

Artículo Original

ISSN: 1315 2823
INDICE REVENCYT: RV0003
LATINDEX: 18219
PERIODICA
IMBIOMED**Características fisicoquímicas de la saliva de parótida y actividad antimicrobiana-antioxidante de la peroxidasa salival en escolares con gingivitis****Physicochemical characteristics and antimicrobial-antioxidant activity salivary peroxidase of parotid saliva in scholar children with gingivitis**

Pérez D. Mariela, Villalobos G. Angela

Departamento de Ciencias Morfofuncionales. Facultad de Odontología.

Universidad de Carabobo

mdperez1@uc.edu.ve

Recibido: 18/05/2011

Aceptado: 08/06/2011

Resumen

La saliva es un fluido hipotónico, con una excreción total de 1 -1,5 L/día, pero en condiciones de estimulación glandular se incrementa a 0,3-0,4 mL/min, representada principalmente (50%) por la saliva de la glándula parótida. La saliva contiene electrólitos y macromoléculas como peroxidasa salival, enzima con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. En este estudio se determinaron las características fisicoquímicas de la saliva de parótida estimulada (flujo salival, pH, capacidad amortiguadora) y la actividad de la peroxidasa salival en escolares con gingivitis. La muestra estuvo conformada por 16 niños con gingivitis, entre 9 y 14 años de edad, del sexo femenino y masculino. El diagnóstico de la enfermedad gingival se realizó según índice gingival (Loe-Silness), placa gingival (Silness-Loe) y sangramiento (Ainamo- Bay). Se determinó la actividad de la peroxidasa salival (espectrofotometría), flujo salival, pH, concentración de bicarbonato (HCO_3^-) y proteínas. El promedio del flujo salival fue $0,75 \pm 0,31$ mL/min/gland y volumen total $4,5 \pm 1,8$ mL; pH $8,3 \pm 0,7$; HCO_3^- : $61,13 \pm 21,84$ mM y proteínas: 100 a 200 mg/dL en el 87% de los niños. Todos ellos presentaron placa dentobacteriana y gingivitis. La peroxidasa salival mostró mayor actividad enzimática en condiciones 1mM H_2O_2 , pH7 (25, 36-38°C). Los resultados de este estudio mostraron que la actividad de la peroxidasa salival y la capacidad amortiguadora, no resultaron afectadas en los escolares que presentaron placa dentobacteriana y gingivitis.

Palabras clave: saliva estimulada, saliva parótida, peroxidasa salival, flujo salival.

Summary. Physicochemical characteristics and antimicrobial-antioxidant activity salivary peroxidase of parotid saliva in scholar children with gingivitis.

Saliva is a hypotonic fluid, the whole salivary flow excretion is a 1-1.5 L/day, but in conditions of glandular stimulation increases to 0.3-0.4 mL/min, represented mainly (50%) by saliva the parotid gland. Saliva contains electrolytes and macromolecules such as salivary peroxidase, enzyme with antimicrobial and antioxidant properties. In this study, it was determined the physicochemical characteristics of stimulated parotid saliva (salivary flow, pH, buffering capacity) and salivary peroxidase (spectrophotometry) in scholars with gingivitis. The sample was constituted by 16 children with gingivitis, between 9 and 14 years old, female and male. The diagnosis of gingival disease was determined by gingival index (Loe-Silness), gingival plaque (Silness-Loe) and bleeding (Ainamo-Bay). Salivary peroxidase was determined (spectrophotometry), salivary flow, pH, $[\text{HCO}_3^-]$ and proteins. The results showed that the mean salivary flow was 0.75 ± 0.31 mL / min / gland and total volume 4.5 ± 1.8 mL, pH 8.3 ± 0.7 , $[\text{HCO}_3^-]$: 61.13 ± 21.84 mM, and proteins 100-200 mg/dL in 87% of children. All the children had dental plaque and gingivitis. The salivary peroxidase showed activity in conditions 1mM

H₂O₂, pH7 (25, 36-38°C). These results showed that the activity of salivary peroxidase and the buffer capacity were not affected in children with dental plaque and gingivitis.

Key words: stimulated saliva, parotid saliva, salivary peroxidase, salivary flow.

Introducción

La saliva humana presenta más de 309 proteínas que contribuyen a mantener la homeostasis dentro de la cavidad oral. Dentro de este proteoma salival humano, se ha aislado la peroxidasa salival, de 80,3 kDa con un punto isoeléctrico 8,89, la cual es una enzima con actividad antimicrobiana-antioxidante.¹ Se deriva tanto de los ácinos de las glándulas salivales, como de los leucocitos que atraviesan el epitelio del surco gingival, siendo la del origen acinar la que muestra mayor actividad antimicrobiana-antioxidante.^{2,3}

La peroxidasa salival es una hemoproteína con sitios de unión para el calcio,⁴ tiene como sustratos *in vivo* el ión tiocianato (SCN⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂); su producto a pH neutro es el ión hipotiocianato (OSCN⁻),⁵ y a pH bajo, el hipotiocianato ácido (HOSCN⁻), el cual está en equilibrio ácido-base con el OSCN⁻. Ambas moléculas, inhiben enzimas como la hexoquinasa, gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa y otras enzimas de la glicólisis microbiana; así como, también inhibe el sistema de transporte de azúcares y aminoácidos, tales como, lisina y ácido glutámico; además, altera el gradiente electroquímico de la pared bacteriana.^{2,6}

Debido a su carga iónica, el HOSCN⁻ puede penetrar la membrana microbiana mucho más rápido que el OSCN⁻, por lo tanto, el efecto antimicrobiano es más eficaz a pH bajo. Además, la actividad antimicrobiana-antioxidante del sistema peroxidasa salival es proporcional a la concentración del OSCN⁻ y es más efectivo en saliva obtenida en condición de reposo, que en saliva de glándula estimulada, debido a que el pH de esta última, es más alcalino y su flujo presenta una disminución inmediata de los niveles del ión OSCN⁻, principalmente durante la expectoración. La presencia del tiocianato y del H₂O₂, tienen un origen glandular endógeno, ya que las glándulas

salivales sanas están desprovistas de bacterias y leucocitos.⁷

La placa dentobacteriana tiene un predominio de polisacáridos extracelulares como glucanos y fructanos y presenta una estructura que disminuye la permeabilidad hacia el exterior de metabolitos, como los ácidos formados por los microorganismos de la placa,^{8,9} y disminuye la difusión dinámica hacia el interior de la placa, por del tiocianato y enzimas como la peroxidasa salival, no permitiendo que su función desintoxicante y antimicrobiana sea efectiva.^{5,10}

Además en la placa dentobacteriana, puede estar disminuida la función antimicrobiana de la peroxidasa salival debido a la presencia de proteasas de origen microbiano, que pueden afectar la actividad catalítica de la enzima y la producción del hipotiocianato/ hipotiocianato ácido;¹⁰ por lo tanto, en el presente estudio se determinó la actividad de la peroxidasa salival y las características fisicoquímicas de la saliva obtenida de la glándula parótida estimulada de niños escolares con gingivitis.

Materiales y métodos

Esta investigación es de tipo descriptiva. La población fue 82 niños en edad escolar (9-14 años) que asistieron al área de Odontopediatría I de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo, desde febrero a junio del 2006. La muestra estuvo conformada por 16 escolares (n: 8 niñas y 8 niños).

Previamente, se realizó una prueba piloto en 10 escolares, en una muestra de saliva de parótida estimulada, con un nivel de confianza 0,99, en el que se mostró varianza del flujo salival 0,078mL/min/glándula.

Para la selección de los sujetos se consideraron los siguientes criterios de exclusión: niños con tratamientos odontológicos de ortopedia y/o ortodoncia, que recibían tratamientos farmacológicos y/o presentaban patologías que eventualmente podrían afectar la fisiología de las glándulas salivales, tales como enfermedades infecciosas y/o sistémicas, traumatismos).

Los criterios de inclusión fueron: niños en edad escolar con gingivitis y erupción de las unidades dentarias 15, 16, 17, 25, 26 y 27, debido a su proximidad anatómica con el conducto excretor de la parótida (éste contribuye 50%, en condición de estimulación, al flujo de saliva total).

Para los fines de estudio, la muestra se clasificó según grupo etario: de 9 a 10 años, 11 a 12 años y 13 a 14 años de edad.

La investigación se apejó a las Normas de la Comisión de Bioética y Bioseguridad del Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias por lo cual se empleo el consentimiento informado escrito que fue firmado por los padres o representantes de los niños que participaron en la presente investigación.¹¹

Recolección de muestra de saliva. Se cateterizó el conducto excretor y posteriormente se estimuló la secreción de la glándula, con ácido cítrico cada 30 segundos durante seis minutos de recolección.¹² Las muestras se distribuyeron en alícuotas de 1 mL y se congelaron a (-20°C) durante una semana, como tiempo máximo, para el procesamiento de las mismas.

Sialometría y características fisicoquímicas de la saliva de parótida estimulada. Se determinó el volumen total obtenido y el flujo salival expresado en mL/min/glándula en seis minutos. Se midió pH (pHmetro Ecoscan Ec-PH510). La capacidad amortiguadora, se obtuvo mediante la titulación de la saliva de parótida estimulada con ácido láctico 0,1N, empleando el anaranjado de metilo (pH 3,1-4,4) como indicador colorimétrico.

La determinación de la concentración de las proteínas totales fue por espectrofotometría a 593nm (Spectronic 20) con el método Bradford con *comassie brilliant blue G-250*.¹³

Actividad de la peroxidasa salival. Se verificó a través del método espectrofotométrico utilizando el guayacol (Sharlau) como sustrato oxidable.¹⁴ Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: buffer fosfato 0,1 M pH 7: (fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico), guayacol 30mM y H₂O₂ 1mM. La oxidación del guayacol fue monitoreada a 470 nm (Spectronic 20) durante dos minutos con lecturas cada

20 segundos a una temperatura 25 °C. Los experimentos se realizaron por triplicado y la actividad de la enzima se expresó en unidades de absorbancia por minuto.

Para determinar la actividad de la peroxidasa, se realizaron ensayos en las mismas condiciones iónicas y de temperatura, variando solo la concentración del sustrato H₂O₂ (1mM, 2mM, 5mM, 10mM). En otros ensayos, se analizó el efecto del pH sobre la actividad de la enzima, manteniendo las condiciones de concentración de sustratos y temperatura, variando solo el pH (3, 5, 7 y 9) del buffer fosfato. Se consideró además, el efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la enzima, por lo que se realizaron ensayos variando solo la temperatura (25°C, 36°C, 37°C y 38°C), en las condiciones iónicas y de concentración de sustrato inicialmente señaladas.

Diagnóstico de gingivitis en escolares.

Se realizó una evaluación clínica odontológica utilizando espejo bucal y sonda periodontal. A todos los sujetos, se examinaron las encías del primer y segundo premolar superior y del primer y segundo molar superior (UD 15, UD 16, UD 17, UD 25, UD 26 y UD 27), según indicadores de inflamación gingival, el índice gingival propuesto por Loe-Silness, índice de sangramiento GBI (gingival bleeding index- Ainamo-Bay) y el indicador de placa dental de Silness-Loe.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15.0 y se realizaron estadísticos descriptivos.

Resultados

Características fisicoquímicas de la saliva de parótida estimulada

El flujo salival exhibió un rango (0,5-1,18 mL/min/glándula) con un promedio de 0,75 ± 0,31 mL/min/gland. La fluctuación del volumen total obtenido con estimulación fue de 2 a 7mL, presentando un promedio del volumen total de 4,5 ±1,8 mL.

Los valores de pH oscilaron entre 7 y 9 con un promedio de $8,3 \pm 0,7$. Ningún escolar presentó pH de saliva de parótida estimulada inferior a 6 (datos no mostrados en tabla).

El sistema buffer estudiado fue el ácido carbónico/ bicarbonato en función de la concentración de bicarbonato. En 87% de los pacientes estudiados se observaron concentraciones de bicarbonato comprendidos entre 30 y 89 mM, con un valor promedio de $61,13 \pm 21,84$ (resultados no mostrados).

La concentración de proteínas totales evidenciaron valores entre 100 y 200 mg/dL en 87% de los casos (resultados no mostrados). Solo el grupo etario de 11 a 12 años (n: 11), presentó valores de proteínas totales entre 100 mg/dL y 250mg/dL, mientras que 75% de las niñas, cifras entre 125 mg/dL y 250 mg/dL.

Peroxidasa salival o sialoperoxidasa.

La actividad de la enzima se determinó monitoreando la oxidación del guayacol mediante el incremento de la absorbancia (A_{470}) por minuto. Los ensayos mostraron que la concentración de sustrato (H_2O_2) influyó sobre la cinética enzimática con una actividad máxima $0,27 \pm 0,018 A_{470} / \text{min}$ a la concentración de H_2O_2 de 1mM (Fig 1).

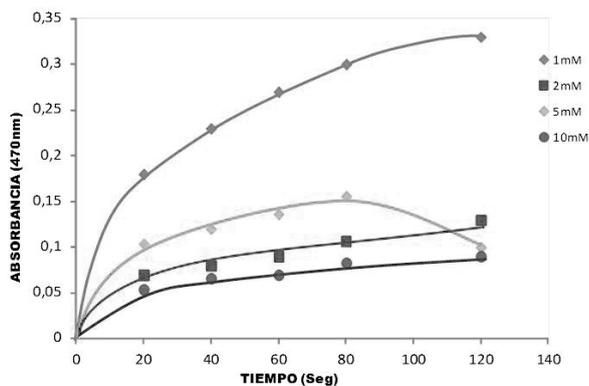


Figura 1. Efecto de la concentración de H_2O_2 sobre la peroxidasa salival

La cinética de la enzima en presencia de 1mM de H_2O_2 y en función del pH presentó máxima actividad $0,25 \pm 0,01 A_{470} / \text{min}$ a pH 7 fisiológico, mostrando disminución de la actividad a valores superiores o inferiores de pH 7 (Fig 2).

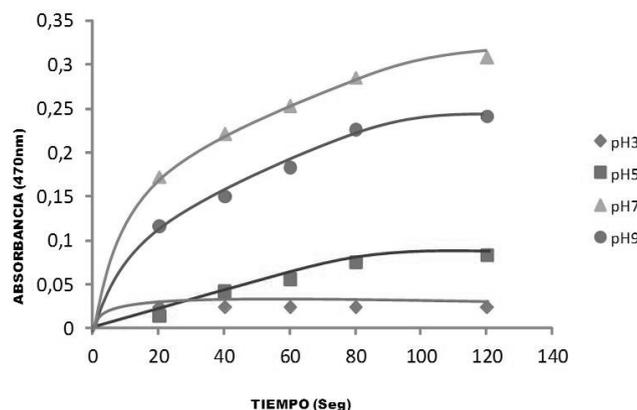


Figura 2 Efecto del pH sobre la enzima peroxidasa salival

Asimismo, el comportamiento catalítico de la peroxidasa salival en presencia de variaciones de temperatura (25, 36, 37 y 38°C) a 1mM de H_2O_2 y pH 7, mantuvo su actividad catalítica; sin embargo, la máxima actividad se observó a 25°C $0,25 \pm 0,01 A_{470} / \text{min}$ y en un rango menor de actividad $0,20 \pm 0,018 - 0,17 \pm 0,011 A_{470} / \text{min}$ entre los 36-38°C (Fig 3).

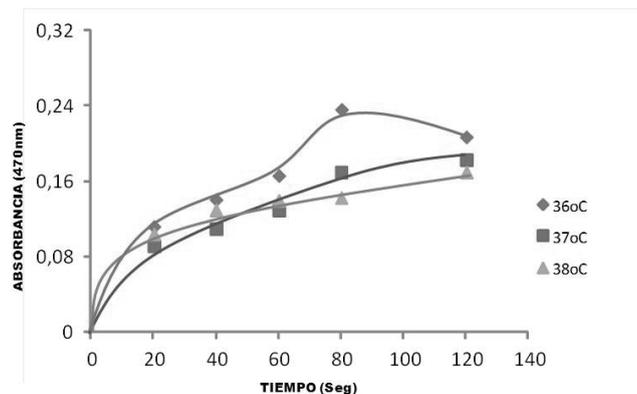


Figura 3. Efecto de la temperatura sobre la enzima peroxidasa salival

Evaluación de la condición gingival y de la placa dentobacteriana en los escolares:

Hubo evidencia de placa dentobacteriana en todos los pacientes; sin embargo, se observó mayor prevalencia de placa escasa (66,6%) en el grupo etario de 13 a 14 años.

El índice gingival reveló que todos los escolares presentaron inflamación gingival, de leve a moderada, mostrando una mayor prevalencia de inflamación moderada (62,5%); sin embargo, ésta solo se presentó en el grupo de 13 y 14 años de

edad (resultados no mostrados). El promedio del índice de sangramiento de las unidades dentarias 15, 16, 17 y 25, 26, 27 fue $7,69 \pm 4,94$ márgenes sangrantes y 81,3% de los escolares presentaron márgenes sangrantes entre 1 a 12.

Discusión

La saliva es un fluido hipotónico, cuyo promedio diario de excreción varía entre 1 y 1,5 litros; de éstos, el flujo de la saliva total en condiciones de no estimulación glandular es 0,3 a 0,4 mL/min;¹⁵ la cuota diaria de la glándula parótida no estimulada es aproximadamente al 20%, pero su contribución se incrementa hasta 50% de la excreción total de saliva en condiciones de estimulación glandular.¹⁶ Hiraba y col, reportaron que la secreción de saliva estimulada procedente de la parótida puede llegar hasta 62% de la saliva total, señalando que existen variaciones en el flujo salival de la glándula parótida izquierda con respecto a la derecha.¹⁷

En la presente investigación, los escolares evidenciaron un flujo salival de parótida en condiciones de estimulación glandular entre 0,5 y 1,18 mL/min/gland, resultado similar al reportado por Gandara y col.¹⁸ Kalk y col, en un estudio realizado en jóvenes sanos mostró un promedio de flujo salival, ubicado dentro del rango observado en esta investigación.¹⁹ Heft y col, en una investigación en adultos de diferentes edades, reportaron valores de flujo salival que oscilaron entre 0,63 y 0,8 mL/min/gland, por lo cual se puede inferir, que la edad no debe ser una variable determinante en el flujo salival de la glándula parótida.²⁰

Sin embargo, se han señalado cifras de flujo salival inferiores a los mostrados, en glándula parótida estimulada, de 0,374 mL/min/gland, diferencia que puede ser atribuida a que el promedio que se obtuvo en dicha investigación fue obtenido a partir del pool de muestras de saliva de todos los pacientes.²¹ Es importante señalar, que las variaciones en el flujo salival se afectan por factores, tanto fisiológicos como patológicos, las cuales de forma reversible o irreversible inciden en la secreción salival, tales como son el grado de hidratación, la posición del cuerpo, la exposición a la luz, el método de estimulación,

tamaño de la glándula y el consumo de drogas.^{15,22} Estas fluctuaciones, se han establecido inter e intraindividual, con modificaciones hasta el 50%, dependiendo del ritmo circadiano;^{21,23} sin embargo, en el grupo de estudio no se observó variaciones importantes con respecto a la reportada en pacientes sanos.

La saliva presenta valores de pH que oscilan entre 6,7 y 7,5.²⁴ Pero en condiciones de estimulación alcanza un pH de 7,5 a 8;²⁵ es decir, que la saliva de parótida estimulada incrementa el pH a medida que aumenta la tasa de flujo salival,²⁶ tal como se demostró en la presente investigación. El pH ligeramente alcalino determinado, se atribuye a la disminución de reabsorción del bicarbonato, durante su paso por los canales excretores de la glándula (intercalares y estriados), debido a un aumento de la velocidad de excreción del flujo salival (condición de estimulación); además, es importante señalar su participación como ion del sistema amortiguador ácido/base de las glándulas salivales. En este sentido, el valor promedio observado del HCO_3^- en el grupo de estudio, fue muy superior a los reportados por Turner y col y Pruitt y col.^{27,28} Esto se debe a que durante la estimulación glandular se incrementa el flujo salival e inclusive el pH aumenta.

El otro sistema amortiguador importante de la saliva, obtenida por estimulación glandular es representado por las proteínas. En este estudio, los escolares mostraron resultados similares al reportado por Kalk y col; sin embargo, se han reportados valores de proteína totales de saliva de parótida en jóvenes sanos de 60 mg/dL,¹⁹ aunque este sistema amortiguador de la saliva ha sido poco documentado. Es importante señalar que la capacidad amortiguadora de la saliva de parótida, en condiciones de estimulación no se encuentra alterada; así mismo, los valores de pH están dentro del rango que favorece la actividad catalítica de la peroxidasa salival para la producción del hipotiocianato.

La actividad de la peroxidasa salival se estudió en función de la concentración de sustrato H_2O_2 , pH y temperatura. En relación a las diferentes concentraciones de H_2O_2 utilizadas, se evidenció que la enzima presentó una máxima actividad catalítica a la concentración de sustrato de H_2O_2

1mM, aumentando la velocidad de formación del producto de la reacción desarrollada experimentalmente (guayacol + H₂O₂ → tetraguayacol + H₂O). A partir de concentraciones superiores a 1mM, la velocidad de la reacción decreció notablemente, resultando el H₂O₂ un factor limitante en la velocidad de esta reacción. Aunque se ha reportado que la tasa de formación del tetraguayacol, se incrementa a concentraciones por encima de H₂O₂ 0,1 mM.³

En cuanto a la actividad de la enzima peroxidasa salival expresada en función del pH, se observó que la enzima, presentó actividad máxima a pH 7 fisiológico y mantuvo su actividad inclusive hasta pH 9; sin embargo, se ha mostrado que el pH óptimo de actividad de la peroxidasa está en un rango de 6,5-7.²⁸ Los efectos del pH en las reacciones enzimáticas, se basan en el hecho de que ciertos grupos funcionales críticos de la enzima, del sustrato o del complejo enzima-sustrato se asocian o disocian con los protones. El pH óptimo de la peroxidasa salival depende de los grupos donadores de electrones, es decir de su comportamiento como ácido.² La actividad de una enzima bajo condiciones de pH, por encima o por debajo de su pH óptimo se altera, debido a que las cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o como bases débiles, los cuales desarrollan funciones críticas en el sitio activo de la enzima, afectando el estado de ionización, mientras que en otras zonas de la proteína, algunas cadenas laterales ionizadas pueden jugar un papel esencial en las interacciones que mantiene la estructura proteica.²⁵

Finalmente, la actividad de la peroxidasa salival mostró estabilidad en su actividad catalítica a temperaturas 25, 36-38°C, aunque su máxima actividad observada en los ensayos fue a 25°C, lo cual corresponde a la interacción enzima-sustrato artificial que se empleó en el presente estudio (guayacol).

Conclusión

Los resultados de esta investigación evidencian que las características fisicoquímicas de la saliva de parótida estimulada en esta muestra, son similares a las reportadas en individuos sanos y la actividad de la peroxidasa salival se mantuvo

en condiciones 1mM H₂O₂ pH 7, por lo tanto, es posible que en los pacientes que conformaron la muestra, los productos metabólicos de los microorganismos presentes en la placa no ejercieron influencia importante sobre la actividad catalítica de la peroxidasa.

Agradecimientos

Al Fondo de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo quien financió la presente investigación y al Dr. Oscar Mora, profesor de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo por su participación en la recolección de la muestra.

Referencias

1. Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek R, Li Y, Loo J, Wong D. Large scales indentification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electroforesis-mass spectrometry. *Proteomics*; [artículo en Internet] 2005 [Citado 12 abril 2005]. (5). Disponible en: <http://www.proteomics-journal>.
2. Ashby M. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. *J Dent Res*. 2008; (10): 900-14.
3. Nishioska T, Maki K, Kimura M, Takahama U. Determination of salivary peroxidase activity in human mixed whole saliva. *Arch Oral Biol*. 2003; (48): 397-00.
4. Torres WH. Biología de las especies oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*. 2002; (26):19-54.
5. Tenovuo J. Antimicrobial Agents in saliva-protection for the whole body. *J Dent Res*. 2002; (12): 807-09.
6. Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia efficacy and safety. *Oral Dis*. 2002; 8(1):23-9.
7. Tenovuo J, Pruitt K.M. Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *J Oral Pathol*. 1984; (6): 573-84.

8. De Ugarte, M. Polisacáridos extracelulares de placa dental. *Rev Venez Invest Odont.* 2002; (3): 32-41.
9. Takehara T, Itoh M, Hanada N, Saeki E. pH change in artificial dental plaque formed by glucosyltransferase and some oral bacteria during batch and continuous culture. *J Dent Res.* 1985; 64(3):447-49.
10. Pruitt K, Manson-Rahemtulla B, Tenovuo J. Detection of the hypothiocyanite (OSCN-) ion in human parotid saliva and the effect of pH on OSCN- generation in the salivary peroxidase antimicrobial system. *Arch Oral Biol.* 1982; (6): 517-25.
11. Fonacit.gov.ve [homepage on the internet] Caracas: Ministerio de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación. Actualización 2002 [citado 8 agosto 2010]. Disponible en: <http://www.fonacit.gov.ve/bioetica.sp>.
12. Mora O, Pérez M, Villalobos, A. Método de recolección de saliva de parótida. *Odous Científica* [fe de erratas en *Odous Científica* 2008; 9(1):65]. 2007; 8(2):6-10.
13. Makinen K, Tenovuo J. Observations on the use of guaiacol and 2,2-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as peroxidase substrates. *Anal Biochem.* 1982; 126:100-108.
14. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 7 (72): 248-254.
15. Dawes Colin. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139:18S-24S.
16. Humphrey S, Williamson R. A review of saliva: Normal Composition, flow and function. *J Prosthet Dent.* 2001; 85:162-69.
17. Hiraba H, Yamaoka M, Fukano M, Fujiwara T, Ueda K. Increased secretion of salivary glands produced by facial vibrotactile stimulation. *Somatosens Mot Res.* 2008; 25(4):222-29.
18. Gandara B, Izutsu K, Truelove E, Mandel I, Sommers E, Ensignio W. Sialochemistry of whole, parotid, and labial minor gland saliva in patients with oral Lichen Planus. *J Dent Res.* 1987; 66: 16-19.
19. Kalk, W W, A Vissink, FKL Spijkervet, H Bootsma, C G M Kallenberg, A V Nieuw Amerongen. Sialometry and sialochemistry: diagnostic tools for Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2001; 60(12):1110-116.
20. Heft M, Baum B.. Unstimulated and stimulated parotid salivary flow rate in individuals of different ages. *J Dent Res.* 1984; 63(10):1182-185.
21. Ghezzi E, Lange L, Ship J.A. J. Determination of variation of stimulated salivary flow rates. *J Dent Res.* 2000; 79 (11): 1874-78.
22. Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11(5):449-55.
23. Ferguson D, Fort, Elliot A, Potts A. Circadian rhythm in human parotid saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol.* 1973; 18:1155-173.
24. Cuenca E, Cuenca S, Baca. *Saliva y Placa Bacteriana.* Odontología Preventiva y Comunitaria. Mexico: Masson; 2007.
25. Lozano J, Galindo J, Garcia J, Martinez-Liarte J, Peñafiel R, Solano F. *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencia de la Salud.* España: McGraw Hill; 2000.
26. Edgar W, O'Mullane D. *Saliva and Oral Health.* 2da ed. London: British Dental Association; 1996.
27. Pedersen A, Bardow A, Nuntofte B. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjogren's syndrome. *BMC Clin Pathol.* 2005; 1(5):1-4.
28. Turner R, James I, Sugiya H. Salivary glands and saliva. Understanding salivary -fluid and protein secretion. *Oral Diseases.* 2002; 8: 3-11.