

## LA SALIVA COMO UNA FUENTE DE BIOMARCADORES EN EL GANADO PORCINO: CONCEPTOS GENERALES Y AVANCES RECIENTES

Saliva as a source of biomarkers in pigs: general concepts and recent advances

**Muñoz-Prieto, A., Ortín-Bustillo, A., Escribano, D., López-Martínez, M.J., López-Arjona, M., Botía, M., Tvarijonaviciute, A., Contreras-Aguilar, M.D., Cerón, J.J., Tecles, F., Martínez-Subiela, S.**

Laboratorio Interdisciplinar de Análisis Clínicos de la Universidad de Murcia (INTERLAB-UMU), Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo 17, 30100, Murcia (España).

**\*Autor de correspondencia:** Alberto Muñoz-Prieto

Tipo de artículo: Revisiones

Enviado: 27/03/2023

Aceptado: 27/09/2023

### RESUMEN

El uso de la saliva en el cerdo ha ganado importancia en los últimos años debido a su facilidad de obtención, sin provocar estrés ni dolor en el animal. La saliva, además de permitir la identificación de agentes patógenos, es una fuente de biomarcadores que son utilizados para evaluar la salud y el bienestar general porcino. Los distintos biomarcadores que pueden ser detectados se relacionan con el estrés, la inflamación, el sistema inmune, el estado oxidativo o la sepsis. De esta manera, se pueden formar paneles incluyendo varios grupos de biomarcadores dentro del concepto conocido como sialoquímica. Entre los biomarcadores más novedosos se encuentran aquellos específicos de los procesos de sepsis, como la procalcitonina, aldolasa y proteínas del grupo S100, que se consideran de potencial aplicación para el uso racional de antibióticos. Además, recientemente se ha demostrado la utilidad de la saliva para reflejar las emociones positivas en estos animales, mediante la detección de oxitocina. Se espera que en el futuro se pueda adaptar el uso de estos marcadores a nivel rutinario en sistemas productivos de porcino.

**Palabras clave:** Saliva, cerdo, biomarcadores, bienestar, sialoquímica.

## ABSTRACT

The use of saliva in the pig has gained importance in the last years due to its ease of sampling, without causing stress or pain in the animal. In addition to identifying pathogens, it is a source of biomarkers used to evaluate general pig health and well-being. The different biomarkers that can be detected are related to stress, inflammation, the immune system, oxidative state, or sepsis. In this way, panels can be formed including several groups of these biomarkers inside the concept known as sialochemistry. Among the most novel biomarkers recently identified are those specific to sepsis processes, such as procalcitonin, aldolase or S100 proteins, which are considered to be a potential application for the rational use of antibiotics. In addition, the usefulness of saliva to reflect positive emotions in these animals has recently been demonstrated by detecting oxytocin. It is expected that in the future the use of these markers can be adapted at a routine level in pig production systems.

**Key words:** Saliva, pork, biomarkers, well-being, sialochemistry.

## 1. CONCEPTOS GENERALES

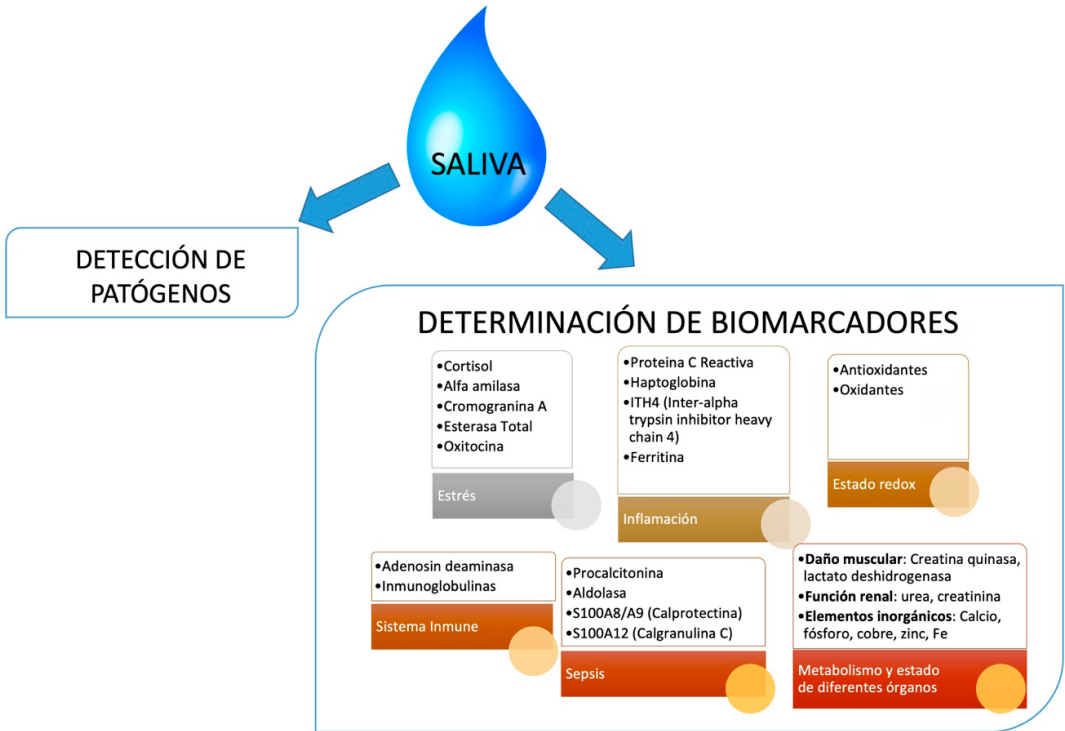
La saliva es un fluido biológico que está siendo cada vez más utilizado como muestra para la determinación de analitos, tanto en medicina humana como en veterinaria, debido a sus ventajas en comparación con el uso de sangre (Tvarijonaviciute et al., 2020). Entre estas ventajas está el hecho de que se puede obtener de una forma simple y fácil y que su muestreo es no invasivo. Además, no requiere personal especializado para su recogida. Por todo ello, la saliva resulta muy útil en monitorizaciones a lo largo del tiempo ya que permite realizar muestreos repetidos de forma fácil y sin provocar estrés (Cerón, 2019).

En el caso particular de la especie porcina, la saliva es una muestra muy interesante debido a que la toma de sangre suele ser estresante tanto para el animal como para la persona que la realiza, ya que resulta necesaria la inmovilización del animal mediante una trampa de nariz o lazo (Martínez-Miró et al., 2016; Merlot et al., 2011). Sin embargo, a excepción de cuando se usan animales muy jóvenes, el muestreo de saliva se suele llevar a cabo de forma fácil y rápida, tanto de forma individual como colectiva por medio de cuerdas.

Uno de los usos actuales más frecuentes de la saliva en el cerdo es la **detección de enfermedades infecciosas**, tanto del patógeno directamente por medio de pruebas analíticas

como la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), como de los anticuerpos que produce el animal por medio de técnicas inmunológicas. Se ha descrito que se pueden detectar más de 23 patógenos diferentes en saliva de cerdo (Henaó-Díaz et al., 2020), existiendo laboratorios comerciales y centros de investigación que ofrecen estos análisis de rutina. Además, como las muestras se pueden obtener de forma sencilla, estos análisis se pueden realizar de forma más frecuente, permitiendo un mejor control de la posible presencia de agentes patógenos en la explotación.

Por otro lado, en la saliva también se pueden medir biomarcadores que proporcionen información general sobre el **estado de salud y bienestar** de los animales, ya que es un fluido que puede mostrar cambios fisiopatológicos en su composición cuando hay situaciones de estrés o dolor (Escribano et al., 2019) o enfermedad (López-Martínez et al., 2022). En esta línea, recientemente se ha descrito en veterinaria el término de *sialoquímica*, que consiste en la medición de un perfil de analitos en saliva pudiendo incluir biomarcadores que se pueden usar para evaluar el estrés, la inflamación, la respuesta inmune, estado oxidativo y metabolismo y estado general del animal, como se muestra en la figura 1 (Cerón et al., 2022; Contreras-Aguilar et al., 2021). Además, se han realizado avances en dos nuevos aspectos, como son el uso de saliva para detectar sepsis



**Figura 1.** Potenciales aplicaciones de la saliva en la especie porcina.

y también para poder evaluar emociones positivas. En los siguientes apartados se revisará el término *sialoquímica* y se tratarán estos dos puntos más novedosos, así como las posibles aplicaciones futuras que la saliva puede ofrecer en la producción porcina.

## 2. CONCEPTO DE SIALOQUÍMICA Y PERFILES QUE SE PUEDEN HACER EN SALIVA

La saliva puede variar su composición analítica ante diferentes estados orgánicos (Greabu et al., 2009) como enfermedad, estrés e incluso emociones positivas. Este es el motivo por el que, actualmente, la saliva se considera un fluido diagnóstico en el que se pueden medir un conjunto de biomarcadores al igual que

en una bioquímica sanguínea, con la ventaja de que puede obtenerse de una manera no invasiva, no estresante y sencilla (Cerón, 2019; Tvarijonavičute et al., 2020; Yoshizawa et al., 2013). Así pues, surgió en medicina humana el concepto de “sialochemistry” (sialoquímica en su traducción al español) (Giri et al., 2018; Miller et al., 2012), que recientemente se ha aplicado a diferentes especies domésticas, entre ellas la porcina (Cerón et al., 2022; Contreras-Aguilar et al., 2021). Dentro de la sialoquímica se pueden medir diferentes perfiles analíticos relacionados con el estrés, la inflamación, la actividad del sistema inmune, el estado de óxido-reducción (Rédox) y metabolismo y estado de diferentes órganos, en la especie porcina, y que trataremos a continuación.

— Con respecto a la evaluación del *estrés* en la especie porcina se han descrito incrementos ante situaciones de estrés en el cortisol (Contreras-Aguilar et al., 2019; López-Arjona et al., 2020) como biomarcador del eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal (HPA) y la cromogranina A (CgA) (Escribano et al., 2013), o la alfa amilasa (sAA) (Contreras-Aguilar et al., 2019; Fuentes et al., 2011a) como biomarcador es del Sistema Nervioso Simpático (SNS). Estos biomarcadores son de gran interés a la hora de monitorizar la presencia de estrés psicológico en algunas situaciones que rodean al manejo de la especie porcina, como el transporte, la manipulación o la estabulación; o en algunas situaciones de enfermedad relacionadas con el dolor o malestar. Además de los anteriores analitos mencionados, recientemente se ha comprobado la asociación entre la actividad esterasa total (TEA) y sus componentes (butirilcolinesterasa [BChE], lipasa, o anhidrasa carbónica [CA-VI]) con diferentes situaciones de estrés en el ganado porcino, tanto psicológico como de dolor por enfermedad (cojeras o prolapso), ya que hay indicios de que sus concentraciones en saliva están relacionadas con el SNS (Cerón et al., 2022).

— La saliva también puede emplearse para detectar la presencia de un *estado inflamatorio* por medio de la determinación de las proteínas de fase aguda (PFAs), que son marcadores relacionados con la inflamación. Dentro de este grupo de biomarcadores se puede incluir a la haptoglobina (Hp) y la proteína C-reactiva (CRP). Si bien ambas proteínas se encuentran en saliva en concentraciones hasta 1000 veces inferiores a las que se encuentran en suero (Cerón, 2019), pueden medirse si se emplean técnicas lo suficientemente sensibles como la fluorimetría en tiempo resuelto o la tecnología Alpha-LISA (Contreras-Aguilar et al., 2019; Mateo et al., 2019).

Al igual que sucede en suero, ante un estímulo inflamatorio las concentraciones de Hp en saliva pueden aumentar hasta 10 veces y

las de CRP en hasta 100 veces. De este modo, la CRP está considerada como una PFA mayor mientras que la Hp se comporta más como una PFA moderada, siendo esta última más útil para detectar inflamaciones de curso crónico (Escribano et al., 2014). Tanto CRP como Hp son marcadores altamente sensibles de inflamación, siendo capaces de detectar incluso la presencia de procesos subclínicos. Sin embargo, a pesar de su elevada sensibilidad resultan poco específicas para identificar la causa de la inflamación, por lo que harían falta pruebas más específicas con el fin de llegar a un diagnóstico definitivo del proceso inflamatorio concreto que afecta al animal.

Existen otras proteínas de fase aguda que, aunque se han estudiado menos en saliva, también se podrían evaluar y recientemente se han descrito métodos para su medida. Entre estas se incluye la ferritina que se puede medir en saliva por métodos automatizados (Ortín-Bustillo et al., 2022). También el inhibidor inter-Alfa-tripsina de cadena pesada (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 [ITIH4] o proteína de fase aguda mayor del cerdo [Pig-Map]) se puede cuantificar en saliva y muestra incrementos en situaciones de inflamación como por ejemplo en meningitis causadas por *Streptococcus suis* (López-Martínez, et al., 2023) y en diarreas causadas por *E. scherichia coli* (Ortín-Bustillo et al., 2023).

— En cuanto a los marcadores del **sistema inmune**, se puede medir la enzima adenosina deaminasa (ADA) y sus isoenzimas ADA1 y ADA2, que se encuentran en valores más altos en el cerdo en comparación con otras especies animales y que pueden proporcionar información sobre inmunidad celular e inflamación, (Tecles et al., 2018). Una particularidad que tiene el ADA es que la saliva es más sensible que el suero para detectar cambios en esta enzima, constituyendo un ejemplo de situación donde la saliva sería preferible al suero para la medición de un analito (Contreras-Aguilar et al., 2020). También en saliva se puede medir IgG, IgM e

IgA. Las dos primeras proceden sobre todo de sangre, mientras que la IgA se produce por las células plasmáticas de las glándulas salivares y está influenciada por situaciones de estrés (Ceron et al., 2022).

— Además, la saliva puede utilizarse para medir marcadores del *estado redox* y, de esta forma, identificar situaciones que puedan dar lugar a un estrés oxidativo en los animales. Por ejemplo, la capacidad antioxidante total (TAC) de la saliva es un reflejo a nivel sistémico de la capacidad antioxidante del organismo y puede medirse utilizando diversos métodos como la capacidad antioxidante trolox-equivalente (TEAC), o mediante la capacidad de reducir el cobre de su forma cúprica a cuprosa (CUPRAC) o el hierro de su forma férrica a ferrosa (FRAS). Además, también es posible determinar sustancias antioxidantes no enzimáticas como el ácido úrico, o enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa. Por otro lado, la saliva también resulta de utilidad para medir sustancias derivadas de un estado prooxidante como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o los productos proteicos de oxidación avanzada (AOPP), siendo estos últimos un marcador que permite estimar el efecto del estrés oxidativo sobre las proteínas. Todos estos biomarcadores han sido validados y utilizados de forma satisfactoria en saliva porcina utilizando métodos automatizados (Rubio et al., 2019). Se ha demostrado que estos marcadores sufren un cambio en sus niveles salivares en situaciones fisiológicas, como por ejemplo en las cerdas durante la lactación, siendo indicadores del estrés metabólico que sufren los animales en dicha etapa (Rubio et al., 2019); pero también en situaciones patológicas, como en animales con prolapso rectal o en aquellos que sufren dolor o malestar (Contreras-Aguilar et al., 2019).

— Finalmente, el concepto sialoquímica incluye también la determinación de analitos que habitualmente se miden en suero o plasma pero que pueden también medirse en saliva, y que son *marcadores del metabolismo y estado de*

*diferentes órganos*. Como por ejemplo enzimas hepáticas como las transaminasas, marcadores de función renal como urea y creatinina o del metabolismo muscular como creatina quinasa (CK) o lactato deshidrogenasa (LDH) y elementos inorgánicos como el Ca, P, Cu, Zinc o Fe entre otros (Ortín-Bustillo et al., 2022, 2023). Concretamente, en la especie porcina incrementos en CK, LDH, aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FAL) y  $\gamma$ -glutamil transferasa (gGT) se han observado al momento del parto (Contreras-Aguilar et al., 2021). Además, incrementos en la LDH se han asociado a situaciones de reducido bienestar animal (Escribano et al., 2019). También se ha estudiado la influencia del ritmo circadiano (Escribano et al., 2014; Gutiérrez et al., 2013) y la suciedad de la muestra en estos analitos (Franco-Martínez et al., 2022).

### 3. BIOMARCADORES PARA OPTIMIZAR EL USO DE ANTIBIÓTICOS

El correcto manejo de la antibioterapia conlleva un ejercicio de responsabilidad técnico y ético. La utilización indiscriminada de antibióticos, tanto en medicina humana como veterinaria, tiene efectos negativos sobre la salud general creando resistencias bacterianas y malgastando recursos en actos clínicos inadecuados (Robinson et al., 2016).

De forma habitual, la utilización de antibióticos en un paciente viene determinada por un diagnóstico previo de un proceso de infección bacteriana. Cuando ésta se acompaña de inflamación sistémica generalizada y desequilibrio entre elementos anti y pro-inflamatorios recibe el nombre de sepsis (Smyth et al., 2016), y se constituye como un proceso inflamatorio sistémico grave. La sepsis se desencadena por un agente infeccioso, que puede ser una bacteria, virus, parásito u hongo. Aunque en la mayoría de los casos (alrededor del 70%) se atribuye a bacterias, es posible que la prevalencia de otros agentes infecciosos, en los cuales no

estaría indicada la administración de antibioterapia, esté infraestimada (Motzkus & Luckmann, 2017). Además, la sintomatología es muy similar a la que ocurre en el síndrome de inflamación sistémica (SIRS), el cual tiene su origen en causas asépticas como traumatismos. Dado que la sepsis está considerada como una de las principales causas de muerte en personas y animales, requiere de un diagnóstico diferencial preciso y rápido para una correcta aplicación de antibioterapia en los casos necesarios en los que está causada por bacterias (López-Martínez, et al., 2022).

En este sentido, la utilización de biomarcadores salivares que puedan ser discriminatorios entre procesos sépticos y no sépticos en la especie porcina sería muy útil para aplicar un uso racional de antibióticos. Entre los marcadores salivares que han demostrado recientemente eficacia en la discriminación de la sepsis se encontrarían la procalcitonina, la aldolasa y las proteínas de la familia S-100.

La **procalcitonina (PCA)** es un precursor de la hormona calcitonina, encargada del mantenimiento de la homeostasis del calcio, producida por las células C tiroideas y las células endocrinas pulmonares (Becker et al., 2010). De forma natural, la PCA se convierte en calcitonina tras ser liberada al plasma, de manera que sus niveles basales en organismos sanos son bajos. Sin embargo, durante el proceso de sepsis la PCA es liberada masivamente al torrente sanguíneo, aumentando su concentración durante este proceso. Por lo tanto, es un marcador útil para detectar la presencia del proceso séptico y poder diferenciarlo de otras causas inflamatorias no sépticas. Dado que la PCA está presente en la saliva porcina y que también se incrementa específicamente durante la sepsis en esta especie (López-Martínez et al., 2022), su cuantificación permite la correcta identificación de animales con este proceso, guiando así a un mejor uso de antibióticos.

La **aldolasa** es una enzima glucolítica relacionada con procesos celulares basales y la

producción de ATP (Shams et al., 2014). En la especie porcina, la elevación de esta enzima se asocia a la aparición de un proceso séptico, ya que se encuentra presente en la superficie de las membranas de diferentes patógenos, donde actúa como molécula de adhesión (Wu et al., 2008). Este incremento se observa en la saliva del cerdo cuando existe una respuesta orgánica a patógenos externos, indicando la posible aparición de sepsis (López-Martínez et al., 2022).

Las **proteínas de la familia S100** incluyen algunas como la S100A8-A9 (también llamada calprotectina) y la S100A12 (también llamada calgranulina C) que están localizadas en el citosol de neutrófilos y monocitos, y que se liberan en situaciones de daño tisular, inflamación y sepsis (Cerón et al., 2023). La calprotectina se ha visto que aumenta de forma más marcada en saliva de cerdos con sepsis en comparación con inflamación en un modelo experimental (López-Martínez et al., 2023); y tanto la calprotectina como la calgranulina C aumentan en saliva en casos de meningitis por *S. suis* y diarrea por *E. coli* (López-Martínez et al., 2023; Ortín-Bustillo et al., 2023). Estas dos proteínas, de forma similar a lo que ocurre en el caso del ADA, están en concentraciones superiores en saliva en comparación con el plasma de cerdo. Hay que resaltar en este punto que estas proteínas S100 también aumentan en situaciones de activación exagerada del sistema inmune (enfermedades inmunomediadas) y de estrés, por lo cual hay que tener en cuenta que no son específicas de sepsis.

De forma global, la utilización de biomarcadores salivares en la especie porcina para la detección de sepsis puede ser de gran utilidad para complementar la información aportada por los biomarcadores de inflamación tradicionales y permitir así el mejor manejo de la administración de antibióticos. Además, la monitorización de estos procesos puede ser llevado a cabo mediante estos biomarcadores para cesar la ad-

ministración del tratamiento cuando los niveles salivares se normalicen.

#### 4. BIOMARCADORES DE EMOCIONES POSITIVAS

Tradicionalmente, se han venido utilizando diversos biomarcadores para monitorizar situaciones que generan un detrimento del bienestar animal, como por ejemplo el estrés (término procedente del inglés y asociado al estrés debido a emociones negativas). Clásicos biomarcadores de situaciones estresantes son, entre otros, hormonas como el cortisol o enzimas como la alfa amilasa o LDH (Fuentes et al., 2011; Turner & Tilbrook, 2006) que cuando aparece una situación de estrés incrementan sus niveles y, por lo tanto, se asocia el evento como negativo para el bienestar animal. Sin embargo, la monitorización de emociones positivas permite investigar desde otro punto de vista o enfoque este bienestar, pudiendo asociar situaciones concretas a efectos positivos en los animales. En el caso del cerdo, la medición de oxitocina en saliva se puede utilizar con este objetivo.

La *oxitocina* es una hormona sintetizada en el hipotálamo que se considera básica para las relaciones sociales animales, siendo fundamental entre otros aspectos para el reconocimiento social o la respuesta al miedo (Jones et al., 2017). De forma fisiológica, además de su importante función durante el parto y la lactación, la presencia de esta hormona inhibe la secreción de glucocorticoides, reduciendo así los niveles de ansiedad y estrés (Rault et al., 2017). Los recientes avances en la especie porcina han conseguido cuantificar la oxitocina en saliva y han demostrado su aplicación para detectar situaciones en las que el bienestar animal está comprometido al reducirse los niveles de esta hormona (López-Arjona et al., 2020). De igual manera, en aquellas situaciones en las que el cerdo experimenta emociones positivas, los niveles de oxitocina incrementan en saliva

(López-Arjona et al., 2020). Por lo tanto, se considera un marcador salivar que podría ser de gran utilidad para detectar emociones positivas y situaciones de bienestar en el cerdo.

A pesar del gran interés de esta hormona por su papel en la psicología y el comportamiento, uno de los principales problemas de la determinación de oxitocina en saliva es la falta de ensayos que permitan la medición directa de oxitocina sin procesos de tratamiento de la muestra que conlleven tiempo o son complicados de realizar, como extracción, liofilización y concentración de la muestra. Además, hay un escaso conocimiento sobre la forma de oxitocina presente en la muestra y su posible unión a otras moléculas. En general, existen muchas divergencias sobre la técnica que debe emplearse para su medición, así como la posibilidad de que diferentes técnicas de medida capturen diferentes componentes de la forma biológica que la oxitocina puede presentar.

Los métodos tradicionalmente utilizados, como radioinmunoensayo o enzimoimmunoensayo tienen algunas desventajas, como el uso de material radioactivo en caso del primero o baja sensibilidad en el caso del segundo (Tabak, 1995). Recientemente, se han desarrollado métodos basados en la tecnología AlphaLISA, que permiten determinar estas concentraciones de oxitocina en saliva en saliva de diferentes especies sin necesidad de ningún procesado previo adicional a la centrifugación de la muestra (López-Arjona et al., 2021).

#### 5. SITUACIÓN ACTUAL Y APLICACIONES FUTURAS

En la actualidad, los biomarcadores de saliva se emplean sobre todo en experimentación y en pruebas para evaluar cómo influyen distintos compuestos como vacunas, fármacos, reductores de estrés o inmunomoduladores en los diferentes analitos presentes en saliva. También se pueden estudiar los efectos que los cambios en los sistemas de producción o

bioseguridad ocasionan en las diferentes rutas fisiológicas sobre los que los marcadores de saliva dan información. Ya que como se ha comentado, la saliva contiene marcadores para evaluar el bienestar, la inflamación, el sistema inmune o el estado oxidativo.

En todo caso, cuando se quieren medir analitos en saliva es importante tener en cuenta diversos factores como los ritmos circadianos (Ortín-Bustillo et al., 2022), el nivel de suciedad y contaminación por heces o pienso (Franco-Martínez et al., 2022) y realizar un adecuado almacenamiento (Escribano et al., 2018) para poder tener unas determinaciones analíticas fiables y poder interpretar los resultados analíticos de forma adecuada.

Se espera que en un futuro se sigan generando mayores conocimientos en este tema y, por lo tanto, se pueda ir incorporando el uso de biomarcadores en saliva de forma rutinaria en sistemas productivos de porcino, ya que, por ejemplo:

- Las PFAs tienen un alto potencial para detectar de forma precoz cualquier enfermedad inflamatoria y monitorizar el tratamiento.
- La PCA, aldolasa y proteínas del grupo S-100 podrían detectar la sepsis en el cerdo, contribuyendo a optimizar el uso de antibióticos.
- La oxitocina, junto con otros marcadores de estrés, pueden detectar situaciones donde no hay un bienestar óptimo y permitir que se inicien medidas para corregirlo o aumentar dicho bienestar.

En conclusión, el uso de la saliva en la especie porcina permite evaluar una serie de biomarcadores que pueden ser muy apropiados para su uso tanto en investigación como a nivel de granja. En condiciones de campo, además, el personal puede tomar fácilmente la muestra permitiendo un análisis más frecuente de la condición animal y, por lo tanto, un mejor control del estado sanitario y del bienestar. Esto ayudará a la toma de decisiones clínicas de

forma rápida, mejorando la productividad y el bienestar animal.

## FINANCIACIÓN

Esta investigación ha estado subvencionada por la Agencia Estatal de Investigación y la Unión Europea (Referencia PDC2021-121291-I00/AEI/10.13039/501100011033). También ha estado apoyada por el proyecto MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (Grant reference PCI2020-120712-2) y el programa European Union “NextGenerationEU”/PRTR (1st ICRAD Joint Cofund Call).

## REFERENCIAS

- Becker, Kenneth L., Snider, Richard, & Nylen, Eric S. (2010). Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *British Journal of Pharmacology*, 159(2), 253–264. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00433.x>
- Cerón, José J. (2019). Acute phase proteins, saliva and education in laboratory science: an update and some reflections. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 197. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1931-8>
- Cerón, José J., Contreras-Aguilar, M. D., Escribano, D., Martínez-Miró, S., López-Martínez, M. J., Ortín-Bustillo, A., Franco-Martínez, L., Rubio, C. P., Muñoz-Prieto, A., Tvarijonaviciute, A., López-Arjona, M., Martínez-Subiela, S., & Tecles, F. (2022). Basics for the potential use of saliva to evaluate stress, inflammation, immune system, and redox homeostasis in pigs. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03176-w>
- Cerón, José Joaquín, Ortín-Bustillo, Alba, José López-Martínez, María, Martínez-Subiela, Silvia, David Eckersall, Peter, Tecles, Fernando, Tvarijonaviciute, Asta, & Muñoz-Prieto, Alberto. (2023). S-100 Proteins: Basics and Applications as Biomarkers in An-



- imals with Special Focus on Calgranulins (S100A8, A9, and A12). *Biology*, 12(881). <https://doi.org/10.3390/biology12060881>
- Contreras-Aguilar, M D, López-Arjona, M., Martínez-Miró, S., Escribano, D., Hernández-Ruipérez, F., Cerón, J. J., & Tecles, F. (2021). Changes in saliva analytes during pregnancy, farrowing and lactation in sows: A sialochemistry approach. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 273, 105679. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105679>
- Contreras-Aguilar, María Dolores, Escribano, Damián, Martínez-Miró, Silvia, López-Arjona, Marina, Rubio, Camila P., Martínez-Subiela, Silvia, Cerón, José J., & Tecles, Fernando. (2019). Application of a score for evaluation of pain, distress and discomfort in pigs with lameness and prolapses: correlation with saliva biomarkers and severity of the disease. *Research in Veterinary Science*, 126, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.004>
- Contreras-Aguilar, María Dolores, Tvarijonavičiute, Asta, Monkeviciene, Ingrida, Martín-Cuervo, María, González-Arostegui, Luis Guillermo, Franco-Martínez, Lorena, Cerón, José Joaquín, Tecles, Fernando, & Escribano, Damián. (2020). Characterization of total adenosine deaminase activity (ADA) and its isoenzymes in saliva and serum in health and inflammatory conditions in four different species: an analytical and clinical validation pilot study. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 384. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02574-2>
- Escribano, D, Soler, L., Gutiérrez, A. M., Martínez-Subiela, S., & Cerón, J. J. (2013). Measurement of chromogranin A in porcine saliva: validation of a time-resolved immunofluorometric assay and evaluation of its application as a marker of acute stress. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience*, 7(4), 640–647. <https://doi.org/10.1017/S1751731112002005>
- Escribano, Damián, Campos, Paulo H. R. F., Gutiérrez, Ana M., Le Floc'h, Nathalie, Cerón, José J., & Merlot, Elodie. (2014). Effect of repeated administration of lipopolysaccharide on inflammatory and stress markers in saliva of growing pigs. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 200(3), 393–397. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.007>
- Escribano, Damián, Contreras-Aguilar, María D., Tvarijonavičiute, Asta, Martínez-Miró, Silvia, Martínez-Subiela, Silvia, Cerón, José J., Lamy, Elsa, & Tecles, Fernando. (2018). Stability of selected enzymes in saliva of pigs under different storage conditions: a pilot study. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(11), 1657–1661. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0346>
- Escribano, Damián, Gutiérrez, Ana M., Fuentes-Rubio, María, & Cerón, José J. (2014). Saliva chromogranin A in growing pigs: a study of circadian patterns during daytime and stability under different storage conditions. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 199(3), 355–359. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.01.005>
- Escribano, Damián, Horvatić, Anita, Contreras-Aguilar, Maria Dolores, Guillemín, Nicolas, Cerón, Jose Joaquín, Tecles, Fernando, Martínez-Miró, Silvia, Eckersall, Peter David, Manteca, Xavier, & Mrljak, Vladimir. (2019). Changes in saliva proteins in two conditions of compromised welfare in pigs: An experimental induced stress by nose snaring and lameness. *Research in Veterinary Science*, 125, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.06.008>
- Franco-Martínez, Lorena, Ortín-Bustillo, Alba, Rubio, Camila P., Escribano, Damián, López-Arjona, Marina, García-Manzanilla, Edgar, Cerón, José J., Martínez-Subiela, Silvia, Tvarijonavičiute, Asta, & Tecles, Fernando. (2022). Effects of pen faeces and feed contamination in biomarkers determination in oral fluid of pigs. *Research in Veterinary Science*, 152, 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.003>

- Fuentes, María, Tecles, Fernando, Gutiérrez, Ana, Otal, Julio, Martínez-Subiela, Silvia, & Cerón, José J. (2011). Validation of an automated method for salivary alpha-amylase measurements in pigs (*Sus scrofa domestica*) and its application as a stress biomarker. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 23(2), 282–287. <https://doi.org/10.1177/104063871102300213>
- Giri, Umamaheswari, Nagaraj, Vezhavendhan, Sankaran, Avudaiappan, R, Ramesh, Rajaram, Suganya, Muthanandam, Sivaramakrishnan, Arumugam, Santhadevy, & Santhanam, Vidyalakshmi. (2018). Sialochemical Profile in Depressive Individuals under Antidepressant Therapy: An Observational Study. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 12(5), VC06–VC09. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2018/28999.11456>
- Greabu, Maria, Battino, Maurizio, Mohora, Maria, Totan, Alexandra, Didilescu, Andreea, Spinu, Tudor, Totan, Cosmin, Miricescu, Daniela, & Radulescu, Radu. (2009). Saliva—a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *Journal of Medicine and Life*, 2(2), 124–132.
- Gutiérrez, A. M., Escribano, D., Fuentes, M., & Cerón, J. J. (2013). Circadian pattern of acute phase proteins in the saliva of growing pigs. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 196(2), 167–170. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.10.003>
- Henaó-Díaz, Alexandra, Giménez-Lirola, Luis, Baum, David H., & Zimmerman, Jeffrey. (2020). Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. *Porcine Health Management*, 6, 28. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00168-w>
- Jones, Candace, Barrera, Ingrid, Brothers, Shaun, Ring, Robert, & Wahlestedt, Claes. (2017). Oxytocin and social functioning. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2), 193–201. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/cjones>
- López-Arjona, M, Mateo, S. V, Escribano, D., Tecles, F., Cerón, J. J., & Martínez-Subiela, S. (2021). Effect of reduction and alkylation treatment in three different assays used for the measurement of oxytocin in saliva of pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 74, 106498. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106498>
- López-Arjona, Marina, Escribano, Damián, Mateo, Sandra V, Contreras-Aguilar, María Dolores, Rubio, Camila Peres, Tecles, Fernando, Cerón, José Joaquín, & Martínez-Subiela, Silvia. (2020). Changes in oxytocin concentrations in saliva of pigs after a transport and during lairage at slaughterhouse. *Research in Veterinary Science*, 133, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.015>
- López-Arjona, Marina, Padilla, Lorena, Roca, Jordi, Cerón, José Joaquín, & Martínez-Subiela, Silvia. (2020). Ejaculate Collection Influences the Salivary Oxytocin Concentrations in Breeding Male Pigs. *Animals*, 10(8), 1268. <https://doi.org/10.3390/ani10081268>
- López-Martínez, M. J., Franco-Martínez, L., Martínez-Subiela, S., & Cerón, J. J. (2022). Biomarkers of sepsis in pigs, horses and cattle: from acute phase proteins to procalcitonin. *Animal Health Research Reviews*, 23(1), 82–99. <https://doi.org/10.1017/S1466252322000019>
- López-Martínez, María José, Beletić, Anđelo, Kuleš, Josipa, Rešetar-Maslov, Dina, Rubić, Ivana, Mrljak, Vladimir, Manzanilla, Edgar García, Goyena, Elena, Martínez-Subiela, Silvia, Cerón, José Joaquín, & Muñoz-Prieto, Alberto. (2022). Revealing the Changes in Saliva and Serum Proteins of Pigs with Meningitis Caused by *Streptococcus Suis*: A Proteomic Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213700>
- López-Martínez, María José, Cerón, José Joaquín, Ortín-Bustillo, Alba, Escribano,

- Damián, Kuleš, Josipa, Beletić, Anđelo, Rubić, Ivana, González-Sánchez, Juan Carlos, Mrljak, Vladimir, Martínez-Subiela, Silvia, & Muñoz-Prieto, Alberto. (2022). A Proteomic Approach to Elucidate the Changes in Saliva and Serum Proteins of Pigs with Septic and Non-Septic Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126738>
- López-Martínez, María José, Escribano, Damián, Martínez-Miró, Silvia, Ramis, Guillermo, Manzanilla, Edgar G., Tecles, Fernando, Martínez-Subiela, Silvia, & Cerón, José J. (2022). Measurement of procalcitonin in saliva of pigs: a pilot study. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03240-5>
- López-Martínez, María José, Martínez-Subiela, Silvia, Cerón, José Joaquín, Ortín-Bustillo, Alba, Ramis, Guillermo, López-Arjona, Marina, Martínez-Miró, Silvia, Manzanilla, Edgar García, Eckersall, Peter David, Tecles, Fernando, Escribano, Damián, & Muñoz-Prieto, Alberto. (2023). Measurement of Calprotectin (S100A8/A9) in the Saliva of Pigs: Validation Data of A Commercially Available Automated Assay and Changes in Sepsis, Inflammation, and Stress. *Animals*, 13(7), 1190. <https://doi.org/10.3390/ani13071190>
- López-Martínez, María José, Ornelas, Mario Andre S., Amarie, Roxana Elena, Manzanilla, Edgar Garcia, Martínez-Subiela, Silvia, Tecles, Fernando, Tvarijonaviciute, Asta, Escribano, Damián, González-Bulnes, Antonio, Cerón, José Joaquín, López-Arjona, Marina, & Muñoz-Prieto, Alberto. (2023). Changes in salivary biomarkers of stress, inflammation, redox status, and muscle damage due to Streptococcus suis infection in pigs. *BMC Veterinary Research*, 19(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03650-z>
- Martínez-Miró, Silvia, Tecles, Fernando, Ramón, Marina, Escribano, Damián, Hernández, Fuensanta, Madrid, Josefa, Orenge, Juan, Martínez-Subiela, Silvia, Manteca, Xavier, & Cerón, José Joaquín. (2016). Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0791-8>
- Mateo, Sandra V., Contreras-Aguilar, Maria D., López-Jornet, Pia, Jimenez-Reyes, P., Ceron, Jose J., Tvarijonaviciute, Asta, & Martinez-Subiela, Silvia. (2019). Development and evaluation of a rapid and sensitive homogeneous assay for haptoglobin measurements in saliva. *Microchemical Journal*, 150(April), 104159. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104159>
- Merlot, E., Mounier, A. M., & Prunier, A. (2011). Endocrine response of gilts to various common stressors: a comparison of indicators and methods of analysis. *Physiology & Behavior*, 102(3-4), 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.11.009>
- Miller, B. E., Deutsch, O., Redlich, M., Kontinen, Y. T., Benoliel, R., Zaks, B., Davidovich, E., Palmon, A., & Aframian, D. J. (2012). Sialochemistry and cortisol levels in patients with Sjogren's syndrome. *Oral Diseases*, 18(3), 255-259. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01866.x>
- Motzkus, Christine A., & Luckmann, Roger. (2017). Does Infection Site Matter? A Systematic Review of Infection Site Mortality in Sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine*, 32(8), 473-479. <https://doi.org/10.1177/0885066615627778>
- Ortín-Bustillo, A, Vidal, G. Ramis, Tortosa, D. Escribano, López-Arjona, M., Rubio, C. Perez, Cerón, J. J., Muñoz-Prieto, A., Pardo-Marín, L., López-Martínez, M. J., Botia, M., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., & Tecles, F. (2022). Automated assays for trace elements and ferritin measurement in saliva of pigs: Analytical validation and a pilot application to evaluate different iron status. *Research in Veterinary Science*, 152, 410-416. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.007>

- Ortín-Bustillo, Alba, Botía, María, José López-Martínez, María, Martínez-Subiela, Silvia, Cerón, José Joaquín, González-Bulnes, Antonio, García Manzanilla, Edgar, Goyena, Elena, Tecles, Fernando, & Muñoz-Prieto, Alberto. (2023). Changes in S100A8/A9 and S100A12 and Their Comparison with Other Analytes in the Saliva of Pigs with Diarrhea Due to *E. coli*. *Animals*, *13*, 2556. <https://doi.org/10.3390/ani13162556>
- Ortín-Bustillo, Alba, Contreras-Aguilar, María D., Rubio, Camila P., Botia, María, Cerón, José J., López-Arjona, Marina, Martínez-Subiela, Silvia, Escribano, Damián, & Tecles, Fernando. (2022). Evaluation of the Effect of Sampling Time on Biomarkers of Stress, Immune System, Redox Status and Other Biochemistry Analytes in Saliva of Finishing Pigs. *Animals*, *12*(16), 2127. <https://doi.org/10.3390/ani12162127>
- Ortín-Bustillo, Alba, Escribano, Damián, López-Arjona, Marina, Botia, María, Fuentes, Pablo, Martínez-Miró, Silvia, Rubio, Camila P., García-Manzanilla, Edgar, Franco-Martínez, Lorena, Pardo-Marín, Luis, Cerón, José J., Llonch, Pol, & Tecles, Fernando. (2022). Changes in a Comprehensive Profile of Saliva Analytes in Fattening Pigs during a Complete Productive Cycle: A Longitudinal Study. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, *12*(14). <https://doi.org/10.3390/ani12141865>
- Ortín-Bustillo, Alba, Escribano, Damián, Martínez-Subiela, Silvia, Tvarijonaviciute, Asta, Muñoz-Prieto, Alberto, López-Arjona, Marina, Cerón, José J., & Tecles, Fernando. (2023). Trace Elements and Ferritin in Pig Saliva: Variations during Fattening, Time of Sampling, Effect of Dirtiness and Stability under Different Storage Conditions. *Antioxidants*, *12*(3), 649. <https://doi.org/10.3390/antiox12030649>
- Rault, Jean-Loup, van den Munkhof, Marleen, & Buisman-Pijlman, Femke T. A. (2017). Oxytocin as an Indicator of Psychological and Social Well-Being in Domesticated Animals: A Critical Review. *Frontiers in Psychology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.01521>
- Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., Van Boeckel, T. P., & Woolhouse, M. E. J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *110*(7), 377–380. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>
- Rubio, Camila Peres, Mainau, Eva, Cerón, José Joaquín, Contreras-Aguilar, Maria Dolores, Martínez-Subiela, Silvia, Navarro, Elena, Tecles, Fernando, Manteca, Xavier, & Escribano, Damian. (2019). Biomarkers of oxidative stress in saliva in pigs: analytical validation and changes in lactation. *BMC Veterinary Research*, *15*(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1875-z>
- Shams, Fariza, Oldfield, Neil J., Wooldridge, Karl G., & Turner, David P. J. (2014). Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA)-a conserved glycolytic enzyme with virulence functions in bacteria: “ill met by moonlight”. *Biochemical Society Transactions*, *42*(6), 1792–1795. <https://doi.org/10.1042/BST20140203>
- Smyth, Michael A., Brace-McDonnell, Samantha J., & Perkins, Gavin D. (2016). Identification of adults with sepsis in the prehospital environment: a systematic review. *BMJ Open*, *6*(8), e011218. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011218>
- Tabak, L. A. (1995). In Defense of the Oral Cavity: Structure, Biosynthesis, and Function of Salivary Mucins. *Annual Review of Physiology*, *57*(1), 547–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.002555>
- Tecles, Fernando, Rubio, Camila P., Contreras-Aguilar, Maria D., Lopez-Arjona, Marina,

- Martinez-Miro, Silvia, Martinez-Subiela, Silvia, & Ceron, Jose J. (2018). Adenosine deaminase activity in pig saliva: analytical validation of two spectrophotometric assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 30(1), 175–179. <https://doi.org/10.1177/1040638717742947>
- Turner, A. I., & Tilbrook, A. J. (2006). Stress, cortisol and reproduction in female pigs. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 62, 191–203.
- Tvarijonaviute, Asta, Martínez-Subiela, Silvia, López-Jornet, Pia, & Lamy, Elsa. (2020). *Saliva in Health and Disease: The Present and Future of a Unique Sample for Diagnosis* (Asta Tvarijonaviute, Silvia Martínez-Subiela, Pia López-Jornet, & Elsa Lamy, Eds.). Springer International Publishing.
- Wu, Zongfu, Zhang, Wei, & Lu, Chengping. (2008). Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53(1), 52–59. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00401.x>
- Yoshizawa, Janice M., Schafer, Christopher A., Schafer, Jason J., Farrell, James J., Paster, Bruce J., & Wong, David T. W. (2013). Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 781–791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>