
Utilidad del método pirogalol salicilato en la identificación de lactoperoxidasa tiocianato salival

Usefulness of the pyrogallol salicylate method in identifying the salivary lactoperoxidase thiocyanate

Gerardo Brunet-Bernal ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9302-3054>

Sandra Fernández-Torres ¹ <https://orcid.org/0000-0003-4447-9140>

Ever Quintana-Verdecia ¹ <https://orcid.org/0000-0003-1305-1643>

Ubaldo Roberto Torres-Romo ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0852-4389>

Neyda Fernández-Franch ² <https://orcid.org/0000-0001-6114-5869>

Miriela Betancourt-Valladares ² <https://orcid.org/0000-0002-5301-4057>

¹ Universidad de Ciencias Médicas. Centro de Inmunología y Productos Biológicos. Camagüey, Cuba.

² Universidad de Ciencias Médicas. Facultad de Estomatología. Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas. Camagüey, Cuba.

* Autor para la correspondencia (email): gerardobb.cmw@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La enzima lactoperoxidasa tiocianato se produce por células epiteliales de las glándulas salivales y desempeña funciones defensivas contra microorganismos patógenos de la cavidad oral, por tanto, identificar su presencia por métodos cualitativos podría ser de utilidad para investigar una de las causas de infecciones orales recurrentes como la periodontitis, gingivitis y caries dental, donde se ha reportado una relación con los niveles bajos de esta enzima en diferentes estudios.

Objetivo: Demostrar la utilidad del método pirogalol salicilato en la identificación de la enzima lactoperoxidasa tiocianato salival.

Métodos: Se desarrolló un estudio piloto, descriptivo, observacional y transversal, en el Centro de Inmunología y Productos Biológicos de la provincia Camagüey, en el período de junio a

octubre de 2020 mediante el empleo del método del pirogalol salicilato para identificar la presencia de la enzima lactoperoxidasa tiocianato en saliva humana. Se utilizaron 14 muestras de saliva que se analizaron después de la transformación enzimática del sustrato a 405 nm. Los datos obtenidos fueron procesados mediante estadística descriptiva.

Resultados: La enzima lactoperoxidasa tiocianato se encontró en todas las muestras salivales estudiadas. La absorbancia de las muestras se halló entre 0,406 y 0,939 unidades.

Conclusiones: El método del pirogalol salicilato resulta útil en la identificación de la enzima lactoperoxidasa tiocianato salival lo cual puede ser favorable en el estudio de infecciones bucales.

DeCS: PIROGALOL/uso terapéutico; LACTOPEROXIDASA; SALIVA; INFECCIONES; MANIFESTACIONES BUCALES.

ABSTRACT

Introduction: The enzyme lactoperoxidase thiocyanate is produced by epithelial cells of the salivary glands and performs defensive functions against pathogenic microorganisms of the oral cavity, therefore, identifying its presence by qualitative methods could be useful when investigating the causes of recurrent oral infections such as periodontitis, gingivitis and dental caries, in which a relationship with low levels of this enzyme has been reported in different studies.

Objective: To demonstrate the usefulness of the pyrogallol salicylate method in the identification of the salivary enzyme lactoperoxidase thiocyanate.

Methods: An observational and cross-sectional pilot study was carried out at the Center of Immunology and Biological Products of Camagüey, from June to October 2020, using the pyrogallol salicylate method to identify the lactoperoxidase thiocyanate enzyme in human saliva. Fourteen saliva samples were analyzed by observation and spectrophotometry at a wavelength of 405 nm. Descriptive statistical methods were applied to process data.

Results: The enzyme lactoperoxidase thiocyanate was found in all the salivary samples studied. The absorbance of the samples ranged between 0,406 and 0,939.

Conclusions: The pyrogallol salicylate method is useful in identifying the salivary lactoperoxidase enzyme, which may be favorable in the study of oral infections.

DeCS: PYROGALLOL/therapeutic use; LACTOPEROXIDASE; SALIVA; INFECTIONS; ORAL MANIFESTATIONS.

Recibido: 03/03/2021

Aprobado: 21/12/2021

<http://revistaamc.sld.cu/>



INTRODUCCIÓN

La periodontitis y gingivitis bacteriana son enfermedades estomatológicas que se han asociado a niveles bajos de lactoperoxidasa tiocianato (LPO) salival. ^(1,2) En la actualidad varias cremas comerciales (biotene, oralbalance) contienen LPO, proteína que cumple funciones defensivas en la saliva y cuya actividad se encuentra reducida con relativa frecuencia en infecciones bucales. ^(2,3)

La LPO es una de las proteínas presentes en la leche. ⁽⁴⁾ Es producida además en varios tejidos epiteliales lo cual determina su presencia en líquidos corporales como la orina, sangre y saliva, donde cumple funciones defensivas. Es una enzima que contiene un átomo de hierro por molécula, su pH óptimo es de 6.8. Tiene como grupo prostético un grupo Hem, cuyo átomo central de hierro forma complejos con diferentes compuestos, ejemplo los cianuros y la hidroxilamina, que inhiben su actividad enzimática. ^(5,6,7,8)

La enzima en cuestión cataliza la oxidación de ciertos compuestos donadores de hidrógeno por medio de peróxidos. Entre dichos compuestos se encuentran aminas aromáticas (o-fenilendiamina) y fenoles como el guayacol y el pirogalol. El substrato oxidable más usado es el guayacol, que se oxida formando un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de la enzima. El pirogalol al ser oxidado por la LPO genera como producto la pirogalina, pigmento de color amarillo. La capacidad que presenta LPO de oxidar fenoles como los mencionados con anterioridad, ha permitido el desarrollo de métodos para identificar y cuantificar la enzima como el método de Dupoy y del ácido 2,2'-Azino (3-etil-benzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS). ⁽⁹⁾

El método del pirogalol se ha empleado para determinar la actividad de la enzima lactoperoxidasa salival, sin embargo, carece de especificidad, puesto que el pirogalol es también metabolizado con menor selectividad por la mieloperoxidasa salival presente en los leucocitos de la saliva. ⁽¹⁰⁾ La incorporación de salicilato, un inhibidor de la mieloperoxidasa podría contribuir al incremento de la especificidad del método hacia la LPO.

El estudio se realizó con el propósito de demostrar la utilidad del método del pirogalol salicilato en la identificación de la enzima LPO salival, el cual resulta conveniente para el estudio y seguimiento de infecciones bucales recurrentes.

MÉTODOS

Se realizó un estudio piloto, descriptivo y transversal, con muestras biológicas de saliva humana en el período comprendido de junio a octubre de 2020, en el Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI) de la Universidad de Ciencias Médicas de la provincia Camagüey, con el objetivo de demos-

trar la utilidad del método del pirogalol salicilato en la identificación de la enzima LPO salival humana. El universo estuvo constituido por 14 muestras de saliva de trabajadores del CENIPBI, que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión. La elección intencional de este centro se debe a las medidas de bioseguridad que en él se establecen, tales como la prohibición de la ingestión de alimentos y el consumo de cigarrillos, factores que pueden influir en la actividad de la enzima.

Criterios de inclusión:

- Sujetos con edades comprendidas entre 25 y 65 años.
- Sujetos con salud bucal aparente.

Criterios de exclusión:

- Mujeres embarazadas.
- Sujetos fumadores activos.

Unidad de análisis: muestras de saliva.

Variables: número de muestra de saliva y actividad de la enzima LPO salival

Definición operacional: identificación de la muestra y la transformación enzimática del sustrato a 405 nm.

Procedimiento del estudio: la saliva entera no estimulada se coleccionó en tubos esterilizados, que de inmediato se estacionaron en hielo. La toma de muestra se efectuó en las viviendas de los individuos, entre las 6:00 a.m. y las 8:00 a.m. Se les orientó a los sujetos abstenerse de comer y beber durante dos horas previas a la recolección de la saliva. Las muestras de saliva se homogeneizaron y clarificaron mediante centrifugación a 10 000×g durante 15 min a 4°C. Las alícuotas de los sobrenadantes clarificados se conservaron a -30°C hasta su utilización.

Identificación de LPO en saliva humana: Se empleó el método de Dupoy,⁽⁹⁾ con modificaciones que incluyeron emplear pirogalol en lugar de guayacol, la incorporación del reactivo salicilato, se trabajó con microlitros (µL) en lugar de mililitros (mL) para el volumen final de ensayo. Como resultado de las modificaciones se obtuvo el método del pirogalol-salicilato.

Se emplearon 32 pocillos de una microplaca, en cada pozo se descargaron 20 µL de solución tampón fosfato (Na₂HPO₄) 0.05 M, a pH 6.8, el cual se mezcló con 10 µL de peróxido de hidrógeno al 30 % que contenía 0,5 mg de salicilato. Luego se adicionaron 10 µL de pirogalol al 0.04 M, se mezclaron los reactivos. Por último, se agregaron 10 µL de saliva de cada muestra por duplicado, excepto en los pocillos A1 y A2, que constituyeron el blanco, donde se adicionó pirogalol 10 µL y agua destilada 40 µL.

La placa se agitó de forma manual por 10 minutos hasta observar la aparición del color amarillo. Por último, se midió la absorbancia de las muestras por espectrofotometría a 405 nm en un Lector de microplacas 2100-C, *Optic Ivymen Systems*TM, (COMECTA®, España).

Al fondo de la imagen, se observan las soluciones de trabajo en frascos de color ámbar y otros instru-

mentos utilizados en el montaje, al frente se muestra la microplaca utilizada para el procedimiento (Figura 1).



Figura 1 Reactivos e instrumentos utilizados en el montaje de las muestras.

Técnica de recolección de datos: observación científica no estructurada sobre las muestras de saliva durante y luego de la transformación enzimática del sustrato y la medición posterior de la absorbancia a 405 nm.

Análisis estadístico: se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 21.00 (IBM, EUA). Los datos de la estadística descriptiva se resumieron a través de medidas de tendencia central y dispersión. Para comprobar la normalidad estadística de los datos se utilizaron las pruebas estadísticas Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Los hallazgos se presentan en tablas y gráficos.

En el desarrollo de la investigación se mantuvo como premisa, respetar los principios éticos basados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial actualizada en 2013, ⁽¹¹⁾ y los resultados de la misma se emplean solo con fines investigativos. Los sujetos implicados en el estudio dieron su consentimiento informado para participar de manera voluntaria en la investigación. Los investigadores velaron por la calidad de los resultados mediante el cumplimiento de los procedimientos normalizados para las determinaciones.

RESULTADOS

A la izquierda de la figura se mostró la microplaca con el color amarillo en los pozos, lo que indicó la transformación del sustrato y la presencia de la enzima LPO salival. A la derecha se observaron, en la pantalla del equipo, los valores de absorbancia a 405 nm de las muestras de saliva luego del procedimiento analítico (Figura 2).

Las 14 muestras analizadas mediante espectrofotometría mostraron la presencia de la enzima LPO, se destacó la muestra seis con una absorbancia de 0,939 a 405 nm, superior al resto, mientras que 0,406 fue el menor valor espectrofotométrico registrado (Tabla 1).

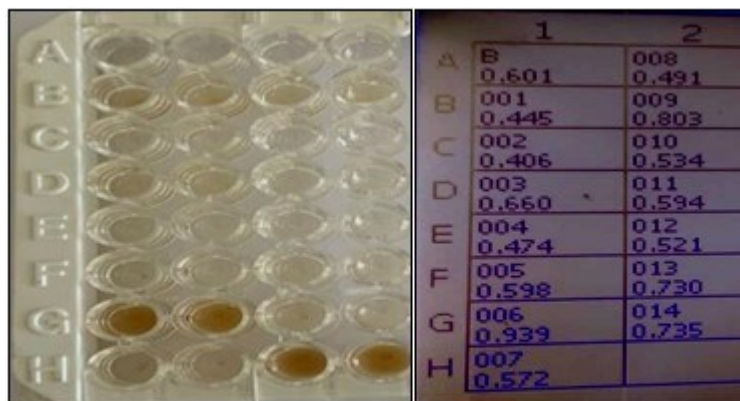


Figura 2 Resultados de la transformación enzimática del sustrato a 405 nm.

Tabla 1 Unidades de absorbancia de las muestras a 405 nm, el promedio y la desviación estándar

Muestra	Unidades de Absorbancia 405 nm
1	0,445
2	0,406
3	0,660
4	0,474
5	0,598
6	0,939
7	0,572
8	0,491
9	0,803
10	0,534
11	0,594
12	0,521
13	0,730
14	0,735
Promedio	0,61
Desviación estándar	0,15

Los datos obtenidos de la transformación enzimática del sustrato a 405 nm presentaron una distribución normal, con una probabilidad estadística mayor que el nivel de significación α 0.05 (Tabla 2).

DISCUSIÓN

La saliva presenta diferentes funciones, tales como defensa frente a las agresiones mecánicas o químicas, así como actividad antimicrobiana local, por medio de las inmunoglobulinas, las lisozimas y la LPO. ^(12,13,14) Este fluido bucal posee una molécula con actividad antimicrobiana derivada del cianuro, el ion tiocianato, el cual es ingerido en diversas fuentes de alimentos, así como también por inhalación del humo del cigarro. El tiocianato en la saliva es oxidado por la LPO a ion hipotiocianato, molécula que tiene acción antibacteriana conocida. ^(15,16,17)

Debido a la importancia antimicrobiana de la LPO salival, los autores del estudio desarrollaron el método pirogalol salicilato con la finalidad de identificar la presencia de la enzima en la saliva, para lo cual se tomaron como punto de partida métodos cualitativos y cuantitativos existentes para determinar esta hemoproteína en leche bovina. ^(7,9) En el método desarrollado en la investigación se trabajó con un volumen final de reacción de 50 µL a diferencia del método de guayacol original que emplea un volumen de un mL lo que contribuye al ahorro de reactivos para realizar las determinaciones.

El hecho que las 14 muestras analizadas evidenciaron la presencia de la enzima LPO se explica por las características de esta, capaz de oxidar compuestos fenólicos y convertirlos en productos coloreados (color amarillo). El empleo del salicilato en la mezcla de reacción garantiza la inhibición de la enzima mieloperoxidasa, proteína capaz de competir con la LPO por los sustratos (pirogalol y peróxido de hidrógeno). ⁽¹⁸⁾

Los resultados coinciden con los reportados por Bachtiar et al., ⁽¹⁹⁾ quienes al realizar un estudio cuasi-experimental en 30 sujetos demostraron la presencia de la enzima en la totalidad de las muestras de saliva y sugieren que el consumo de leche pasteurizada puede aumentar las concentraciones de LPO salival. Esos autores emplearon un ensayo inmuno-enzimático sobre fase sólida *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), no obstante, a pesar de ser diferente al aplicado en el estudio (método colorimétrico), los resultados permiten afirmar que ambos pueden ser utilizados para identificar la presencia de la LPO en muestras de saliva.

Asimismo, el estudio de Wijaya KM et al., ⁽²⁰⁾ con un diseño experimental de laboratorio, que incluyó preprueba-posprueba, indica que la enzima LPO se encuentra en concentraciones variables y activa en saliva humana; lo que concuerda con los del actual estudio en el que la enzima fue identificada en todas las muestras analizadas.

Es importante señalar que Wijaya KM et al., ⁽²⁰⁾ quienes trabajaron con una muestra de 120 sujetos dividida en tres grupos de 40 individuos, obtuvieron que sus datos siguen una distribución normal, corroborado por la prueba estadística Shapiro-Wilk, lo que coincide con la distribución estadística de los datos obtenida en el estudio y confirmada por la de Kolmogorov-Smirnov.

La enzima LPO juega un rol importante en la prevención de la caries dental, conclusión a la que lleva el estudio de Munther S. ⁽²¹⁾ Según este autor en los sujetos sin caries dental los niveles de LPO son

altos, mientras que en individuos con índice de caries moderado y severo los niveles de la enzima son más bajos. Independiente de la concentración variable de LPO presente en las muestras, la enzima también fue detectada en la totalidad de las mismas y los datos siguieron una distribución normal. Los autores del estudio comparten el criterio que, la distribución normal de los datos obtenidos en el análisis de las muestras estudiadas se debe a que una gran cantidad de variables, en especial las biológicas, se rigen por el modelo de Gauss. ⁽²²⁾

CONCLUSIONES

El método pirogalol salicilato resulta de utilidad en la identificación de la enzima LPO salival, lo cual puede ser favorable en el estudio de infecciones bucales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Magacz M, Kedziora K, Sapa J, Krzysciak W. The significance of Lactoperoxidasa tiocianato system in oral health: Application and efficacy in oral hygiene products. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Mar [citado 23 Ene 2020];20(6):[aprox. 4 p.]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/331945636_The_Significance_of_Lactoperoxidase_System_in_Oral_Health_Application_and_Efficacy_in_Oral_Hygiene_Products
2. Perez Fuentes M, Bravo Seijas B. Xerostomia en la población geriátrica del municipio Marianao, 2017. Gac Med Espirit [Internet]. 2018 [citado 24 Ene 2020]; 20(3): [aprox. 9 p.]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/gme/v20n3/1608-8921-gme-20-03-24.pdf>
3. EL-Fakharany EM, Abd Elhamid AI, El Deeb NM. Preparation and characterization of novel nanocombination of bovine lactoperoxidase with Dye Decolorizing and anti-bacterial activity. Scientific Reports [Internet]. 2019 [citado 23 Ene 2020];9:34-37. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-44961-2>
4. Gomez LM, Rodríguez Lecompte JC, Olivera Angel M. Respuesta inmune innata de la glándula mamaria. En: Olivera Angel M, editor. La Lactancia vista desde múltiples enfoques. Primera Parte: Biología e Inmunología [Internet]. Colombia: Fondo Editorial Biogénesis; 2020 [citado 05 Oct 2020]; [aprox.14 p.]. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/342152/20802571>
5. Herrera Ponce AL, Alarcón Rojo AD, Salmerón I, Rodríguez Figueroa JC. Efectos fisiológicos de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas del lactosuero en la salud: Una revisión. Rev Chil Nutr <http://revistaamc.sld.cu/>

- [Internet]. 2019 [citado 23 Ene 2020];46(2):[aprox. 3 p.]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v46n2/0717-7518-rchnut-46-02-0205.pdf>
6. Bustos Saggio DH, Monteavaro C. Historia natural de la mastitis bovina [Tesis]. Tandil: Facultad de Ciencias Veterinarias; 2018. Disponible en: <https://www.riidaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/1844/BUSTOS%20SAGGIO%2C%20DANIELA%20HAYDEE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
7. Bracho Espinosa H, Bellamaris C. Evaluacion del comportamiento de la mastitis por efecto del sistema Lactoperoxidasa tiocianato (sipo) activo, caso cabras [Internet]. Venezuela: Engormix; 2017. Disponible en: <https://www.engormix.com/ovinos/articulos/evaluacion-comportamiento-mastitis-efecto-t39824.htm>
8. Gornowicz A, Tokajuk G, Bielawska A, Maciorkowska E, Jabtonski R, Wojcicka A, et al. The assessment of sIgA, histatin 5, and lactoperoxidase levels in saliva of adolescents with dental caries. Med Sci Monit [Internet]. 2014 Jun [citado 23 Ene 2020];20(20):[aprox. 3 p.]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/263515114_The_assessment_of_sIgA_histatin-5_and_lactoperoxidase_levels_in_saliva_of_adolescents_with_dental_caries
9. Cristales George SE. Recopilación de métodos de análisis oficiales y no oficiales más empleados para determinar fosfatasa alcalina y Lactoperoxidasa tiocianato en leches y quesos [tesis]. San Salvador: Universidad de El Salvador; 2009. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/2578/1/16101146.pdf>
10. Gothefors L, Marklund S. Lactoperoxidase activity in human milk and in saliva of newborn infants. Infection and immunity [Internet]. 1975 [citado 5 Feb 2021]; 11(6): [aprox. 5 p.]. Disponible en: <https://iai.asm.org/content/iai/11/6/1210.full.pdf>
11. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. Vol. 24. No. 2. 2008. [Internet]. 2008 [citado 23 Ago 2021];24(2). Disponible en: <https://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/5964/9753>
12. Barembaum S, Azcurra A. La saliva: una potencial herramienta en la Odontología. Rev de la Facultad de Odontología [Internet]. 2019 [citado 05 Oct 2020];29(2):[aprox. 3 p.]. Disponible en: <https://revistas.psi.unc.edu.ar/index.php/RevFacOdonto/article/view/25250/24496>
13. Agudelo Restrepo M, Fernández Jara JD. Tipos de medidores de PH salival en América Latina: revisión de la literatura [Internet]. Montevideo: Fundación Universitaria del Área Andina; 2019. [citado 05 Oct 2020]. Disponible en: <https://digitk.areandina.edu.co/handle/areandina/3484>
14. Rodríguez Mannuci BL. Variación de ph y flujo salival en gestantes menores de 18 años procedentes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen del Distrito de la Victoria, Lima-2018 [tesis]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2019. Disponible en: http://190.187.227.76/bitstream/handle/123456789/3458/T061_77422531_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y
<http://revistaamc.sld.cu/>

15. Cruz Quintana SM, Diaz Sjostrom P, Arias Socarras D, Mazon Baldeon GM. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2017 [citado 23 Ene 2020];54(1): [aprox. 3 p.]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubest/esc-2017/esc171h.pdf>
16. Rodríguez Mannuci BL. Variación de ph y flujo salival en gestantes menores de 18 años procedentes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen del Distrito de la Victoria, Lima-2018 [tesis]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2019. [citado 23 Ene 2020]. Disponible en: http://190.187.227.76/bitstream/handle/123456789/3458/T061_77422531_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y
17. Hernández Molinar Y, Aranda Romo S, Dávila Pérez CE, Goldaracena Azuara MP. Probióticos como bacterioterapia para fortalecer capacidad buffer y disminuir la viscosidad de saliva en pacientes pediátricos. ORAL [Internet]. 2019 Sep-Dic [citado 24 Ene 2020];20(64):14-17. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2019/ora1964b.pdf>
18. Kettle AJ. Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by antiinflammatory drugs. Biochem Pharmacol [Internet].1991 [citado 23 Ene 2020];41(10):[aprox. 7 p.]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/000629529190565M>
19. Bachtiar ZA, Primasari A, Sungkar S. The Effectiveness of Milk Lactoperoxidase in Increasing Salivary Lactoperoxidase Levels in Children with Early Childhood Caries. IOSR-JDMS [Internet]. 2019 Sep [citado 23 Ene 2020];18(9):[aprox. 4 p.]. Disponible en: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jdms/papers/Vol18-issue9/Series-14/I1809143539.pdf>
20. Wijaya KM, Soekanto SA, Soedarsono N. Effect of honey propolis hard candy on lactoperoxidase activity in unstimulated saliva. Int J App Pharm [Internet]. 2019 [citado 23 Ene 2020];11(1):[aprox. 2 p.]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/332326405_EFFECT_OF_HONEY_PROPOLIS_HARD_CANDY_ON_LACTOPEROXIDASE_ACTIVITY_IN_UNSTIMULATED_SALIVA/fulltext/5cadf1de299bf120975b2a99/EFFECT-OF-HONEY-PROPOLIS-HARD-CANDY-ON-LACTOPEROXIDASE-ACTIVITY-IN-UNSTIMULATED-SALIVA.pdf
21. Munther S. The impact of salivary lactoperoxidase and histatin-5 on early childhood caries severity in relation to nutritional status. Saudi Dental J [Internet]. 2020 [citado 23 Ene 2020];32:[aprox. 6 p.]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Shahbaa_Munther2/publication/339183720_The_impact_of_salivary_lactoperoxidase_and_histatin-5_on_early_childhood_caries_severity_in_relation_to_nutritional_status/links/5fed7c04299bf140885e2491/The-impact-of-salivary-lactoperoxidase-and-histatin-5-on-early-childhood-caries-severity-in-relation-to-nutritional-status.pdf
22. Colectivo de Autores. Informática médica: Bioestadística [Internet]. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2004. [citado 23 Ene 2020]. Disponible en: https://www.ecured.cu/Inform%C3%A1tica_M%C3%A9dica_Tomo_2

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Gerardo Brunet-Bernal (Conceptualización. Curación de datos. Análisis formal. Investigación. Metodología. Administración del proyecto. Recursos. Visualización. Redacción – borrador original. Redacción – revisión y edición).

Sandra Fernández-Torres (Curación de datos. Investigación. Validación).

Ever Quintana-Verdecia (Supervisión).

Ubaldo Roberto Torres-Romo (Validación. Redacción – revisión y edición).

Neyda Fernández-Franch (Conceptualización. Redacción – borrador original).

Miriela Betancourt-Valladares (Análisis formal. Metodología. Supervisión. Visualización).