo de Bradford y se mezclaron. Se leyó la absorbancia de cada uno de los tubos a 580 nm, en un espectrofotómetro (Human 2000, Humareader®).

Realizadas las lecturas, se construyó una curva de calibración de absorbancia contra concentración de las diluciones seriadas de albúmina, a través de la cual se determinó el valor de la concentración de cada una de las muestras por la interpolación de sus absorbancias en la curva de calibración.

Cuantificación de AASH

La determinación de la concentración de la AASH se hizo por medio de la técnica de ELISA indirecta. En todos los pasos de este ensayo el volumen adicionado de las soluciones de trabajo a cada pozo de la placa fue de 100 ml, y a menos que se especifique, los pasos de incubación se realizaron en cámara húmeda a 37 °C, y en total oscuridad. Después de cada paso de incubación, la placa fue lavada tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05% (Sigma, P3813), usando un lavador automático (Human). Se hicieron varios ensayos en los que se probaron diferentes diluciones de las muestras y se encontró que en la dilución 1:100 fue en la que los resultados se comportaron dentro del rango de operación de los equipos usados en las mediciones.

Las placas de ELISA se fijaron por la adición de un anticuerpo monoclonal comercial sintetizado con AASH

(Roche, 11543598) en una dilución 1:200 con *buffer* fosfato (PBS) e incubados durante 3 h y después refrigerados a 4 °C durante 16 h. Después de la fijación se hizo un bloqueo de los sitios activos que pudieron quedar libres con la adición de una solución de leche descremada al 3% (leche descremada Proleche). Se adicionaron las muestras de saliva de cada individuo diluidas 1:100 en PBS y se incubaron durante 1 h, al cabo de la cual se adicionó el anticuerpo secundario, que es un anticuerpo policlonal contra AASH hecho en cabra (Abcam, ab8944-1).

Después se adicionó la antinmunoglobulina G (anti-IgG) que estaba conjugada con fosfatasa alcalina (Abcam, ab6748-1) en una dilución 1:20.000 y se incubó durante 1 h. Finalmente se hizo la adición e incubación durante 30 min del sustrato para obtener la reacción de color con 100 ml de parnitrofenilfosfato (Sigma, N1891). Se leyó la absorbancia para cada pozo a 405 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm, en un espectrofotómetro (Humareader, Human).

Para expresar los valores de absorbancia obtenidos con las muestras de saliva de los niños en términos de concentración, se creó una curva de calibración usando AASH comercial (Sigma, A1031), con la que se prepararon soluciones en diluciones seriadas y a las que también se les hizo la lectura de la absorbancia. Por medio de la interpolación de las absorbancias de las muestras de saliva de los niños, en la curva obtenida con la AASH comercial se estableció la concentración de AASH para cada individuo evaluado (tabla 1).

TABLA 1
DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIANAS DE LA CONCENTRACIÓN
DE PROTEÍNA TOTAL Y DE AASH, EN LOS CUATRO GRUPOS DE ESTUDIO

Variable/grupo	Sanos	Opacidad blanca	Microcavidad	Cavidad extensa
Concentración de proteína total (mg/ml)	343 IC 95% = 248,8-394,4	324 IC 95% = 284,6-457,6	447 IC 95% = 313,1-521,5	320 IC 95% = 270,3-444,1
Concentración AASH (mg/ml)	87,9 IC 95% = 81,9-93,7	71,6 IC 95% = 51,7-84,4	68,1 IC 95% = 62,5-83,3	47,8 IC 95% = 29,9-56,3

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa Stata 9.2 (Statacorp Inc.). Se hicieron comparaciones múltiples para datos independientes por medio de la prueba U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Se evaluaron clínicamente un total de 500 niños; de estos se seleccionaron 100 que cumplieron con los criterios de inclusión y que se pudieron clasificar con el mismo número de individuos dentro de los grupos propuestos en el estudio, de acuerdo con sus índices de caries, así:

Grupo I: sanos, individuos con ausencia de desmineralización.

Grupo II: opacidad blanca, quienes tuvieran desmineralización limitada al tercio medio exterior del esmalte.

Grupo III: microcavidad, quienes tuvieran caries pero en los que la dentina no estuviera visible.

Grupo IV: cavidad extensa, con pérdida de la estructura del diente en la que la dentina fuera visible.

Por cada niño se recolectó entre 1 y 2 ml de saliva. Las muestras se procesaron en el mismo orden de la recolección y se conservaron a -20°C durante un periodo máximo de una semana, para evitar las variaciones diarias causadas por la actividad proteolítica endógena. Los resultados obtenidos en la determinación de proteína total y de concentración de AASH no se ajustaron a la distribución normal, por lo que fue necesario aplicar un método de estadística no paramétrica. Se hicieron múltiples comparaciones para los datos independientes por medio de la prueba de U de Mann-Whitney con una corrección para el valor de α con $p = 0,0083$. Por medio del análisis se encontró que comparando las medias de la concentración de proteína total en los cuatro grupos de estudio no hay diferencias estadísticamente significativas; que la media de la concentración de AASH en tres de los cuatro grupos: sanos, microcavidad y opacidad blanca no presentaron diferencias estadísticamente significativas; en el grupo de cavidad extensa este valor es menor, y establece diferencias significativas entre este grupo con los otros tres.

DISCUSIÓN

El conocimiento alcanzado sobre la composición de la saliva, junto con la evolución tecnológica de las últimas dos décadas, despertó en la comunidad científica un gran interés por el uso y aplicación clínica del denominado *diagnóstico salival* (15). Actualmente es claro que la saliva es un fluido corporal de gran

importancia en los ámbitos odontológico y médico. La cuantificación de sus constituyentes ha validado su uso como biomarcadores para la detección temprana de enfermedades, el monitoreo de tratamientos (15) y hasta para la predicción temprana de enfermedades sistémicas (16), ya que en ella se encuentran sustancias producidas en la cavidad oral y otras que, aunque son sintetizadas en otros órganos del cuerpo, son transferidas allí por la existencia de una capa de células epiteliales que separan los conductos salivales de la circulación sistémica, lo que permite la transferencia de sustancias del suero a la saliva por diferentes mecanismos de transporte (17). Adicionalmente, el estudio de la saliva ofrece muchas ventajas con respecto al estudio de sustancias en suero (18,19): es fácil de recolectar sin necesidad de usar técnicas invasivas (20), y los volúmenes adquiridos en los muestreos son suficientes para aplicar las distintas técnicas de análisis de su composición.

Dentro de los componentes de la saliva, la AASH ha sido ampliamente estudiada, por ser la que se encuentra en mayor concentración (21,22) y presentar un carácter multifuncional (7). Su concentración se ha determinado indirectamente a partir de la medición de su actividad, para usarla como marcador de la actividad del sistema nervioso simpático, ya que definitivamente su concentración aumenta cuando las personas están expuestas a condiciones de estrés (23). También se ha medido en grupos de individuos que poseen una condición específica como caries (24), asma (25), diabetes (26), etc., con el fin de encontrar su relación tanto con enfermedades orales como con enfermedades sistémicas. En la mayoría de los casos, su medición se ha realizado en unidades de actividad enzimática por mililitro de saliva (U/ml), donde la unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 mM de sustrato por minuto (27).

Diferentes estudios han tratado de definir precisamente la participación de AASH en la caries. En este se quiso encontrar una asociación entre el índice de caries presentado por los niños que participaron y la concentración de esta proteína. Se usó la técnica de ELISA indirecta con un anticuerpo monoclonal específico para AASH, de acuerdo con el método desarrollado por Quarino y colaboradores, en 2005 (28), que permite determinar directamente la concentración de esta, pero solo de la que se produce en el medio oral, a través de las glándulas salivales, sin el reconocimiento del contenido de otras α -amilasas, como las de origen pancreático (1,6), usando como unidades de

medición microgramos/mililitro (mg/ml), que facilitan la comparación con otros estudios clínicos de medición de biomarcadores. Los resultados mostraron que la concentración de AASH es similar en los grupos de individuos sanos y en los que presentan una menor progresión de la enfermedad (opacidad blanca y microcavidad), mientras que en los individuos del grupo más afectado se encontró la mitad de la concentración mostrada en los otros grupos.

Posiblemente estos resultados se asocien con el hecho de que de las diferentes funciones identificadas para AASH, la función protectora de las superficies orales sea la más importante, similar a lo reportado por un estudio en el cual se encontró que bajas mediciones de AASH estaban relacionadas con enfermedades orales como la caries (24). Adicionalmente, el muestreo de todos los individuos participantes permitió la adquisición de volúmenes adecuados para la medición del contenido total de proteína sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los individuos.

Considerando esta proteína de una manera independiente, quizás la principal función es la eliminación de bacterias de la cavidad oral, porque la proteína se une a diferentes especies de bacterias orales y la formación de agregados son fácilmente removidos por la deglución, fonación y cepillado de los dientes (10). Por otro lado, microorganismos no cariogénicos son unidos más fácilmente por su mediación; sin embargo, una alta concentración de proteína regula la unión de las bacterias que ocupan los sitios de unión, los cuales permiten o limitan el establecimiento de la flora patogénica. Desde el punto de vista global, altas concentraciones de AASH podrían influenciar la preservación del balance químico en la cavidad oral, guiando la función de la saliva a mantener la salud oral y un balance ecológico apropiado.

CONCLUSIÓN

Este estudio hace parte de las primeras aproximaciones, en cuanto a la asociación de la concentración de una proteína salival específica con el índice de caries entre individuos de la población colombiana. Los resultados posiblemente indican que de la redundancia funcional que presenta esta enzima, la protección de las superficies orales es la de mayor importancia; además, suministra información interesante que podría usarse para analizar el tamaño de muestra en estudios futuros con muestras mayores, en los que se busque elaborar una prueba de diagnóstico para la

determinación de la susceptibilidad o resistencia de la caries, basado en la concentración de la AASH.

REFERENCIAS

1. Peng Y, Chen X, Sato T, Rankin SA, Tsuji RF, Ge Y. Purification and high-resolution top-down mass spectrometric characterization of human salivary α -amylase. *Anal Chem.* 2012 Apr 3; 84(7): 3339-46.
2. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* 2011 May; 17(4): 345-54.
3. Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro GF. Salivary proteins as a biomarker for dental caries-A systematic review. *J Dent.* 2013 Jan; 41(1): 2-8.
4. Bailey UM, Punyadeera C, Cooper-White JJ, Schulz BL. Analysis of the extreme diversity of salivary alpha-amylase isoforms generated by physiological proteolysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Dec 12; 911: 21-6.
5. Fisher SZ, Govindasamy L, Tu C, Agbandje-McKenna M, Silverman DN, Rajaniemi HJ, McKenna R. Structure of human salivary alpha-amylase crystallized in a C-centered monoclinic space group. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2006 Feb 1; 62(Pt 2): 88-93.
6. Ramasubbu N, Rangunath C, Mishra PJ, Thomas LM, Gyémánt G, Kandra L. Human salivary alpha-amylase Trp58 situated at subsite -2 is critical for enzyme activity. *Eur J Biochem.* 2004 Jun; 271(12): 2517-29.
7. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(3-4): 301-7.
8. Carlén A, Bratt P, Stenudd C, Olsson J, Strömberg N. Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. *J Dent Res.* 1998 Jan; 77(1): 81-90.
9. Chaudhuri B, Rojek J, Vickerman MM, Tanzer JM, Scannapieco FA. Interaction of salivary alpha-amylase and amylase-binding-protein A (AbpA) of *Streptococcus gordonii* with glucosyltransferase of *S gordonii* and *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol.* 2007 Jun 25; 7: 60.
10. Rohleder N, Nater UM. Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological

- considerations. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 May; 34(4): 469-85.
11. Carlén A, Bratt P, Stenudd C, Olsson J, Strömberg N. Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. *J Dent Res*. 1998 Jan; 77(1): 81-90.
 12. Douglas CW, Pease AA, Whiley RA. Amylase-binding as a discriminator among oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett*. 1990 Jan 1; 54(1-3): 193-7.
 13. Aguirre A, Levine MJ, Cohen RE, Tabak LA. Immunochemical quantitation of alpha-amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages. *Arch Oral Biol*. 1987; 32(4): 297-301.
 14. Ekstrand KR, Martignon S, Ricketts DJ, Qvist V. Detection and activity assessment of primary coronal caries lesions: a methodologic study. *Oper Dent*. 2007 May-Jun; 32(3): 225-35.
 15. Wong DT. Salivaomics. *J Am Dent Assoc*. 2012 Oct; 143(10 Suppl): 19S-24S. PubMed PMID: 23034834.
 16. Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, Chia D, Elashoff D, Akin D, Paster BJ, Joshipura K, Wong DT. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*. 2012 Apr; 61(4): 582-8.
 17. Liu J, Duan Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol*. 2012 Jul; 48(7): 569-77.
 18. Hoek GH, Brand HS, Veerman EC, Amerongen AV. Toothbrushing affects the protein composition of whole saliva. *Eur J Oral Sci*. 2002 Dec; 110(6): 480-1.
 19. Slavkin HC. Toward molecularly based diagnostics for the oral cavity. *J Am Dent Assoc*. 1998 Aug; 129(8): 1138-43.
 20. Aydin S. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *J Biochem Mol Biol*. 2007 Jan 31; 40(1): 29-35.
 21. Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF, Kirschbaum C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology*. 2006 Nov; 43(6): 645-52.
 22. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, Ehlert U. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol*. 2005 Mar; 55(3): 333-42.
 23. Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Saliva: a dynamic proteome. *J Dent Res*. 2007 Aug; 86(8): 680-93.
 24. Fiehn NE, Oram V, Moe D. Streptococci and activities of sucrases and alpha-amylases in supra-gingival dental plaque and saliva in three caries activity groups. *Acta Odontol Scand*. 1986 Feb; 44(1): 1-9.
 25. Wolf JM, Nicholls E, Chen E. Chronic stress, salivary cortisol, and alpha-amylase in children with asthma and healthy children. *Biol Psychol*. 2008 Apr; 78(1): 20-8.
 26. Yavuzylmaz E, Yumak O, Akdoğanlı T, Yamalik N, Ozer N, Ersoy F, Yeniay I. The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. *Aust Dent J*. 1996 Jun; 41(3): 193-7.
 27. Neyraud E, Palicki O, Schwartz C, Nicklaus S, Feron G. Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking. *Arch Oral Biol*. 2012 May; 57(5): 556-66.
 28. Quarino L, Dang Q, Hartmann J, Moynihan N. An ELISA method for the identification of salivary amylase. *J Forensic Sci*. 2005 Jul; 50(4): 873-6.

CORRESPONDENCIA

Claudia Patricia Lamby Tovar
clamby@javeriana.edu.co

Olga Lucía Gómez González
Olga.gomez@javeriana.edu.co

Lorenza María Jaramillo Gómez
lorenzaj@javeriana.edu.co