



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**PROGRAMA DE SEGUNDA ESPECIALIDAD EN CIENCIAS DE LA
SALUD**

**“Avances en Técnicas Diagnósticas en la Enfermedad
Periodontal. Saliva: Marcador Biológico como herramienta de
diagnóstico”**

TRABAJO ACADÉMICO

Para optar el título de Especialista en Periodoncia e Implantes

AUTOR(ES)

Baglietto Alva, Gianfranco (0000-0001-6228-7623)

ASESOR(ES)

Munive Méndez, Arnaldo (0000-0002-4676-7798)

Lima, 18 de octubre del 2022

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres por todo el esfuerzo, sin ellos estos logros no serían posible.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos aquellos docentes quienes sirvieron como inspiración a lograr este objetivo.

RESUMEN

Introducción: El diagnóstico de las fases activas de la enfermedad periodontal y la identificación de factores de riesgo que agravan o modifican la enfermedad son desafíos tanto para los investigadores como para los profesionales clínicos.

Antecedentes: Aunque el valor diagnóstico de la saliva ha sido reconocido desde hace algún tiempo y se han identificado biomarcadores potenciales de la enfermedad periodontal en la saliva, la mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha no han proporcionado ayuda fiable al clínico.

Objetivos: El objetivo de la revisión es realizar una recopilación de información acerca del uso de la saliva como técnica diagnóstica, y ver los avances de esta técnica y ver su efectividad en su aplicación clínica.

Conclusiones: El uso de dispositivos de punto de atención optimizados para la vigilancia periodontal probablemente requerirá menos entrenamiento y menos recursos que las pruebas diagnósticas actuales, podría conducir a una mejor utilización de los médicos capacitados para un tratamiento más simple y menos intensivo y podría resultar en una asistencia sanitaria más rentable entrega. Las herramientas de diagnóstico portátiles y fáciles de usar permitirán a los pacientes ser examinados en busca de enfermedad periodontal en ambientes distintos a los de la consulta dental, como en el consultorio de un médico o en el hogar, permitiendo a los pacientes Posible tratamiento.

Palabras clave: Saliva, Biomarcadores, Técnica Diagnóstica

“Advances in Diagnostic Techniques in Periodontal Disease. Saliva: Biological Marker as a diagnostic tool”

ABSTRACT

Introduction: The diagnosis of the active phases of periodontal disease and the identification of risk factors that aggravate or modify the disease are challenges for researchers and clinicians alike.

Background: Although the diagnostic value of saliva has been recognized for some time and potential biomarkers of periodontal disease in saliva have been identified, most of the work done to date has not provided reliable help to the clinician.

Objectives: The objective of the review is to make a collection of information about the use of saliva as a diagnostic technique, to see the progress of this technique and to see its effectiveness in its clinical application.

Conclusions: The use of point-of-care devices optimized for periodontal surveillance will probably require less training and less resources than current diagnostic tests, could lead to better utilization of trained physicians for a simpler and less intensive treatment and could result in a more cost-effective healthcare delivery. Portable and easy-to-use diagnostic tools will allow patients to be screened for periodontal disease in settings other than the dental office, such as in a doctor's office or at home, allowing patients to be treated.

Keywords: Saliva, Biomarkers, Diagnostic Technique

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN

II. MATERIALES Y MÉTODOS

III. OBJETIVOS

IV. ANTECEDENTES

V. CONTENIDO

1. Saliva: Avances en marcadores biológicos como método diagnóstico
2. Marcadores que afectan al biofilm dental
 - i. Marcadores Específicos en la saliva
 - ii. Marcadores No Específicos en la saliva
3. Marcadores sistémicos relacionados con la infección periodontal
4. Marcadores de la inflamación periodontal en los tejidos blandos
5. Marcadores de la inflamación periodontal en el hueso alveolar
6. Proyecto de proteoma salival humano
7. Transcriptoma salival
8. Aplicaciones clínicas: Diagnóstico rápido del punto de atención para la enfermedad periodontal
9. Recomendaciones

VI. CONCLUSIONES

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Introducción

La enfermedad periodontal es una enfermedad crónica de la cavidad oral que comprende un grupo de afecciones inflamatorias que afectan a las estructuras de soporte de los dientes. El impacto de los biofilms y la placa dental sobre la etiología de la enfermedad periodontal ha sido estudiado en detalle, sin embargo, es el impacto paradójico de la respuesta inflamatoria de los huéspedes susceptibles a la provocación microbiana que conduce a la destrucción de los tejidos periodontales.

La enfermedad progresa con la pérdida de fibras de colágeno y la unión a la superficie de la raíz, la migración apical del epitelio, la formación de bolsas periodontales y la reabsorción del hueso alveolar. Si no se diagnostica a tiempo, la enfermedad continúa con la destrucción progresiva del hueso alveolar, lo que lleva a una mayor movilidad de los dientes y la posterior pérdida de los dientes. Con respecto al desafío microbiológico antes mencionado, se estima que 600 bacterias diferentes son capaces de colonizar la boca humana, y cualquier individuo alberga normalmente de 150 a 200 de estas. Los factores de virulencia, y características propias de cada bacteria las permiten colonizar en diferentes superficies del diente y en el surco gingival, causando un daño tisular que posteriormente activan la respuesta inflamatoria del huésped.

El diagnóstico de las fases activas de la enfermedad periodontal y la identificación de factores de riesgo que agravan o modifican la enfermedad son desafíos tanto

para los investigadores como para los profesionales clínicos. Los parámetros de diagnóstico actuales se introdujeron hace más de medio siglo y aún siguen funcionando como el modelo básico en la práctica clínica actual. Incluyen varios parámetros tales como profundidades al sondaje, sangrado, niveles de inserción clínica, índice de placa y análisis radiográficos que cuantifican los niveles óseos alveolares. Los investigadores se encuentran en una constante búsqueda de técnicas diagnósticas innovadoras que tengan como objetivo la detección temprana de la enfermedad y anticipar la susceptibilidad al desafío microbiano en el huésped. Los enfoques innovadores óptimos determinarían correctamente la presencia de la actividad de la enfermedad actual, predecirían los sitios vulnerables y evaluarían la respuesta a las intervenciones periodontales.

Aunque el valor diagnóstico de la saliva ha sido reconocido desde hace algún tiempo y se han identificado biomarcadores potenciales de la enfermedad periodontal en la saliva, la mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha no han proporcionado ayuda fiable al clínico. Sin embargo, la disponibilidad de técnicas analíticas más sofisticadas da lugar al optimismo de que la saliva se convertirá eventualmente en la herramienta necesaria para una planificación de tratamiento más precisa.

El objetivo de la revisión es realizar una recopilación de información acerca del uso de la saliva como técnica diagnóstica, y ver los avances de esta técnica y ver su efectividad en su aplicación clínica.

Saliva: Avances en marcadores biológicos como método diagnóstico

Una herramienta de diagnóstico periodontal, en general, proporciona información pertinente para el diagnóstico diferencial, la localización de la enfermedad y la gravedad de la infección. Sirve como base para la planificación del tratamiento y proporciona un medio para evaluar la efectividad de la terapia periodontal. Los investigadores involucrados en el diagnóstico de la enfermedad periodontal están actualmente investigando el uso de fluidos orales, como la saliva, para la evaluación de la enfermedad periodontal. Las secreciones de las principales glándulas salivales (parótida, sub-mandibular y sublingual), que tienen un gran número de proteínas y péptidos, son responsables de mantener la integridad de la cavidad oral. Además, debido a su importancia en la formación de biofilm oral y la defensa del huésped, la saliva secretada puede tener un papel significativo en el establecimiento y progresión de la enfermedad periodontal.

La saliva puede ser utilizada para monitorear la salud general y el inicio de enfermedades específicas. Los biomarcadores, ya sean producidos por individuos sanos normales o por individuos afectados por enfermedades sistémicas específicas, son moléculas que pueden usarse para monitorear el estado de salud, el inicio de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y el resultado.

Marcadores que afectan al biofilm dental

Marcadores específicos

Las inmunoglobulinas (Ig) son factores de defensa específicos de la saliva. Las diferentes clases de inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) influyen en la microbiota oral al interferir con la adherencia de las bacterias y con la inhibición del metabolismo bacteriano, siendo la inmunoglobulina IgA la más predominante a este aspecto. Los pacientes con enfermedad periodontal muestran mayores concentraciones de IgA, IgG e IgM en comparación con los pacientes sanos.

Los niveles de estas inmunoglobulinas en la saliva se reducen considerablemente después del tratamiento periodontal. Como consecuencia, se ha establecido como una técnica no invasiva útil para identificar individuos que tienen el potencial de desarrollar enfermedad periodontal o aquellos que actualmente están respondiendo a una infección periodontopatógena.

Marcadores no específicos

Las mucinas son glicoproteínas producidas por glándulas salivales submandibulares y sublinguales y numerosas glándulas salivales menores. Las funciones fisiológicas de las mucinas (MG1 y MG2) son la citoprotección, la lubricación, la protección contra la deshidratación y el mantenimiento de la viscoelasticidad en las secreciones.

La mucina, MG2, afecta la agregación y adherencia de las bacterias y se sabe que interactúa con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, y la disminución de

la concentración de MG2 en la saliva puede aumentar la colonización con este periodonto patógeno.

La lisozima es una enzima antimicrobiana con la capacidad de dividir enlaces químicos en la pared celular bacteriana. Puede lisar algunas especies bacterianas mediante la hidrolización de enlaces glucosídicos en el peptidoglicano de la pared celular. Así mismo, puede causar la lisis de células bacterianas al interactuar con aniones monovalentes y con proteasas que se encuentran en la saliva. Esta combinación conduce a la desestabilización de la membrana celular, probablemente como resultado de la activación y desregulación de autolisinas bacterianas endógenas. Los pacientes con niveles bajos de lisozima en la saliva son más susceptibles a la acumulación de placa, que se considera un factor de riesgo para la enfermedad periodontal.

La lactoferrina es una glicoproteína con afinidad al hierro, producida por las glándulas salivales. Esta inhibe el crecimiento microbiano al secuestrar hierro del medio ambiente, privando así a las bacterias de este elemento. Está fuertemente regulada en las secreciones mucosas durante la inflamación gingival y se detecta a una alta concentración en la saliva de pacientes con enfermedad periodontal en comparación con pacientes sanos.

La histatina es una proteína salivar con propiedades antimicrobianas y es secretada por las glándulas parótida y submandibular. Neutraliza los lipopolisacáridos endotóxicos localizados en la membrana de bacterias gramnegativas. La histatina es también un inhibidor de enzimas hospedantes y bacterianas implicadas en la destrucción del periodonto. Además de sus actividades antimicrobianas, la histatina está implicada en la inhibición de la liberación de histamina de los mastocitos, lo que afecta su papel en la inflamación oral.

La peroxidasa es una enzima salival producida por células acinares en las glándulas salivales. Esta enzima elimina el peróxido de hidrógeno tóxico producido por microorganismos orales y reduce la producción de ácido en el biofilm dental, disminuyendo así la acumulación de placa y el establecimiento de gingivitis y caries. Los pacientes con enfermedad periodontal han demostrado altos niveles de esta enzima en la saliva.

Marcadores sistémicos relacionados con la infección periodontal

La proteína C reactiva es un marcador sistémico liberado durante la fase aguda de una respuesta inflamatoria. Esta es producida por el hígado y es estimulada por citoquinas circulantes, como el factor de necrosis tumoral - a y la interleucina - 1, de inflamación local y/o sistémica como la inflamación periodontal. La proteína C-reativa puede llegar a la saliva a través de las glándulas salivales y el líquido

crevicular gingival. Los altos niveles de proteína C reactiva se han asociado con enfermedades periodontales crónicas y agresivas y con otros biomarcadores inflamatorios. Los estudios han demostrado que los pacientes periodontales presentan concentraciones elevadas de proteína C-reativa en comparación con individuos sanos. Recientemente se ha demostrado que la proteína C reactiva es mensurable en la saliva de pacientes periodontales utilizando un método de laboratorio sobre un chip.

Marcadores de la inflamación periodontal en los tejidos blandos

Durante el inicio de una respuesta inflamatoria en el tejido conectivo periodontal, se liberan numerosas citocinas, tales como prostaglandina E2, interleucina-1beta, interleucina-6 y factor de necrosis tumoral alfa de células del epitelio de unión y de fibroblastos de tejido conectivo, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Posteriormente, las enzimas como la metaloproteinasa de matriz (MMP) -8, MMP-9 y MMP-13 son producidas por leucocitos polimorfonucleares y osteoclastos, lo que lleva a la degradación del colágeno del tejido conectivo y del hueso alveolar. Durante el proceso inflamatorio, los productos intercelulares se sintetizan, liberan y difunden hacia el surco gingival o la bolsa periodontal.

Las prostglandinas son metabolitos del ácido araquidónico compuestos de 10 clases, de las cuales D, E, F, G, H e I son de importancia principal. De este grupo, la prostaglandina E2 es uno de los mediadores más ampliamente estudiados de la actividad de la enfermedad periodontal. Durante la respuesta de defensa del

huésped al lipopolisacárido bacteriano, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y otras células liberan interleucina-1, factor de necrosis tumoral y prostaglandina E2. La prostaglandina E2 actúa como potente vasodilatador y aumenta la permeabilidad capilar, lo que provoca signos clínicos de enrojecimiento y edema. La prostaglandina E2 también estimula fibroblastos y osteoclastos para aumentar la producción de MMP.

Marcadores de la inflamación periodontal en el hueso alveolar

Se han evaluado muchos biomarcadores asociados con la formación ósea, la reabsorción y la rotación, como la fosfatasa alcalina, la osteocalcina, la osteonectina y las telopéptidos de colágeno, en el líquido crevicular gingival y la saliva. Estos mediadores están asociados con el metabolismo óseo local (en el caso de la periodontitis) así como con condiciones sistémicas (tales como osteoporosis o cáncer de hueso metastásico).

Las matriz metaloproteinasas (MMP) son proteinasas responsables tanto de la degradación como de la remodelación del tejido. Durante la ruptura periodontal, los colágenos de los ligamentos gingival y periodontal se escinden mediante colagenasas intersticiales derivadas de células hospedadoras. MMP-8 es la MMP más frecuente en tejido periodontal enfermo y fluido gingival crevicular. Se observaron niveles elevados de MMP-8 en la progresión activa de la enfermedad en un estudio longitudinal de pacientes con gingivitis y con periodontitis progresiva y progresiva. Recientemente, se demostró que el nivel de MMP-8 era altamente

elevado en saliva de pacientes con enfermedad periodontal usando un dispositivo microfluídico de punto de atención rápido. El nivel de MMP-8 también puede estar elevado en el fluido sulcular periimplantario de las lesiones de periimplantitis. Estos resultados son prometedores para el uso de MMP-8 como biomarcador en la fase activa de la enfermedad de periimplantitis. Se requieren estudios longitudinales para evaluar la MMP-8, ya sea sola o en combinación con otros biomarcadores moleculares, para predecir el riesgo de aparición de la enfermedad periodontal en el futuro y para monitorear las intervenciones de tratamiento.

La gelatinasa (MMP-9), otro miembro de la familia de la colagenasa, es producida por los neutrófilos y degrada la sustancia fundamental del colágeno intercelular. En un estudio longitudinal, se pidió a los pacientes que se enjuagaran y expectoraran, proporcionando muestras de fluido gingival crevicular. Cuando se analizó, se obtuvo un aumento del doble en los niveles medios de MMP-9 con pérdida progresiva de inserción. Teniendo en cuenta estos resultados, el uso futuro de MMP-9 en el diagnóstico de líquidos orales puede servir de guía en el monitoreo del tratamiento periodontal.

La colagenasa-3, denominada MMP-13, es otra MMP colagenolítica con una especificidad de sustrato excepcionalmente amplia. MMP-13 también ha sido implicado en casos de periimplantitis. Se concluyó que los niveles elevados tanto de MMP-13 como de MMP-8 se correlacionaban con una pérdida ósea vertical irreversible alrededor de los implantes dentales. En el futuro, MMP-13 puede ser útil para diagnosticar y controlar el curso de la enfermedad periodontal, así como

para el seguimiento de la eficacia de la terapia. Dada la especificidad y sensibilidad para la resorción ósea, los enlaces cruzados de piridinolina, tales como el telopéptido carboxi terminal reticulado de piridinolina del colágeno tipo I representan una ayuda diagnóstica potencialmente valiosa para la enfermedad periodontal. Varias investigaciones han explorado la capacidad de los enlaces cruzados de la piridinolina para detectar la resorción ósea en la periodontitis y la periimplantitis, así como en respuesta a la terapia perióssea.

El telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I es un pronosticador del futuro hueso alveolar y de la pérdida de inserción. Además, los niveles de telopéptido carboxi terminal del colágeno tipo I se correlacionaron fuertemente con parámetros clínicos y patógenos putativos periodontales, y demostraron reducciones significativas después de la terapia periodontal. Se necesitan ensayos longitudinales humanos controlados para establecer el papel del telopéptido carboxi terminal salival del colágeno tipo I como predictor de la destrucción del tejido periodontal, la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en pacientes periodontales.

La osteopontina es un polipéptido de cadena sencilla, se encuentra en la matriz ósea, está altamente concentrada en sitios donde los osteoclastos están unidos a la superficie mineral subyacente. Los resultados de los estudios indicaron que las concentraciones de osteopontina en el fluido crevicular gingival aumentaron proporcionalmente con la progresión de la enfermedad; Y cuando se proporcionó tratamiento periodontal no quirúrgico, los niveles de osteopontina en el fluido

crevicular gingival se redujeron significativamente. Aunque se necesitan estudios prospectivos adicionales a largo plazo, en este punto la osteopontina parece prometer ser un posible biomarcador salival de la progresión de la enfermedad periodontal.

Proyecto de proteoma salival humano

El análisis del proteoma salival humano es importante para la comprensión de la salud bucal y la patogénesis de la enfermedad. Tres grupos de investigación fueron financiados por el Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial / Institutos Nacionales de Salud para descifrar el proteoma salival humano. Se han logrado avances significativos en la catalogación de las proteínas de la saliva humana y en la exploración de sus modificaciones postraduccionales. Mediante el uso de la electroforesis en gel bidimensional / espectrometría de masas y "shotgun" enfoques proteómicos, se identificaron 309 proteínas distintas en la saliva humana entera. Además, después de 3 años de identificación colectiva y catalogación del proteoma salivar por el Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial, apoyan proyectos de proteomas salivales, se ha completado el primer perfil completo del proteoma salivar secretor. Colectivamente, se han identificado 1.166 proteínas salivales: 914 del líquido parotídeo y 917 de los fluidos submandibulares y sublinguales combinados. La Universidad de California en Los Ángeles es el sitio de centralización de datos, albergando toda la base de datos del proteoma salival humano conocido como "Salivary Proteome Knowledge Base"

Transcriptoma salival

Se ha encontrado que las moléculas de ARN que se encuentran elevadas en los tejidos de cáncer oral también están elevadas en la saliva. El microarrays de oligonucleótidos de alta densidad (Affymetrix HG U133A) se utiliza para el perfil de mRNA salivar y reveló que hay 3.000 mRNAs humanos en el sobrenadante de saliva libre de células de sujetos sanos.

Los estudios muestran que el mRNA se puede extraer de la saliva humana y se utiliza para desarrollar pruebas estándar. Recientemente se ha logrado un avance en la capacidad de aprovechar el transcriptoma salival al nivel de exón (región de un gen que no es separada durante el proceso de corte y empalme), aumentando la resolución diagnóstica del transcriptoma salival en aproximadamente siete veces, de 185 a 851 unidades de diagnóstico. Esta capacidad mejorada aumentó la utilidad clínica de este diagnóstico ya que proporciona una mayor resolución para estratificar la población de pacientes, la respuesta terapéutica y las recurrencias de la enfermedad. El uso del proteoma salivar y el transcriptoma como herramientas de diagnóstico, ha sido implementado para detectar cáncer oral y síndrome de Sjögrens. Se prevé que esta herramienta proteómica de saliva puede utilizarse para identificar marcadores para la detección temprana, la progresión de la enfermedad y el seguimiento terapéutico de pacientes con enfermedad periodontal.

Aplicaciones clínicas: Diagnóstico rápido del punto de atención para la enfermedad periodontal

La evaluación periodontal y el diagnóstico avanzarán en gran medida en los próximos años mediante el uso de diagnósticos orales rápidos en el punto de atención. El proceso de descubrimiento de fármacos ha sido un excelente catalizador para enlazar la nueva terapéutica con biomarcadores de enfermedades diagnósticas emergentes. Esta conexión en biomedicina ha llevado al desarrollo de un prototipo de evaluación rápida, precisa y "en tiempo real" de múltiples enfermedades, incluyendo la enfermedad periodontal. Las nuevas tecnologías como el "laboratorio sobre un chip" y los dispositivos microfluídicos tienen el potencial para manejar fluidos orales complejos como la saliva y el fluido crevicular gingival, para determinar el perfil de riesgo de la enfermedad periodontal del paciente, la actividad de la enfermedad actual y la respuesta a intervenciones terapéuticas. Este enfoque debería acelerar la toma de decisiones clínicas y el seguimiento de la progresión de la enfermedad episódica en una enfermedad infecciosa crónica como la periodontitis.

El uso de dispositivos para la evaluación periodontal probablemente requerirá menos entrenamiento y menos recursos que las pruebas diagnósticas actuales, podría conducir a una mejor utilización de los médicos capacitados para un tratamiento más simple y menos intensivo. Las herramientas de diagnóstico portátiles y fáciles de usar permitirán a los pacientes ser examinados en ambientes distintos a los de la consulta dental, como en el consultorio de un médico o en el hogar.

Los dispositivos diagnósticos orales periodontales también permitirán el rastreo de poblaciones grandes (especialmente las comunidades desatendidas y las áreas con pocos recursos) en todo el mundo con más rapidez y eficacia que los actuales enfoques. El potencial para muestrear varias poblaciones ayudará a identificar a los grupos de riesgo de manera más eficaz y aumentar el acceso al tratamiento para los más necesitados, mejorando la salud pública.

CONCLUSIONES

Si bien el futuro del diagnóstico de la enfermedad periodontal utilizando el diagnóstico salival parece prometedor, los obstáculos a estos enfoques pueden aparecer en el contexto clínico. La validación de los nuevos diagnósticos periodontales tendrá que ser comparada con las "técnicas convencionales" existentes de la enfermedad, como los niveles óseos alveolares y los niveles de inserción clínica, en grandes poblaciones de pacientes. La aceptación por los profesionales también es necesaria y puede resultar difícil.

La comunidad dental no está familiarizada con la detección masiva de poblaciones de enfermedades orales y sistémicas. Si se puede administrar una terapia periodontal más eficiente, los médicos tendrán más probabilidades de utilizar nuevos enfoques diagnósticos. Se debe poner mayor énfasis en la educación de los clínicos en diagnóstico, riesgo de enfermedad y prevención de enfermedades a través del sector de salud pública antes de que el diagnóstico se integre en la práctica periodontal clínica rutinaria.

Aunque los desafíos siguen adelante, el uso de la saliva basada en el diagnóstico de líquido oral parece prometedor para su aplicación futura para diagnosticar las enfermedades periodontales y para pronosticar los resultados del tratamiento periodontal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AlRowis R, AlMoharib HS, AlMubarak A, Bhaskardoss J, Preethanath RS, Anil S. Oral fluid-based biomarkers in periodontal disease - part 2. Gingival crevicular fluid. *J Int Oral Heal* [Internet]. 2014;6(5):126–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395809>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229821/pdf/JIOH-6-126.pdf>
2. Lee Y, Wong DT. Saliva: An emerging bio uid for early detection of disease. *Am J Dent* 2009; 22:241-8.
3. Bansal DK, Khuller N, Bansal P, Bhatia A, Mehta A. Role of Salivary Flow Rate and Salivary pH as a Diagnostic Marker in Smokers with Chronic Periodontitis Parameters Groups GroupI - GroupII GroupI - GroupIII GroupI -GroupIV GroupII -GroupIII GroupII -GroupIV GroupIII -GroupIV Salivary pH Mean Difference S. 2016;7(1):19–22.
4. Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. *J*

- Dent Res [Internet]. 2016;22034516661142. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27470067>
5. Nomura Y, Shimada Y, Hanada N, Numabe Y, Kamoi K, Sato T, et al. Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. Arch Oral Biol [Internet]. 2012;57(4):413–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.09.011>
 6. Patil P, Patil B. Saliva: A diagnostic biomarker of periodontal diseases. J Indian Soc Periodontol. 2011;15(4):310.
 7. Pradeep AR, Kumar MS, Ramachandraprasad M V, Shikha C. Gingival crevicular fluid levels of neopterin in healthy subjects and in patients with different periodontal diseases. J Periodontol [Internet]. 2007;78(10):1962–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18062118>
 8. SILVANA P. BARROS, RAY WILLIAMS SO & THIAGO M, EASILY. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. J Periodontol. 2016;70(45):53–64.
 9. Todorovic T, Dozic I, Barrero MV, Ljuskovic B, Pejovic J, Marjanovic M, et al. Enzimas salivales y enfermedad periodontal. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11(2):81–5.
 10. WILLIAM V. GIANNOBILE, THOMAS BEIKLER, JANET S. KINNEY, CHRISTOPH A. RAMSEIER, THIAGO MORELLI & DAVID T. WONG. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: Current state and future directions. Periodontol 2000 [Internet]. 2009;50(1):52–64. Available from:

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=19388953>

11. Wattamwar PP, Kolte RA, Kolte AP. Salivaomics - An emerging diagnostic tool for periodontal diseases. *Clin Dent*. 2015;(January):22–9.
12. Xiang XM, Liu KZ, Man A, Ghiabi E, Cholakis A, Scott DA. Periodontitis-specific molecular signatures in gingival crevicular fluid. *J Periodontol Res*. 2010;45(3):345–52.
13. Zhang L, Henson BS, Camargo PM, Wong DT. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2009;51(1):25–37.
14. Wet LM De, Slot DE, Weijden GA Van der. Supportive periodontal treatment: Pocket depth changes and tooth loss. *Int J Dent Hyg [Internet]*. 2017; Available from: <http://doi.org/10.1111/idh.12290>
15. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJJ *Dent Res*, 2012
16. Diagnosis of periodontitis. Van der Velden U. *J Clin Periodontol*, 2000
17. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age Løe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. *J Clin Periodontol*, 1986
18. Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med* 1990; 19:119-25.
19. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
20. Sandholm L, Gronblad E. Salivary immunoglobulins in patients with juvenile periodontitis and their healthy siblings. *J Periodontol* 1984; 55:9-12.

