



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS Y CONDICIONES MÁS  
ADECUADAS DE TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SALIVA  
HUMANA ANTES DE SU PROCESAMIENTO EN EL LABORATORIO.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
por la Br. Darly Arteaga De Melo,  
como requisito parcial para optar al  
título de Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. María Valentina Salas

**Caracas, Mayo de 2012.**

## Resumen.

La secreción de las glándulas salivales mayores y menores, junto con el fluido crevicular, microorganismos y restos celulares en conjunto forman la saliva total o mixta, la cual ha sido empleada como fluido biológico para el diagnóstico de enfermedades sistémicas y propias de la boca, debido a que sus componentes pueden ser usados como biomarcadores y presenta ventajas respecto a su recolección, almacenamiento, método de detección de bajo costo y no invasivo. Resultados obtenidos por diversos investigadores demuestran la variabilidad que puede existir entre las muestras debido a las condiciones de almacenamiento y tratamiento antes y durante su utilización con fines de diagnóstico e investigación, por esto nos propusimos como objetivo de este trabajo estandarizar las técnicas y determinar las condiciones adecuadas de tratamiento de las muestras de saliva humana sin estimular, antes de su procesamiento para investigación en el laboratorio.

El tiempo de centrifugación (5, 10 o 15 min) y los cambios producto de la filtración o no del sobrenadante, se determinaron al comparar la concentración de proteínas totales presentes en el sobrenadante de la muestra y a través del crecimiento de las bacterias presentes en el mismo. Se analizaron perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida para observar cambios o no, en la composición de proteínas con los diferentes tratamientos.

Igualmente, se determinó si hay variaciones en cuanto a la concentración de proteínas totales y perfil electroforético de las muestras cuando se emplean o no inhibidores de proteasas.

Además se utilizó una cromatografía de afinidad para extraer posibles proteínas que estén enmascarando otras proteínas salivales en las muestras y luego se realizó electroforesis a fin de analizar cambios en el perfil electroforético.

Los resultados obtenidos demostraron que las muestras deben ser almacenadas el menor tiempo posible, ya que al almacenarlas se afectan las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y proteínas totales. Se recomienda la centrifugación durante 15 minutos y el filtrado de las muestras a fin de descartar los elementos insolubles y los microorganismos presentes en la misma.

El empleo o no de inhibidores de proteasas no se afectó en ensayos preliminares, la concentración de proteínas totales, ni el perfil electroforético de las muestras. Al emplear la cromatografía de afinidad, en el perfil electroforético se visualizan mejor algunas bandas de baja concentración.

## Índice.

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>I- Introducción.</b> .....	2
1. Glándulas salivales.....	3
1.1. Glándulas salivales mayores. ....	4
2. Fluido crevicular.....	6
3. Componentes de la saliva.....	6
3.1. Elementos Inorgánicos.....	7
3.1.1. $\text{Ca}^{2+}$ .....	7
3.1.2. $\text{PO}_4^{3-}$ .....	8
3.1.3. Bicarbonato. ....	8
3.1.4. Sodio, potasio y cloruro. ....	9
3.2. Elementos orgánicos. ....	9
3.2.1. Mucinas. ....	9
3.2.2. Proteínas ricas en prolina (PRPs).....	10
3.2.3. $\alpha$ -amilasa.....	11
3.2.4. Histatinas.....	11
3.2.5. Cistatinas.....	12
3.2.6. Peroxidasa.....	12
3.2.7. Lactoferrina.....	12
3.2.8. Lisozima. ....	13

3.2.9. Estaterina. ....	13
3.2.10. Albúmina. ....	13
3.2.11. Otras proteínas salivales. ....	13
3.2.12. Elementos Inmunológicos. ....	14
4. Funciones de la saliva. ....	15
4.1. Gusto y digestión. ....	15
4.2. Mantenimiento, lubricación y limpieza. ....	16
4.3. Capacidad tampón. ....	17
4.4. Actividad Antimicrobiana. ....	17
5. Saliva como herramienta diagnóstica. ....	18
6. Antecedentes. ....	20
<b>II-. Objetivos</b> .....	24
1. Objetivo general.....	24
2. Objetivos específicos. ....	24
<b>III-. Materiales y Métodos</b> .....	25
1. Material biológico. ....	25
2. Obtención de las muestras de saliva. ....	25
3. Determinación del tiempo de centrifugación. ....	25
4. Filtración de las muestras de saliva. ....	26
5. Cultivo de bacterias presentes en las muestras de saliva. ....	27
6. Determinación de la concentración de proteínas totales. ....	27

7. Determinación de $\text{PO}_4^{3-}$ .....	27
8. Determinación de $\text{Ca}^{2+}$ .....	28
9. Estabilidad de las muestras. ....	29
10. Empleo de una mezcla de inhibidores de proteasas.....	29
11. Cromatografía para la extracción de proteínas de la muestra de saliva..	30
12. Electroforesis en condiciones disociantes.....	31
12.1. Preparación de las muestras para la electroforesis.....	31
12.2. Tinción en azul de Coomassie R250. ....	33
12.3. Tinción de plata para el gel de Electroforesis. ....	33
13. Análisis estadístico.....	34
<b>IV-. Resultados</b> .....	<b>35</b>
1. Estabilidad de las muestras de saliva humana no estimulada.....	35
1.1. Estabilidad de las concentraciones de $\text{Ca}^{2+}$ en muestras de saliva.....	35
1.2. Estabilidad de las concentraciones de $\text{PO}_4^{3-}$ en muestras de saliva....	36
1.3. Estabilidad de las concentraciones de proteínas totales en muestras de saliva.....	37
2. Determinación del tiempo de centrifugación adecuado. ....	38
2.1. Concentración de proteínas totales en el sobrenadante de saliva centrifugada por diferentes tiempos. ....	38
2.2. Cultivo del sobrenadante de saliva de adultos sanos centrifugada por diferentes tiempos.....	40

3. Centrifugación y Filtración de las muestras. ....	40
3.1. Concentración de proteínas totales en la muestra sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada. ....	41
3.2. Cultivo del sobrenadante de muestras de saliva sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada. ....	42
3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes de muestras de saliva sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada. ....	43
4. Empleo de una mezcla de inhibidores de proteasas.....	47
4.1. Concentración de proteínas totales en la muestra con y sin inhibidor de proteasas. ....	48
4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes de muestras de saliva con y sin inhibidor de proteasas. ....	49
5. Cromatografía para la extracción de proteínas de la muestra de saliva.....	50
5.1. Concentración de proteínas totales en el <i>pool</i> antes y después de realizar la cromatografía de extracción. ....	51
5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes del <i>pool</i> antes y después de realizar la cromatografía de extracción.....	51
<b>V-. Discusión.....</b>	<b>53</b>
<b>VI-. Conclusiones .....</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>70</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## Abreviaturas.

**ANOVA:** Análisis de Varianza

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina.

**Ig:** Inmunoglobulina.

**IgA:** Inmunoglobulina A.

**IgG:** Inmunoglobulina G.

**IgM:** Inmunoglobulina M.

**kDa:** KiloDalton.

**L:** Litro.

**MG1:** Glicoproteína mucina tipo 1, oligomérica, con una masa molecular de 1000 kDa.

**MG2:** Glicoproteína mucina tipo 2, monomérica, con una masa molecular de 250-200 kDa.

**mM:** Milimolar.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PRPs:** Proteínas ricas en prolina.

**s:** segundos

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio.

**TCA:** Ácido Tricloro Acético.

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

**μL:** Microlitro.

## I-. Introducción.

El fluido de la cavidad bucal es reconocido como un importante fluido en investigación debido a la variedad de sus componentes, además de las diversas funciones que lleva a cabo dentro de la boca como son el gusto, la digestión, la lubricación, limpieza, actividad antimicrobiana y capacidad tampón.

El fluido de la cavidad bucal está constituido aproximadamente por 99% de agua y 1% de moléculas orgánicas e inorgánicas. Entre los componentes orgánicos se encuentran glicoproteínas, enzimas, inmunoglobulinas y algunos péptidos con actividad antimicrobiana; y entre los compuestos inorgánicos se hallan electrolitos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  (Llena, 2006; Schipper y col, 2007).

Este fluido biológico es denominado saliva. Por definición, la saliva en los humanos se origina principalmente de tres glándulas salivales mayores y de un gran número de glándulas salivales menores (Chiappin y col, 2007; Nieuw y col, 2007; Walsh, 2008).

La secreción diaria de saliva de un adulto promedio es de 0,5 a 1,5 L y su producción es controlada por el sistema nervioso autónomo (Humphrey y Williamson, 2001; Chiappin y col, 2007; Schipper y col, 2007; Ross y Pawlina, 2008). Al analizar el fluido hipotónico secretado por las glándulas salivales, se evaluaría sólo una parte de esta mezcla de fluidos que se encuentran en la cavidad bucal, ya que en la boca se encuentran la secreción de las glándulas



mayores y menores, el fluido crevicular, microorganismos y restos celulares, conformando la saliva total o mixta (Beeley, 1991).

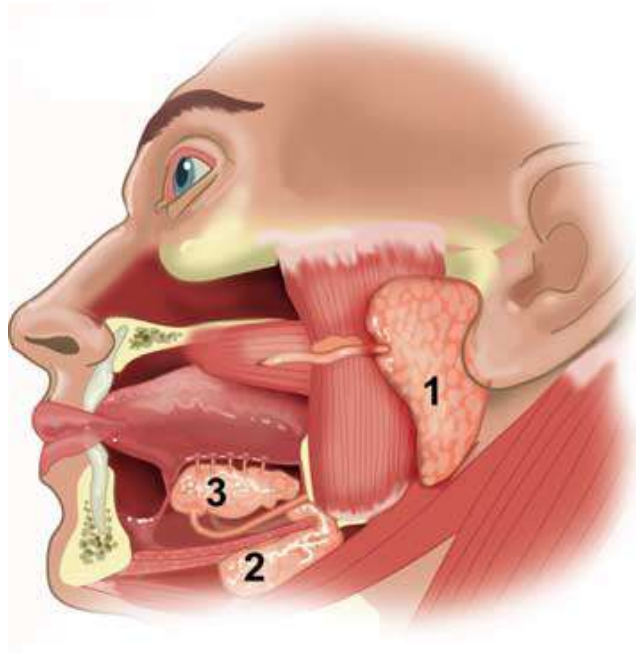
La saliva ha sido empleada como herramienta para el diagnóstico en diversas investigaciones debido a sus propiedades biológicas. Ha sido utilizada para determinar presencia y/o concentración de anticuerpos, sustancias de grupos sanguíneos, alcohol, drogas ilícitas y terapéuticas, hormonas esteroides (cortisol, estrógeno, progesterona, testosterona y aldosterona), iones y proteínas. Recientemente también está siendo utilizada para estudiar patologías bucales como la caries y la enfermedad periodontal (Edgar, 1992; Walsh, 2008).

## **1. Glándulas salivales.**

Entre las glándulas salivales podemos encontrar dos tipos, las glándulas salivales mayores y las menores. Las glándulas salivales mayores son la parótida, la submandibular y la sublingual. Todas están en pares y constituidas por un epitelio glandular, un conducto intercalar, un conducto estriado, un conducto excretor y un adenómero llamado acino, que es la unidad funcional básica de estas glándulas (Chiappin y col, 2007; Ross y Pawlina, 2008) (Figura 1).

Por otra parte, las glándulas salivales menores se encuentran dispersas en la mucosa y submucosa de la cavidad bucal, son esencialmente mucosas, poseen un epitelio cúbico no especializado (Llena, 2006; Ross y Pawlina, 2008). Dichas glándulas secretan el 15 % del volumen de saliva producido por todas las glándulas salivales (Humphrey y Williamson, 2001; Walsh, 2008).

**Figura 1-. Glándulas salivales mayores.** Glándula parótida (1), glándula submandibular (2) y glándula sublingual (3). Tomado de Nieuw y col, 2007.



## **1.1. Glándulas salivales mayores.**

### **1.1.1 Glándulas parótidas.**

Son las glándulas salivales de mayor tamaño, situadas por debajo y por delante del oído, cuyo conducto excretor desemboca en la cavidad bucal frente al segundo molar superior (Chiappin y col, 2007; Schipper y col, 2007).

Poseen acinos serosos que secretan proteínas como la  $\alpha$ -amilasa, algunas proteínas ricas en prolina (PRPs) e histatina y algunos iones como el bicarbonato, dando origen a una saliva fluida (Llena, 2006; Chiappin y col, 2007; Schipper y col, 2007; Ross y Pawlina, 2008; Walsh, 2008). Estas glándulas secretan el 20 % del volumen total secretado por todas las glándulas salivales (Humphrey y Williamson, 2001; Walsh, 2008).

### **1.1.2 Glándulas submandibulares.**

Están ubicadas debajo del piso de la boca, una de cada lado, cerca de la mandíbula, son glándulas mixtas compuestas por acinos serosos y mucosos coronados por células serosas formando la medialuna de Von Ebner (Chiappin y col, 2007; Schipper y col, 2007; Ross y Pawlina, 2008).

Secretan más PRPs y proteínas ricas en histatina, que las glándulas parótidas. En ellas predominan los acinos serosos por lo que se denomina seromucosa y dan origen a una saliva fluida pero viscosa que es aproximadamente el 60 % del volumen total secretado por todas las glándulas salivales (Humphrey y Williamson, 2001; Llana, 2006; Walsh, 2008).

### **1.1.3 Glándulas sublinguales.**

Las glándulas sublinguales son las más pequeñas de las glándulas salivales mayores, situadas en el piso de la boca en la posición anterior con respecto a las glándulas submandibulares.

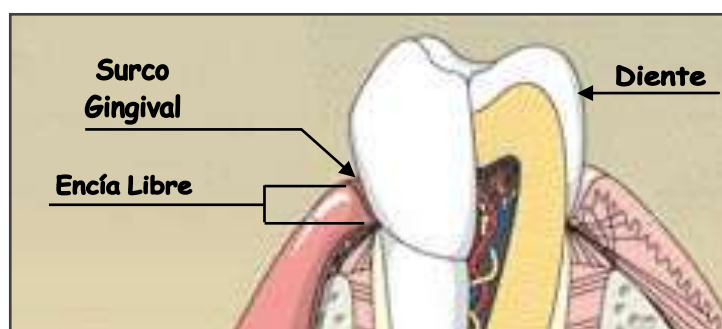
Poseen acinos mucosos con semilunas serosas y su secreción es principalmente mucosa por lo que se denomina mucoserosa, dando origen a una saliva muy viscosa (Llana, 2006; Schipper y col, 2007; Ross y Pawlina, 2008).

La secreción de estas glándulas es aproximadamente el 5% del volumen total secretado por todas las glándulas salivales (Humphrey y Williamson, 2001; Walsh, 2008).

## 2. Fluido crevicular.

Entre el diente y la encía (Figura 2) se encuentra el surco gingival de 2 mm o menos de profundidad, constituido por un epitelio no queratinizado que secreta un fluido extracelular, diferente al líquido secretado por las glándulas salivales, denominado fluido crevicular (Harfin, 2005; Chiappin y col, 2007).

Aproximadamente de 2 a 3  $\mu\text{L}$  de fluido crevicular son producidos por hora, por cada diente. El fluido crevicular es considerado un trasudado del plasma, por lo que, la saliva es funcionalmente equivalente al suero, al reflejar el estado fisiológico del cuerpo, incluyendo las variaciones emocionales, hormonales, nutricionales y metabólicas (Chiappin y col, 2007; Lee y Wong, 2009; Lee y col, 2009).



**Figura 2-. Surco gingival.** Diversos compuestos del plasma llegan a la cavidad bucal a través del fluido crevicular, el cual es secretado a través del surco gingival. Modificado de [www.integradental.cl](http://www.integradental.cl). [Consulta 20 de abril de 2011].

## 3. Componentes de la saliva.

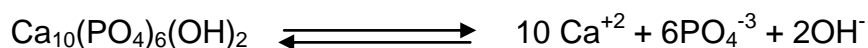
El 1 % de la saliva está constituida por elementos inorgánicos y orgánicos, algunos secretados por las glándulas salivales y otros provenientes de la sangre a través de fluido crevicular. Estos componentes contribuyen con las funciones de la misma.

### 3.1. Elementos Inorgánicos.

Entre los elementos inorgánicos se encuentran electrolitos, que desempeñan diversas funciones dentro de la cavidad bucal. Los principales electrolitos de la saliva son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y su concentración es afectada por factores como el flujo salival, la estimulación y la hora de colección (Echeverri, 1994).

#### 3.1.1. $\text{Ca}^{2+}$ .

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede encontrarse en la saliva interactuando con proteínas, soluble o unido a  $\text{PO}_4^{3-}$ , contribuyendo a la remineralización del diente al formar la hidroxiapatita, componente del esmalte dental. Entre la hidroxiapatita y estos iones, se establece el siguiente equilibrio:

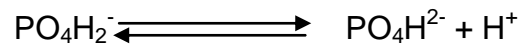


La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en saliva se encuentra entre 0,5 y 2,75 mM (Edgar, 1992). Las concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  favorecen la remineralización, manteniendo la integridad del diente, por el contrario las bajas concentraciones favorecen la desmineralización del diente. La remineralización del diente también puede ocurrir en presencia de flúor, en cuyo caso se forma la fluorapatita la cual es mucho más resistente que la hidroxiapatita (Echeverri, 1994).

El  $\text{Ca}^{2+}$  también forma sales que precipitan formando cálculos, lo cual se puede evitar por la acción de diversas proteínas presentes en la saliva (Bardow y col, 2000).

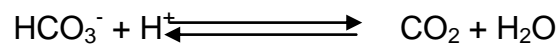
### 3.1.2. $\text{PO}_4^{3-}$ .

El  $\text{PO}_4^{3-}$  forma complejos con el  $\text{Ca}^{2+}$  como la hidroxiapatita, su concentración oscila entre 0,63 y 7,47 mM (Edgar, 1992). Participa en el control del pH de la saliva, particularmente en situaciones de reposo a través del equilibrio del siguiente tampón (Bardow y col., 2000; Llena 2006; Walsh, 2008):



### 3.1.3. Bicarbonato.

El sistema amortiguador más importante de la saliva es el bicarbonato. El equilibrio de este tampón es el siguiente:



El bicarbonato difunde por toda la cavidad bucal, incluso por la película adquirida y es capaz de neutralizar el ácido producido por los microorganismos presentes en ella (Bardow y col, 2000; Walsh, 2008).

Pocos minutos después del cepillado dental sobre los dientes se forma de manera natural y espontánea una biopelícula delgada, amorfa y electrodensa adyacente a la superficie del esmalte dental, cuyo grosor varía según el sitio de 1 a 2  $\mu\text{m}$  y es denominada película adquirida (Barrancos y Barrancos, 2006; Gutiérrez, 2006).

#### **3.1.4. Sodio, potasio y cloruro.**

El Na<sup>+</sup> se encuentra en concentración de 0 a 0,80 mg/mL y K<sup>+</sup> de 0,6 a 1 mg/mL en la cavidad bucal, ambos contribuyen con la osmolaridad en la saliva (Edgar, 1992).

La concentración de Cl<sup>-</sup> en saliva se encuentra entre 0,6 – 1 mg/mL, contribuye con la osmolaridad de la saliva y sirve como cofactor de algunas enzimas presentes en la misma, como la  $\alpha$ -amilasa (Edgar, 1992).

#### **3.2. Elementos orgánicos.**

En la saliva se encuentran componentes orgánicos como glicoproteínas, enzimas, inmunoglobulinas y algunos péptidos con actividad antimicrobiana, los cuales en conjunto o por separado desempeñan diversas funciones dentro de la cavidad bucal.

##### **3.2.1. Mucinas.**

Las mucinas son glicoproteínas con residuos de oligosacáridos en su cadena, y en su composición predominan aminoácidos como serina, treonina, alanina y prolina. Mediante interacciones hidrofílicas enlazan agua, que es esencial para mantener la hidratación de la mucosa bucal (Walsh, 2008).

Las mucinas tienen baja solubilidad, alta viscosidad, elasticidad y gran adherencia (Schenkels y col, 1995).

En la saliva humana se encuentran dos tipos específicos de mucinas. Mucinas de alta masa molecular (MG1) que sobrepasan los 1000 kDa, éstas se adhieren a la superficie del diente formando una barrera contra la acción de los ácidos, ayudada por su capacidad de formar complejos con otras proteínas

salivales. Las mucinas de baja masa molecular (MG2), cuya masa se encuentra alrededor de 200-150 kDa, promueven la separación y posterior agregación de bacterias, que posteriormente son removidas por la saliva (Nieuw y col, 1987; Echeverri, 1994).

### **3.2.2. Proteínas ricas en prolina (PRPs).**

Las PRPs contienen predominantemente residuos de prolina, glicina y glutamina, son secretadas por las glándulas parótidas y submandibulares y constituyen una fracción significativa de las proteínas totales en saliva (Schenkels y col, 1995).

Estas proteínas previenen efectos dañinos de la dieta, modulan la flora bucal y sufren modificaciones post-transduccionales como proteólisis y glicosilación (Malgorzata, 2007).

Las PRPs pueden ser ácidas, básicas o glicosiladas. Las PRPs ácidas poseen una masa molecular de 27 a 16 kDa y fuerte afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , participan en la formación de la película adquirida del diente y de la hidroxiapatita, al mantener el  $\text{Ca}^{2+}$  en equilibrio con la del  $\text{PO}_4^{3-}$  en la saliva (Bennick y col, 1983; Schenkels y col, 1995). La película adquirida se forma en no más de dos horas en una superficie dental limpia, carece de microorganismos y sus productos están formados por proteínas y glicoproteínas (Barrancos y Barrancos, 2006).

Las PRPs básicas (6-9 kDa) están implicadas en funciones de protección. Por otra parte, las glicosiladas (36 kDa) participan en la lubricación y actúan contra ciertos microorganismos (Bennick y col, 1983; Schenkels y col, 1995).



### **3.2.3. $\alpha$ -amilasa.**

La  $\alpha$ -amilasa es una glicoproteína con una masa molecular entre 55 y 62 kDa, su función es hidrolizar los enlaces glicosídicos  $\alpha$  1-4 entre unidades de glucosa en polisacáridos como el almidón.

Esta enzima requiere  $\text{Cl}^-$  como cofactor, es uno de los componentes más abundantes de la saliva (Echeverri, 1994). La  $\alpha$ -amilasa puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias. Ésta también se puede encontrar no proteolizada y adherida a la superficie del diente formando parte de la película adquirida (Jensen y col, 1992; Walsh, 2008).

### **3.2.4. Histatinas.**

Las Histatinas son una familia de péptidos, en los cuales los residuos de histidina representan entre el 18 y 29 % de los aminoácidos presentes en la proteína. Estas proteínas se encuentran presentes únicamente en el fluido salival (Malgorzata, 2007).

Están involucradas en otras funciones específicas de la cavidad bucal, como la formación de la película adquirida del diente y la inhibición de la liberación de histaminas por los mastocitos, lo que sugiere que juegan un rol importante en la inflamación. Adicionalmente, poseen un efecto bactericida y fungicida, al unirse a la membrana plasmática del microorganismo, alterando su integridad y permeabilidad (Schenkels y col, 1995; Lamkin y col, 1996; Malgorzata, 2007; Walsh, 2008).

### **3.2.5. Cistatinas.**

Las cistatinas pertenecen a una clase de inhibidores de las cisteína proteinasas, se encuentran presentes en todas las secreciones mucosas. Tienen una masa molecular de 14,4 kDa (Barrett, 1987).

Pueden regular la actividad de las catepsinas liberadas durante la inflamación, participan en la inhibición de varios virus y en el control de la proliferación e invasión de células tumorales (Sloane y Honn, 1984). Por otra parte, se ha determinado su unión a la hidroxiapatita y su participación en la formación de la película adquirida del diente (Schenkels y col, 1995).

### **3.2.6. Peroxidasa.**

La peroxidasa es una enzima con una masa molecular de 70 kDa, que empleando peróxido de hidrógeno cataliza la oxidación de tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) salival a la molécula tóxica hipotiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ), que desactiva las enzimas bacterianas, inhibiendo su crecimiento (Battino y col, 2002; Walsh, 2008); al impedir el transporte y la glicólisis de los carbohidratos (Douglas, 1994).

### **3.2.7. Lactoferrina.**

La lactoferrina es una glicoproteína de la familia de las transferrinas que enlaza hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ ), tiene una masa molecular de 80 kDa (Echeverri, 1994; Humphrey y Williamson, 1995). Al unirse a la pared celular de algunas bacterias puede aglutinarlas y por su afinidad al hierro libre, causa efectos bactericidas en varios microorganismos que requieren del elemento para su supervivencia (Echeverri, 1994; De Almeida, 2008).

### **3.2.8. Lisozima.**

La lisozima es una proteína antimicrobiana con una masa molecular de 14 kDa, secretada por la glándula parótida. Puede hidrolizar la pared celular de algunas bacterias, debido a su fuerza catiónica y causar su lisis (Humphrey y Williamson, 1995; Echeverri, 1994; Edgerton y Koshlukova, 2000; Nieuw Amerongen y col, 2004; De Almeida, 2008).

### **3.2.9. Estaterina.**

La estaterina es una proteína de baja masa molecular, con un extremo amino terminal muy ácido, que inhibe la precipitación de  $\text{PO}_4^{3-}$  cálcico al unirse a los cristales de hidroxiapatita (Edgar, 1992).

### **3.2.10. Albúmina.**

Es una proteína sérica con una masa molecular de 65-69 kDa, se sintetiza en el hígado y es responsable del transporte de lípidos, hormonas y determinados fármacos. Se encuentra en sangre en concentraciones de 35-52 g/L, y su presencia en saliva es asociada al mecanismo de trasudación del plasma a través del surco gingival (Schenkels y col, 1995; Teijón, 2001; García, 2006)

La albúmina forma complejos con las PRPs y glicoproteínas, participando en la formación de la película adquirida y en la lubricación de los tejidos presentes en la cavidad bucal (Schenkels y col, 1995).

### **3.2.11. Otras proteínas salivales.**

La gustina o anhidrasa carbónica es una enzima con una masa molecular de 42 kDa y es esencial para la percepción del gusto, además de servir como un factor de crecimiento y desarrollo de las papilas gustativas (Echeverri, 1994).

La aglutinina es una proteína altamente glicosilada con una masa molecular de aproximadamente 340 kDa, esta proteína lleva a cabo funciones de agregación bacteriana (Nieuw y Veerman, 2002).

Los inhibidores tisulares de proteasas (TIMPS) son inhibidores de metaloproteinasas secretados por las glándulas parótidas y submandibulares, con una masa molecular de 28 kDa. En la saliva, el TIMP-1 participa en el control de enfermedades inflamatorias y se ha encontrado relación entre la baja concentración de TIMP-1 con personas con enfermedad periodontal (Nieuw y Veerman, 2002).

### **3.2.12. Elementos Inmunológicos.**

La saliva contiene inmunoglobulinas, principalmente inmunoglobulina A (IgA), con bajas concentraciones de inmunoglobulinas provenientes del plasma IgG e IgM, las cuales llegan a la saliva a través del surco gingival.

La IgM tiene una masa molecular aproximada de 900-971 kDa, ésta inmunoglobulina facilita la agregación de los microorganismos al unirse a estos, facilitando a su vez la remoción de los microorganismos de la cavidad bucal por el flujo salival (Wan y col, 2003; Romero, 2007; Koneman, 2008; Baynes y Dominiczak, 2011).

La IgG es la principal inmunoglobulina del plasma, con una masa molecular alrededor de 150-160 kDa, se une a los microorganismos facilitando el reconocimiento de los mismos por los fagocitos (Wan y col, 2003; Romero, 2007; Koneman, 2008; Baynes y Dominiczak, 2011).

La IgA es la principal inmunoglobulina secretada en las superficies mucosas, se puede conseguir en forma de monómeros (160 kDa) o dímeros (400 kDa) (Romero, 2007; Koneman, 2008). En la saliva se encuentra en una concentración de 0,2 mg/mL; es producida por plasmocitos del tejido conectivo y transportada a través de las células ductales hacia las glándulas (Edgar, 1992; Echeverri, 1994; De Almeida, 2008; Wan y col, 2003).

Las funciones de la IgA en la cavidad bucal, son contribuir a la inmunidad inhibiendo la adherencia de microorganismos a las células; participar en la neutralización de virus e interactuar con antígenos de los alimentos evitando su absorción hacia el torrente sanguíneo, reduciendo la incidencia de reacciones alérgicas (Tapia y Quiroga, 1998).

#### **4. Funciones de la saliva.**

Los diferentes componentes orgánicos e inorgánicos presentes en la saliva, combinados o por separado, le permiten desempeñar múltiples funciones en la cavidad bucal, como el inicio de la digestión, su capacidad tampón y la actividad antimicrobiana entre otras.

##### **4.1. Gusto y digestión.**

La saliva mantiene los alimentos en solución y la presencia de la proteína gustina unida al  $Zn^{2+}$  permite la sensación del gusto (Edgar, 1992; Humphrey y Williamson, 2001; Llana, 2006; Chiappin y col, 2007; De Almeida, 2008).

Con los alimentos en solución comienza el proceso de digestión de los mismos al formar el bolo alimenticio, esta función es mediada por un número de enzimas, incluyendo la  $\alpha$ -amilasa, proteasas y nucleasas (Edgar, 1992; Chiappin y col, 2007; De Almeida, 2008; Walsh, 2008).

#### **4.2. Mantenimiento, lubricación y limpieza.**

El flujo constante de saliva remueve los restos de alimentos, sustancias y algunos microorganismos, de esta manera ejerce una función de limpieza, disminuyendo los efectos nocivos de las sustancias que ingerimos o de las que producen los microorganismos presentes en la cavidad bucal (Edgar, 1992; Llana, 2006).

La saliva cubre los tejidos blandos y duros presentes en la boca, los lubrica y protege al hablar o masticar, disminuyendo roces entre los dientes y la mucosa o con los alimentos ingeridos; previene la deshidratación, facilitando la deglución y la masticación, y evita la adhesión de microorganismos (Llana, 2006; Schipper y col, 2007; De Almeida, 2008).

Proteínas como las mucinas son esenciales en estas funciones, ya que mantienen la hidratación de la mucosa bucal. La presencia de regiones altamente glicosiladas en estas proteínas y su capacidad de adherencia, permiten la protección de la superficie de los dientes y de la mucosa de la acción de enzimas proteolíticas (Humphrey y Williamson, 2001, Walsh, 2008).

#### **4.3. Capacidad tampón.**

Los componentes inorgánicos y orgánicos presentes en la saliva mantienen el pH en un rango más o menos estable entre 6,7 y 7,4; evitando daño a los tejidos y desmineralización del esmalte por acción de los ácidos ingeridos o producidos por los microorganismos (Walsh, 2008).

El pH de la saliva en condición de reposo, será más bajo que cuando ésta sea estimulada. De igual manera será más bajo al dormir e inmediatamente al despertar, que durante el día. Un aumento en los niveles de bicarbonato en la saliva aumentará el pH salival durante las horas de vigilia, inhibiendo el crecimiento de microorganismos acidúricos como *Streptococcus mutans* (De Almeida, 2008; Walsh, 2008).

#### **4.4. Actividad Antimicrobiana.**

La saliva contiene una gran variedad de agentes con acción antibacteriana y antifúngica, tales como la IgA, IgM, IgG, lisozima, peroxidasa, lactoferrina y aglutininas (Walsh, 2008).

Proteínas como las mucinas, histatinas entre otras, interactúan con los microorganismos e inhiben su crecimiento y adherencia a los tejidos; además, promueven su lisis evitando infecciones bucales (Humphrey y Williamson, 1995; Schipper y col, 2007).

## **5. Saliva como herramienta diagnóstica.**

La saliva ejerce funciones importantes que ayudan al mantenimiento de la salud de la cavidad bucal. En los últimos años este fluido biológico ha aumentado su importancia en el diagnóstico de enfermedades sistémicas y propias de la boca.

Como muestra para el diagnóstico, la saliva presenta ventajas en cuanto a su recolección, almacenamiento, método de obtención no invasivo y fácil de usar, en comparación con el suero y la orina (Llena, 2006; Chiappin y col, 2007; Nieuw y col, 2007; Schipper y col, 2007; Lee y col, 2009)

A su vez, la obtención no invasiva de la muestra de saliva, podría aumentar la disposición de los pacientes a someterse a controles que incrementaría la posibilidad de controlar su salud general (Lee y Wong, 2009).

Los diversos componentes de la saliva le permiten realizar las funciones antes mencionadas (ver apartado 4) dentro de la cavidad bucal. Actualmente, dichos componentes están siendo empleados como marcadores para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades sistémicas y bucales.

La tabla I muestra algunas enfermedades sistémicas en las que se emplea la saliva como alternativa para el diagnóstico o como elemento para monitorear cambios en su composición en personas que padecen determinadas patologías.



**Tabla I-** Empleo de la saliva como muestra diagnóstico o para el monitoreo de sus diversos componentes.

Enfermedad sistémica	Características	Diagnóstico	Referencias
Hepatitis B	Detección de virus de la hepatitis B en saliva.	El virus de la hepatitis B fue detectado en saliva en pacientes con la enfermedad.	Heathcote y col, 1974.
Caries dental	La identificación de factores que puedan ayudar a prevenir o controlar la enfermedad	Detección de la forma soluble de CD14 en niños sin lesiones de caries y ausencia de CD14 en niños con lesiones de caries.	Bergandi y col, 2007.
Caries dental	Factores de Riesgo Cariogénico: Estreptococcus Mutans, Caries por Superficie, $Ca^{+2}$ y $PO_4^{-3}$ Salival en Niños.	No encontraron diferencias estadísticamente significativa entre la concentración de $Ca^{+2}$ y $PO_4^{-3}$ y la caries dental.	Bustos y col, 1999
Cirrosis hepática	Identificación de diferencias buco dental y en la saliva de personas con y sin la enfermedad.	Mayor número de dientes cariados y ausentes, mayor flujo salival estimulado en pacientes con cirrosis hepática.	Bagán y col, 1998.
Cáncer	Efecto de las concentraciones de electrolitos en suero y saliva de pacientes sometidos a radioterapia.	Aumento en la concentración de $Na^+$ , $Cl^-$ , $Ca^{++}$ y $Mg^{++}$ y disminución de la concentración de $HCO_3^-$ en pacientes sometidos a radioterapia.	Dreizen y col, 1976.
Estomatitis	Determinación de la concentración de albúmina en saliva.	Aumento en la concentración de albúmina en saliva en pacientes con estomatitis.	Izutsu y col, 2006.
VPH	Determinación de la concentración de IgA en saliva de mujeres con VHP en la orofaringe.	Bajos niveles en la concentración de IgA fueron asociados con VPH en la orofaringe.	Gonçalves y col, 2006.
Hipertensión	Flujo salival en reposo y en presencia de estímulos en personas con y sin hipertensión	Pacientes con hipertensión padecen de disminución del flujo salival aun en presencia de estímulos.	Rahn y col, 1983.
Asma	Determinar la concentración de $Ca^{2+}$ , $PO_4^{3-}$ e IgE en saliva.	La concentración de $PO_4^{3-}$ e IgE fueron elevadas en personas con asma.	Hyypa, 2005.
Periodontitis	Determinar la concentración de $Ca^{2+}$ y $PO_4^{3-}$ en saliva.	La concentración de $Ca^{2+}$ fue elevada en pacientes con periodontitis.	Hyypa, 2005; Mejía, 2008.
Niveles hormonales	Evaluar la presencia de insulina en saliva.	Detección confiable de los niveles de insulina en saliva.	Fabre y col, 2007.

## **6. Antecedentes.**

Uno de los principales problemas en el estudio de la saliva para el diagnóstico de enfermedades bucales, es la metodología llevada a cabo para la toma de muestra, almacenamiento y procesamiento antes de realizar las mediciones de parámetros como la concentración de iones y proteínas.

Las principales ventajas para el uso de saliva como muestra para el diagnóstico en lugar de sangre, han sido descritas por autores como Ferguson (1987); Mandel (1990) y Malamud (1992); del mismo modo, consideraciones en cuanto a la selección del tipo de saliva, es decir, saliva completa o de una glándula específicamente han sido detalladas por Sreebny y Zhu (1996); los métodos de recolección de la muestra fueron revisados por Navazesh (1993), y los factores fisiológicos que afectan la recolección por Dawes (1993), sin embargo, el uso de saliva como muestra para diagnóstico o investigaciones puede plantear problemas debido a sus complejas propiedades bioquímicas y fisicoquímicas; y a su variabilidad e inestabilidad inherente (Schipper y col, 2007).

En los trabajos en los que se emplea saliva como muestra biológica, investigadores como Jenzano y colaboradores (1986), Gavião y colaboradores (2004), Nieuw y colaboradores (2004) y Heikkinen y colaboradores (2010), emplearon muestras de saliva estimulada por el uso de parafina para sus análisis, sin embargo, no especifican si los pacientes comieron o realizaron algún tipo de higiene bucal antes de la toma de la muestra. Parris y colaboradores (1990), tomaron muestras de saliva estimulada empleando imágenes.

Ruhl y colaboradores (2005), Costa y colaboradores (2009) y Zehetbauer y colaboradores (2009) emplearon muestras de saliva no estimulada y pidieron a los individuos no ingerir ningún tipo de alimento ni realizar ningún tipo de higiene bucal en un tiempo de 1 a 2 horas antes de la toma de la muestra.

Huang (2004) y Bergandi y col. (2007) pidieron a los donantes no comer o beber por un mínimo de 2 horas antes de la toma de la muestra, además estos donantes debían realizar una limpieza dental con cepillo sin pasta dental y emplear agua como enjuague bucal justo antes de la toma de la muestra.

Los investigadores citados coinciden en que al emplear muestras de saliva estimulada o en condición de reposo, éstas deben ser mantenidas en frío, hasta que las mismas sean almacenadas o procesadas. Una vez mantenida la muestra en frío, los mismos difieren en cuanto a la temperatura de almacenamiento y protocolo para el procesamiento de las muestras.

Wan y colaboradores (2003), Ruhl y colaboradores (2005) y Costa y colaboradores (2009), recolectaron muestras de saliva e inmediatamente las almacenaron aproximadamente a  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Carol y colaboradores (2000), igualmente almacenaron las muestras y posteriormente justo antes de analizarlas las centrifugaron a  $12.000\text{ x g}$  durante 10 minutos.

Por el contrario, investigadores como Cowman y colaboradores (1979), Bergandi y colaboradores (2007), Escárte y colaboradores (2008), White y colaboradores (2009) y Pramanik y colaboradores (2010), colectaron muestras de saliva, las centrifugaron y tomaron el sobrenadante para ser almacenado o

analizado. El tiempo que estos investigadores emplearon para la centrifugación va de 5 a 20 minutos y la fuerza de centrifugación varía de 604 a 15.000 x g.

Atkinson y colaboradores (2008), realizaron diversos tratamientos a las muestras de saliva y concluyeron que, entre los diversos métodos con centrifugación sola obtuvieron la mayor concentración de proteínas en comparación con tratamientos como centrifugación y filtración, después de que las muestras fueran congeladas y descongeladas. Ellos ponen de manifiesto la necesidad de validación de las condiciones de recolección de la muestra y tratamiento de la misma antes de realizar los análisis de rutina.

Una vez establecidos algunos parámetros en cuanto a la toma de muestras, procesamiento y almacenamiento de la misma, se puede emplear la saliva como fluido para el diagnóstico y para investigación científica.

Campese y colaboradores (2009), realizaron estudios determinando las concentraciones de histatinas y PRPs en la saliva entera y en la secretada por cada glándula y concluyeron que la saliva entera proporciona un ambiente proteolítico en el que las proteínas son degradadas, lo que explica que las concentraciones de estas proteínas en la saliva entera son mucho más bajas que en las secreciones glandulares.

Los resultados obtenidos por Campese y colaboradores (2009), resaltan la importancia de mantener las muestras de saliva en frío antes y durante su procesamiento, para evitar que la concentración de proteínas disminuya debido a la degradación de las mismas.

Estudios realizados en el laboratorio de Bioquímica y Biología Celular aplicada del Instituto de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, por Escárate y colaboradores (2008), quienes determinaron las concentraciones de  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , proteínas y los perfiles electroforéticos en saliva procedente de niños venezolanos con y sin caries, y por Mejía (2008) quien en su trabajo especial de grado, determinó concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y proteínas totales en saliva de adultos venezolanos con enfermedad periodontal; resaltan la importancia de la saliva como medio de diagnóstico y el establecimiento de estrictos protocolos en la colección, manipulación y procesamiento de las muestras de saliva.

Zehetbauer y colaboradores (2009), realizaron una comparación cualitativa de los perfiles de proteínas salivares entre niños con y sin caries, concluyendo que a pesar de no haber encontrado diferencias significativas entre ambos grupos, la visión general exhaustiva actual de los perfiles de proteínas salivales son muy importantes y suministran una primera base necesaria para los futuros avances en este campo, ayudando a identificar biomarcadores para el reconocimiento temprano de niños en peligro de sufrir caries.

## **II-. Objetivos**

### **1. Objetivo general.**

Estandarizar la toma de muestras de saliva humana y determinar las condiciones adecuadas de tratamiento de las mismas, antes de su utilización para investigación de sus propiedades químicas y bioquímicas en el laboratorio.

### **2. Objetivos específicos.**

- Establecer el tiempo de centrifugación adecuado a una velocidad de 16.000 x g para descartar la mayor cantidad de contaminantes en la saliva.
- Determinar el efecto del tiempo de congelación en las concentraciones de iones  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y proteínas totales en las muestras de saliva humana.
- Establecer si existen diferencias en la concentración y patrón electroforético de proteínas de las muestras centrifugadas y filtradas y las centrifugadas sin filtrar.
- Establecer si existen diferencias respecto al patrón electroforético de proteínas de las muestras tratadas con y sin inhibidores de proteasas.
- Determinar, mediante cromatografía de afinidad, si proteínas de aproximadamente 60 kDa presentes en la saliva, enmascaran la presencia de otras proteínas en los perfiles electroforéticos

### **III-. Materiales y Métodos**

#### **1. Material biológico.**

Se emplearon 51 muestras de saliva humana no estimulada (35 mujeres y 16 hombres), de estudiantes de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, diagnosticados como odontológicamente sanos, con edades comprendidas entre 19 y 33 años. Las muestras fueron proporcionadas por la Dra. María Antonieta Méndez del Postgrado de Periodoncia de la Universidad Central de Venezuela.

#### **2. Obtención de las muestras de saliva.**

Antes de la toma de la muestra, los estudiantes estuvieron al menos una hora sin comer, beber o realizar algún tipo de higiene bucal. La saliva fue colectada en condiciones de reposo, permitiendo que se acumulara en el piso de la boca y posteriormente fue depositada en un vial adecuado, previamente estéril y mantenido en frío. Los viales con aproximadamente 2 mL de muestra fueron transportados al laboratorio en una cava a una temperatura de aproximadamente 4 °C.

#### **3. Determinación del tiempo de centrifugación.**

La determinación del tiempo adecuado para la centrifugación de las muestras de saliva no estimulada se realizó, al comparar la concentración de

proteínas totales presentes en el sobrenadante de la muestra centrifugada por diferentes tiempos y a través del crecimiento de las bacterias presentes en el sobrenadante de la muestra, empleando medio de cultivo líquido.

La muestra de saliva no estimulada depositada en el vial, fue separada en tres alícuotas de 500  $\mu\text{L}$ , las cuales fueron centrifugadas en una centrifuga Eppendorf<sup>®</sup> a 16.000 x g a 4 °C durante 5, 10 ó 15 minutos. Una vez centrifugadas las alícuotas se almacenó el sobrenadante a -20 °C y se descartó el sedimento.

#### **4. Filtración de las muestras de saliva.**

La filtración del sobrenadante de las muestras de saliva no estimulada se realizó empleando filtros para jeringa, los cuales poseen un poro de 0,20 micras.

La muestra de saliva no estimulada fue separada en tres alícuotas de 500  $\mu\text{L}$ . La primera alícuota fue mantenida a 4 °C y no se centrifugó, la segunda y tercera alícuota fueron centrifugadas en una centrifuga Eppendorf<sup>®</sup> a 16.000 x g a 4 °C durante 10 min, después de la centrifugación se conservó el sobrenadante y se descartó el sedimento. El sobrenadante de la segunda alícuota fue mantenido a 4 °C y el sobrenadante de la tercera alícuota fue filtrado en condiciones estériles. El filtrado fue mantenido a 4 °C.

Posteriormente las alícuotas ya tratadas como se explicó anteriormente son sembradas en medio de cultivo, se determinó la concentración de proteínas totales y se analizó su perfil electroforético.



## **5. Cultivo de bacterias presentes en las muestras de saliva.**

Para el cultivo de las bacterias presentes en las muestras de saliva se empleó el medio de cultivo líquido Soyabean Casein Digest Medium M011 (HiMedia<sup>®</sup>), el cual es un medio de uso general empleado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos.

Se tomaron 20  $\mu$ L de la muestra y se colocaron en un tubo de ensayo que contenía 3 mL de medio de cultivo estéril. Una vez colocada la muestra, el tubo es tapado y mantenido aproximadamente a 30 °C. Este protocolo se realizó el mismo día de la recolección de la muestra.

## **6. Determinación de la concentración de proteínas totales.**

La concentración de proteínas totales en las muestras de saliva fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951). Se realizó una curva de calibración empleando albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL.

La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro (Beckman<sup>®</sup> DU-600), a una longitud de onda de 660 nm.

## **7. Determinación de $\text{PO}_4^{3-}$ .**

La determinación de  $\text{PO}_4^{3-}$  en las muestras de saliva se realizó empleando el método colorimétrico de Fiske y Subbarow (1925).

Brevemente, el sobrenadante de la muestra de saliva almacenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fue diluido 1:20 en agua destilada. Se le agregaron  $700\text{ }\mu\text{L}$  de molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ) y se inició la reacción colorimétrica al añadir  $100\text{ }\mu\text{L}$  de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) 40% p/v en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1N), se agitó y se dejó en reposo por 30 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de  $830\text{ nm}$  en un espectrofotómetro (Beckman<sup>®</sup> DU-600).

Se realizó una curva de calibración con estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en concentraciones crecientes.

## **8. Determinación de $\text{Ca}^{2+}$ .**

La determinación de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizó mediante el uso del cromógeno o-cresolftaleína complexona según el método de Connerty y Briggs (1966), adaptado para saliva en el laboratorio Bioquímica y Biología Celular aplicada del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (Resultados no publicados).

Se prepararon  $5\text{ mL}$  de mezcla de trabajo que contiene tampón etanolamina-borato ( $14,8\text{ M}$ ), 8-Hidroxiquinoleína ( $5\text{ }\%$  p/v) y o-cresolftaleína-complexona ( $0,8\text{ mg/mL}$ ), en proporción 2,5:0,75:2,5. Se colocaron  $198\text{ }\mu\text{L}$  de la mezcla de trabajo y se añadieron  $2\text{ }\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra de saliva, en placas de 96 pozos. Se incubó por 5 minutos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Tecan<sup>®</sup> modelo IP 214 a una longitud de  $570\text{ nm}$ . Se realizó una curva de calibración empleando  $\text{CaCO}_3$  como solución patrón.

## **9. Estabilidad de las muestras.**

Para determinar el efecto del tiempo de congelación en la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y proteínas totales en el sobrenadante de las muestras de saliva se empleó el método de Fiske y Subbarow (1925), el método de Connerty y Briggs (1966) y el método de Lowry y col. (1951), respectivamente.

Las muestras de saliva fueron centrifugadas en una centrifuga Eppendorf® a 16.000 x g a 4 °C durante 10 minutos, luego de la centrifugación se descartó el sedimento y el sobrenadante fue separado en 6 alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  en tubos Eppendorf®.

Las alícuotas fueron nombradas (0, 1, 5, 15, 20 y 25) de acuerdo al día (día 0, 1, 5, 15, 20 y 25) en que serían empleadas para realizar la determinación de la concentración de iones  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y proteínas totales.

El día que las muestras fueron colectadas (día 0), se empleó la alícuota 0 para la determinación de la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y proteínas totales. El resto de las alícuotas fueron almacenadas a -20 °C y cada una fue descongelada el día correspondiente (día 1, 5, 15, 20 y 25) para la determinación de los distintos parámetros.

## **10. Empleo de una mezcla de inhibidores de proteasas.**

Se empleó una mezcla de inhibidores de proteasas P2714 de uso general de la marca Sigma-Aldrich® que contiene los inhibidores AEBSF, Aprotinin, Bestatin, EDTA, E-64 y Leupeptin.

Una vez colectada la muestra, la misma fue separada en 2 alícuotas de 1 mL. Una de las alícuotas fue mezclada con 10  $\mu$ L de la mezcla de inhibidores. Ambas alícuotas fueron mantenidas a 4 °C hasta llegar al laboratorio donde fueron centrifugadas a 16.000 x g a 4 °C durante 10 minutos en una centrifuga Eppendorf®, se descartó el sedimento y el sobrenadante se empleó para la determinación de la concentración de proteínas totales y el análisis del patrón electroforético.

#### **11. Cromatografía para la extracción de proteínas de la muestra de saliva.**

Para extraer de la muestra proteínas de aproximadamente 60 kDa se empleó el “Protein Enrichment Kit” de Bio-Rad® a fin de determinar si estas proteínas solapan en el perfil electroforético de otras proteínas presentes en la saliva, que puedan resultar de interés y cuya masa molecular sea aproximadamente 60 kDa.

La matriz de la cromatografía, viene en tubo Eppendorf® y será denominado columna. La columna, se preparó empleando tampón de lavado y centrifugación (1.000 x g durante 30-60 s). Se empleó un *pool* con 200  $\mu$ L del sobrenadante de 6 muestras de saliva previamente centrifugada, ya que la muestra debe estar libre de sedimento. Se tomaron 400  $\mu$ L del *pool*, se colocaron en la columna, se centrifugó a 1.000 x g durante 30-60 s, el eluato obtenido después de la centrifugación se denominó E1 y se almacenó para analizar su perfil electroforético.

Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado a la columna y se centrifugó a 1.000 x g durante 30-60 s, este paso de lavado se realizó tres veces. Finalmente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se centrifugó a 1.000 x g durante 30-60 s, se descartó el agua y se agregaron 20  $\mu\text{L}$  reactivo de elución rehidratado, se centrifugó a 1.000 x g durante 30-60 s, la elución (E2) contenía las proteínas.

Se empleó el eluato (E2) obtenido en una electroforesis en condiciones disociantes en gel de poliacrilamida a fin de analizar su perfil electroforético.

## **12. Electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE).**

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó según el método descrito por Laemmli (1970). El gel de separación empleado fue realizado con una solución madre (acrilamida 30 % y bisacrilamida 0,8 %) en concentración en gradiente de 10 a 20 %. Se emplearon geles de 16x14 cm, 13x14 cm y 9x6 cm. La separación electroforética se realizó a un voltaje constante de 60 V por 18 horas.

### **12.1. Preparación de las muestras para la electroforesis.**

Las muestras de saliva fueron preparadas para realizar geles de poliacrilamida fueron coloreados con diferentes tinciones. Un gel será teñido en azul de Coomassie R250 y otro gel fue teñido con nitrato de plata ( $\text{Ag}_2\text{NO}_3$ ).

### **12.1.1. Preparación de las muestras para la tinción en azul de Coomassie R250.**

El sobrenadante de la muestra de saliva almacenado a -20 °C fue descongelado y se tomó un volumen que contiene 300 µg de proteínas totales (el volumen se tomó de acuerdo a la concentración de proteínas determinada anteriormente, ver apartado 6). Se mezcló con un volumen equivalente de ácido tricloro acético (TCA) al 20 % p/v para la precipitación de las proteínas, se centrifugó durante 5 minutos a 16.000 x g a 4 °C en una centrifuga Eppendorf®, se descartó el sobrenadante y el sedimento se neutralizó con 5 µL de Tris 3M. Posteriormente las proteínas fueron resuspendidas en tampón de carga (Tris-HCl a pH 6,8; SDS al 8 % p/v; glicerol al 40 % p/v; 2-β-mercaptoetanol al 4 % v/v; azul de bromofenol al 0,01 % p/v). Las proteínas resuspendidas fueron calentadas a 90 °C durante 5 minutos y posteriormente fueron cargadas en el gel.

### **12.1.2. Preparación de las muestras para la tinción en nitrato de plata (Ag<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>).**

Se tomó un volumen equivalente a 60 µg de proteínas totales de acuerdo a la concentración de proteínas determinada anteriormente (ver apartado 6) y se llevó a un volumen final de 50 µL con tampón de carga, esta mezcla fue calentada a 90 °C durante 5 minutos y posteriormente fue cargada en el gel.

## **12.2. Tinción en azul de Coomassie R250.**

El gel se colocó en solución de azul de Coomassie R250 (azul de Coomassie R250 al 0,1 % p/v; ácido acético glacial y metanol), por un tiempo mínimo de una hora en agitación constante. Posteriormente se destiñó el gel lavándolo sucesivamente con solución descolorante (metanol 50 % y de ácido acético 10 %) se hicieron cambios cada 20 min hasta obtener la intensidad de bandas deseadas, luego el gel fue colocado en solución conservadora que contiene agua y 5 % de glicerol, y finalmente fue escaneado.

## **12.3. Tinción de plata para el gel de Electroforesis.**

La Tinción de plata para el gel de electroforesis se realizó según el método de Merrill y col. (1982).

El gel se colocó en solución fijadora que contiene ácido tricloro acético al 20 % durante 30 minutos, posteriormente fue lavado tres veces con una solución que contiene etanol 10 % y ácido acético 5 %, cada lavado se realizó durante 10 minutos, luego del tercer lavado se agregó solución A que contiene dicromato de potasio y ácido nítrico y se mantuvo en ella durante 5 minutos. Luego se lavó 4 veces con agua desionizada un minuto por vez y se le agregó la solución B durante 30 minutos, esta solución contiene nitrato de plata. Posteriormente se transfirió el gel a una bandeja con agua desionizada por 3 minutos, luego se le agregó solución C que contiene carbonato de sodio y formaldehído, se mantuvo en esta solución hasta obtener la intensidad de bandas deseada y finalmente se detuvo la reacción con ácido acético al 1 %, se mantuvo el gel en solución conservadora y se escaneó.

### **13. Análisis estadístico.**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, que se emplea en modelos experimentales con tres o más grupos. Se determinó si existían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las concentraciones de proteínas totales de muestras de saliva a las que se les aplicaron diversos tratamientos.

En los casos en que la variación en la concentración de proteínas totales de los diferentes grupos no fue significativa ( $p > 0,05$ ) se realizó la prueba estadística de Fisher que se emplea para comparar entre dos grupos.

En la prueba de Fisher  $p < 0,05$  refleja diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de proteínas totales.

Para los análisis estadísticos se empleó el programa portátil Statistica versión 8.0.



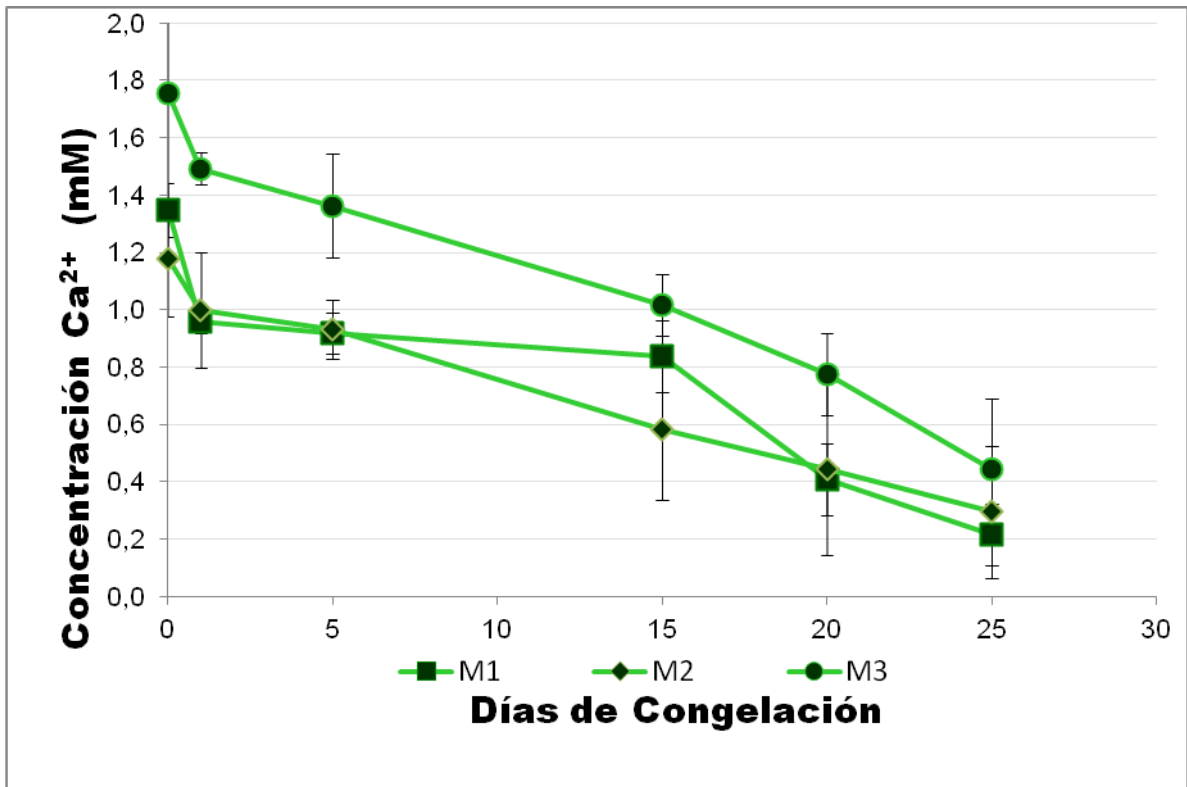
## **IV-. Resultados**

### **1. Estabilidad de las muestras de saliva humana no estimulada.**

Se tomaron 3 muestras de saliva, las cuales fueron separadas en 6 alícuotas, cada una de las alícuotas fue descongelada sólo el día en que se le realizaron las determinaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y proteínas totales. Cada determinación se hizo por triplicado y los resultados que se presentan corresponden a los promedios de cada alícuota.

#### **1.1. Estabilidad de las concentraciones de $\text{Ca}^{2+}$ en muestras de saliva.**

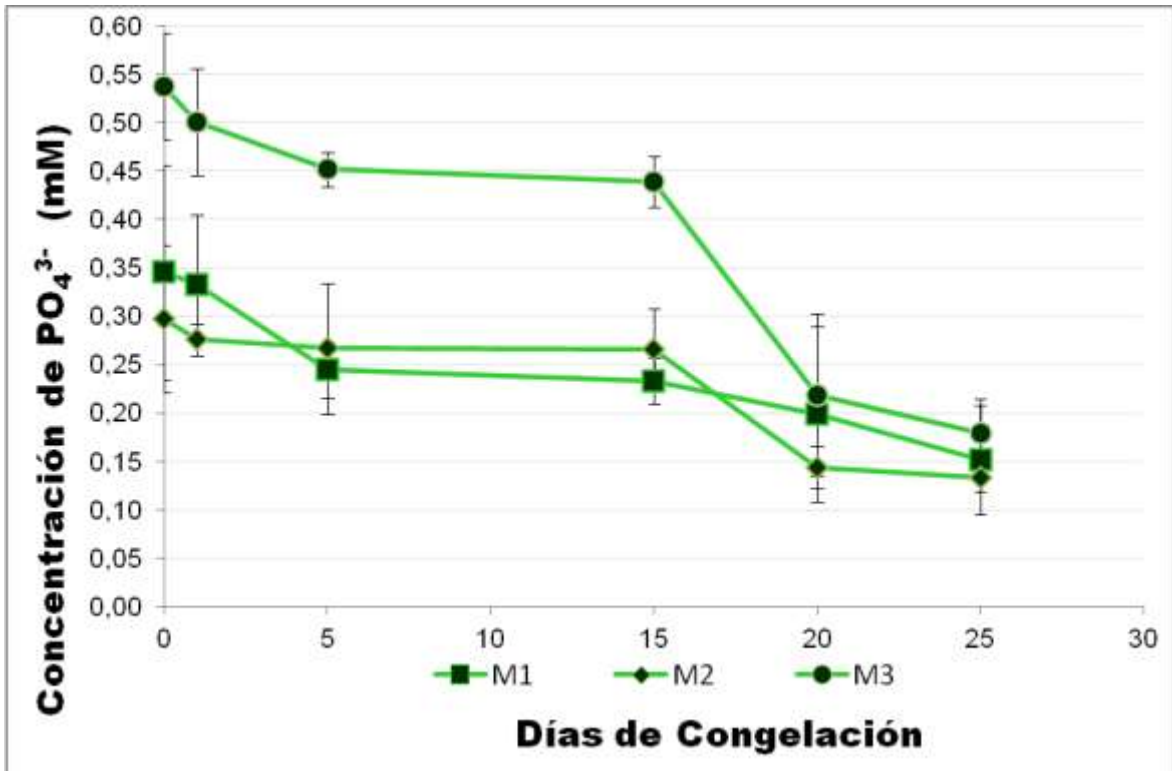
En la figura 3 se observan los promedios de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de tres muestras, determinadas por el método modificado de Connerty y Briggs (1966). Se encontró una disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  con el aumento de los días de congelación de la muestra. La mayor concentración en los sobrenadantes de la saliva, se registró el día de la toma de la muestra (sin congelar) y la menor a los 25 días de congelación.



**Figura 3-. Determinación de la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  en muestras de saliva humana.** Se muestran las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de tres muestras M1 (muestra 1), M2 (muestra 2) y M3 (muestra 3)  $\pm$  la desviación estándar. La determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  fue realizada por triplicado para cada muestra, empleando el método de Connerty y Briggs (1966).

## 1.2. Estabilidad de las concentraciones de $\text{PO}_4^{3-}$ en muestras de saliva.

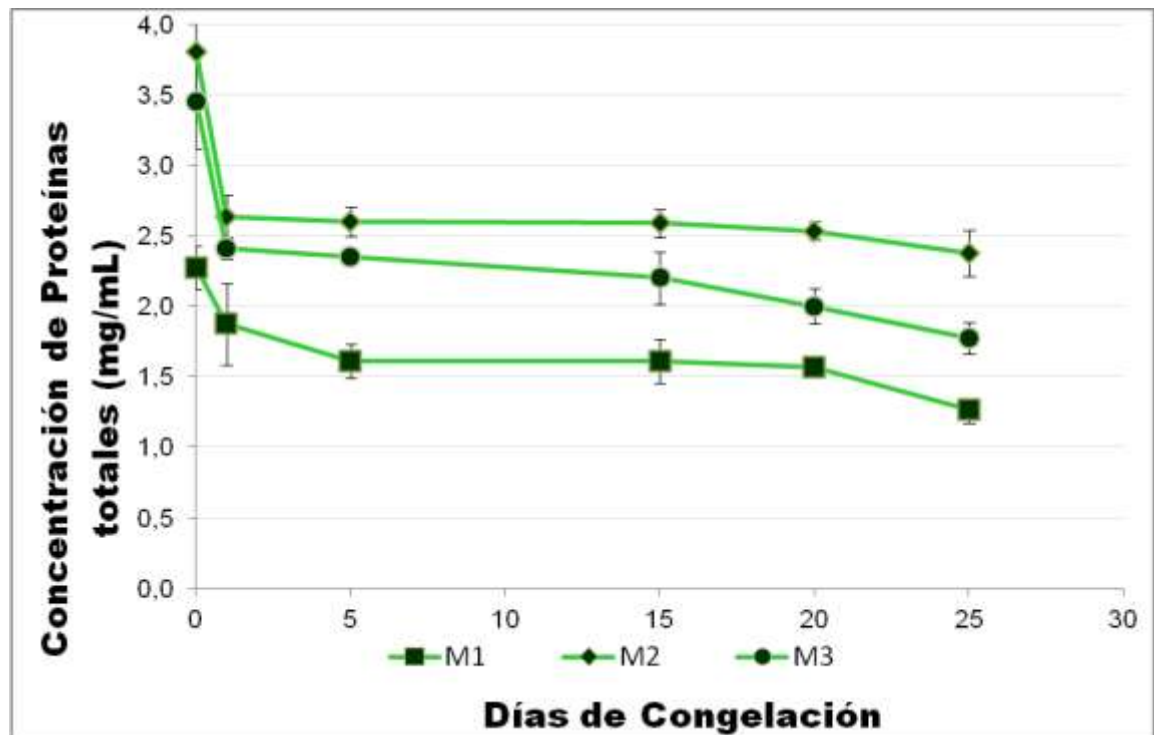
La concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  en las muestra de saliva fue determinada empleando el método de Fiske y Subbarow (1925). La figura 4 muestra la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  de cada muestra, cada uno de los días en que fue realizada la determinación. Se observa variabilidad de la concentración entre las muestras, sin embargo, las concentraciones de  $\text{PO}_4^{3-}$  disminuyen en las tres muestras empleadas al aumentar el tiempo de congelación.



**Figura 4.- Determinación de la concentración  $\text{PO}_4^{3-}$  en muestras de saliva humana.** Se representan las muestras M1 (muestra 1), M2 (muestra 2) y M3 (muestra 3) que fueron empleadas en el ensayo de estabilidad de la muestra  $\pm$  la desviación estándar. La determinación de  $\text{PO}_4^{3-}$  se realizó por triplicado para cada muestra, empleando el método de Fiske y Subbarow (1925).

### 1.3. Estabilidad de las concentraciones de proteínas totales en muestras de saliva.

Empleando el método de Lowry (1951) se determinó la concentración de proteínas totales en las muestras de saliva. En la figura 5 se observan los promedios de las concentraciones de proteínas totales presentes en las muestras de saliva. Con el aumento de los días de congelación la concentración de proteínas totales en todas las muestras disminuye.



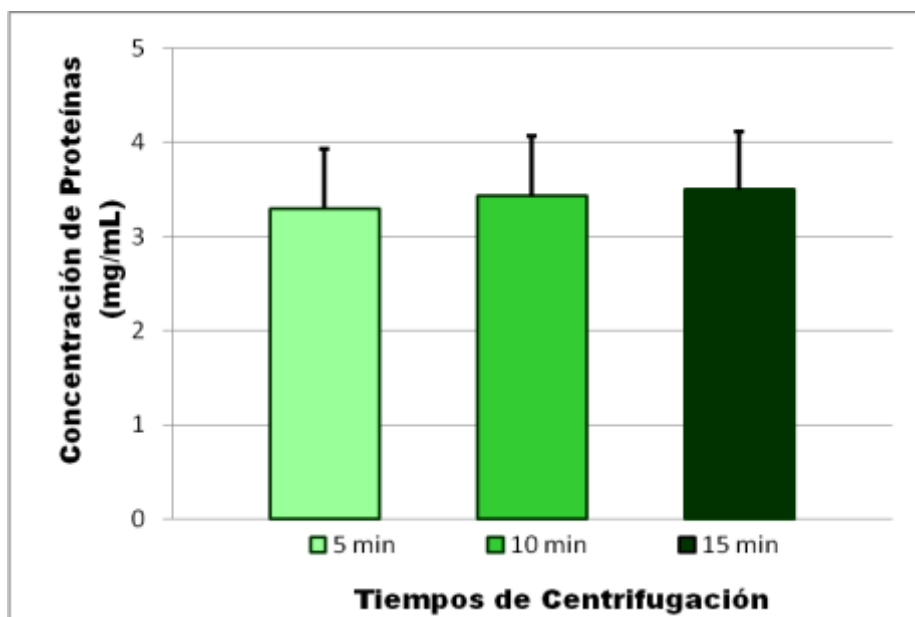
**Figura 5.- Determinación de la concentración de proteínas totales en muestras de saliva humana.** Se muestra la concentración de proteínas totales de las muestras M1 (muestra 1), M2 (muestra 2) y M3 (muestra 3) empleadas en el ensayo de estabilidad de las muestras,  $\pm$  la desviación estándar. La determinación de proteínas se realizó por triplicado para cada muestra, empleando el método de Lowry y col. (1951).

## 2. Determinación del tiempo de centrifugación adecuado.

Se determinó la concentración de proteínas en 10 muestras de saliva cada una separada en tres alícuotas y tras ser centrifugadas a una velocidad constante de  $16.000 \times g$  y por tiempos de 5, 10 ó 15 minutos. El sobrenadante de las muestras fue colocado en medio de cultivo.

### 2.1. Concentración de proteínas totales en el sobrenadante de saliva centrifugada por diferentes tiempos.

La determinación de proteínas totales en saliva se realizó en 10 muestras para cada tratamiento, por el método colorimétrico de Lowry y col. (1951). La figura 6 corresponde a la concentración promedio de proteínas totales de las muestras para cada tratamiento.



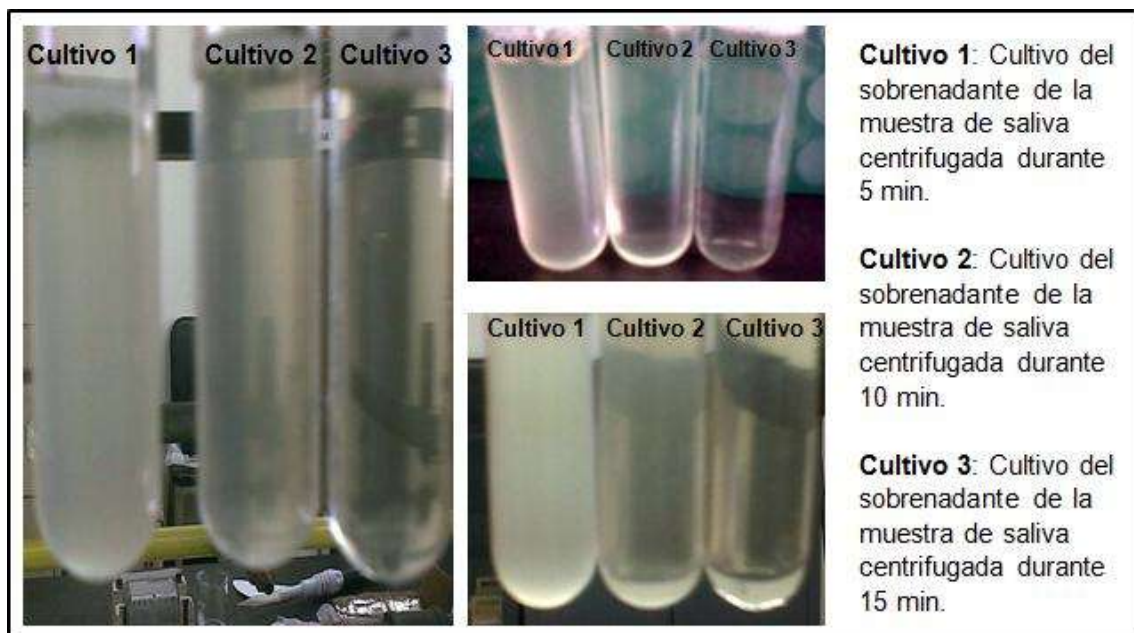
**Figura 6-. Determinación de proteínas totales en saliva de adultos sanos centrifugada durante diferentes tiempos.** Cada barra representa el promedio de la concentración de proteínas totales (mg/mL) en el sobrenadante de las muestras de salivas  $\pm$  la desviación estándar, obtenida a diferentes tiempos de centrifugación (5, 10 y 15 minutos). La determinación de proteínas se realizó por triplicado para cada muestra y empleando el método de Lowry y col. (1951).  $n=10$  para cada tiempo de centrifugación.

Las concentraciones de proteínas en las muestras que fueron centrifugadas sólo por 5 minutos fue de  $3,30 \pm 0,63$  mg/mL, otra alícuota de estas muestras fue centrifugada durante 10 minutos y la concentración de proteínas fue de  $3,43 \pm 0,64$  mg/mL, una tercera alícuota fue centrifugada durante 15 minutos y la concentración de proteínas fue de  $3,50 \pm 0,61$  mg/mL.

Las diferencias entre la concentración de proteínas de los tres grupos no fueron significativas ( $p > 0,05$ ) de acuerdo con el análisis de varianza. En la prueba de Fisher al comparar los grupos de dos en dos, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

## 2.2. Cultivo del sobrenadante de saliva de adultos sanos centrifugada por diferentes tiempos.

El sobrenadante de 8 muestras centrifugadas por diferentes tiempos fue colocado en medio de cultivo líquido. La figura 7 corresponde al crecimiento de bacterias presentes en el sobrenadante de las muestras de saliva en el medio de cultivo. Se observa menor turbidez del medio de cultivo al aumentar el tiempo de cultivo. Se observa menor turbidez del medio de cultivo al aumentar el tiempo de centrifugación de la muestra aun cuando los cultivos fueron realizados al mismo tiempo.



**Figura 7.- Crecimiento bacteriano en sobrenadante de saliva centrifugada durante diferentes tiempos.** Cultivo de 20  $\mu$ L de sobrenadante de las muestras de saliva centrifugadas durante 5, 10 y 15 minutos, en medio de cultivo líquido. Se muestra el crecimiento bacteriano de 3 muestras para cada tiempo de centrifugación.

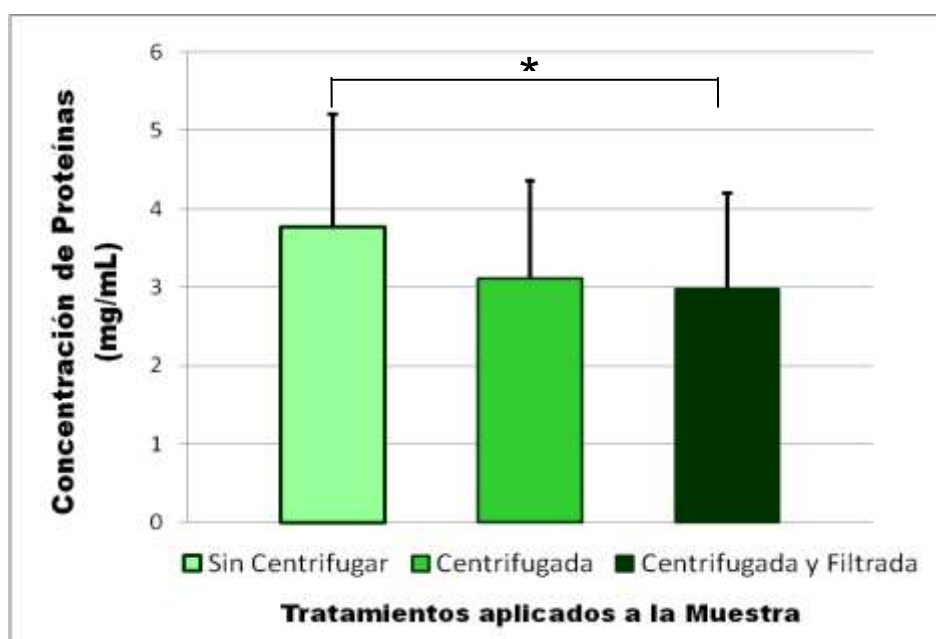
## 3. Centrifugación y Filtración de las muestras.

Se tomaron 22 muestras de saliva y cada una fue separada en tres alícuotas; la primera alícuota fue mantenida a 4 °C y no fue centrifugada, la segunda y tercera alícuota fueron centrifugadas en una centrifuga Eppendorf® a

16.000 x g a 4 °C durante 10 min, el sobrenadante de la tercera alícuota fue filtrado. Posteriormente a cada alícuota se le determinó la concentración de proteínas totales, fueron colocadas en medio de cultivo y se analizó su perfil electroforético.

### 3.1. Concentración de proteínas totales en la muestra sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada.

La concentración de proteínas totales en saliva fue determinada por el método colorimétrico de Lowry y col. (1951). La figura 8 muestra el promedio de la concentración de proteínas totales de las alícuotas que no fueron centrifugadas, las que si fueron centrifugadas y las alícuotas que fueron centrifugadas y cuyo sobrenadante fue posteriormente filtrado.



**Figura 8-. Determinación de proteínas totales en muestras de saliva sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada.** Cada barra representa el promedio de la concentración de proteínas totales (mg/mL) en el sobrenadante de las muestras de salivas  $\pm$  la desviación estándar, obtenida a diferentes tratamientos (sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada). La determinación de proteínas se realizó por triplicado para cada muestra y empleando el método de Lowry y col. (1951). n=22 para cada tratamiento.

\* Prueba de Fisher  $p < 0,05$ .

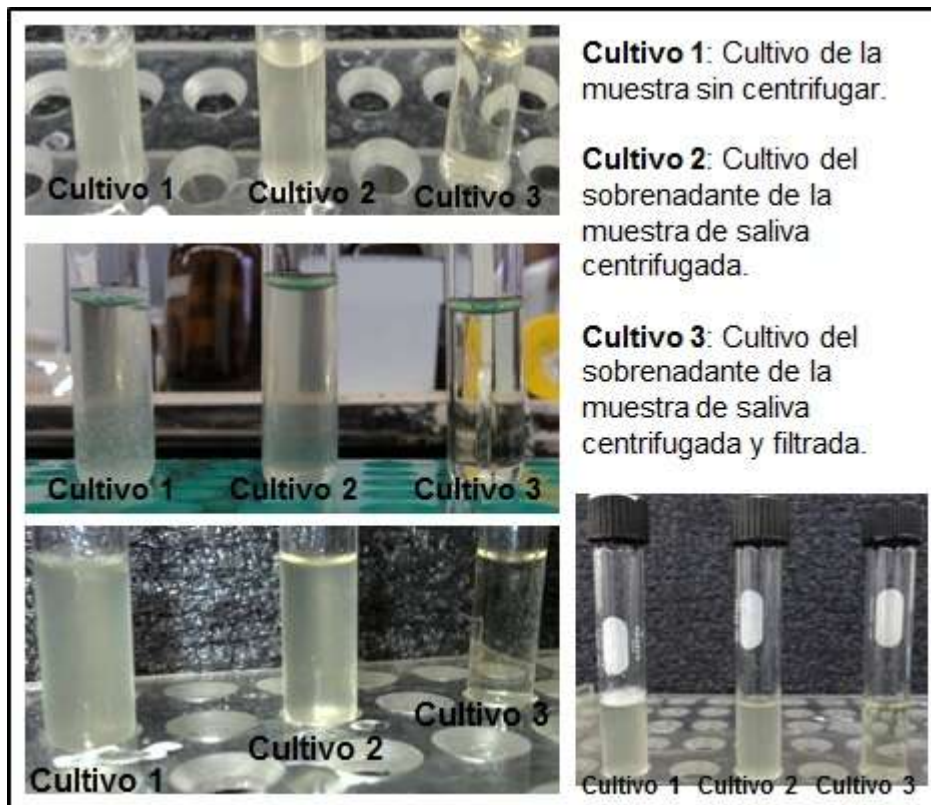
El promedio de la concentración de proteínas totales de las alícuotas que no recibieron ningún tratamiento fue  $4,04 \pm 1,46$  mg/mL; el del sobrenadante de las alícuotas que fueron centrifugadas fue  $3,21 \pm 1,33$  mg/mL y el de las proteínas totales que contenía el filtrado del sobrenadante de la tercera alícuota fue de  $3,06 \pm 1,32$  mg/mL.

El promedio de las concentraciones de proteínas totales entre los tres grupos no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), de acuerdo con el análisis de varianza. En la prueba de Fisher al comparar el promedio de la concentración de proteínas totales en las muestras sin centrifugar con la concentración de las centrifugadas y las centrifugadas con las centrifugadas y filtradas, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Al comparar la concentración de proteínas de las muestras sin centrifugar con las centrifugadas y filtradas sí se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), siendo menor la concentración en las muestras centrifugadas y filtradas.

### **3.2. Cultivo del sobrenadante de muestras de saliva sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada.**

Se realizó el cultivo de las muestras de saliva sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada en medio de cultivo líquido. En la figura 9 se observa la turbidez del medio indica el crecimiento de bacterias presentes en la alícuota que no fue centrifugada (saliva completa) y en el sobrenadante de la alícuota centrifugada. En el cultivo de la alícuota que fue centrifugada y cuyo sobrenadante fue filtrado no se observó crecimiento de bacterias, ya que el medio se observa sin turbidez.





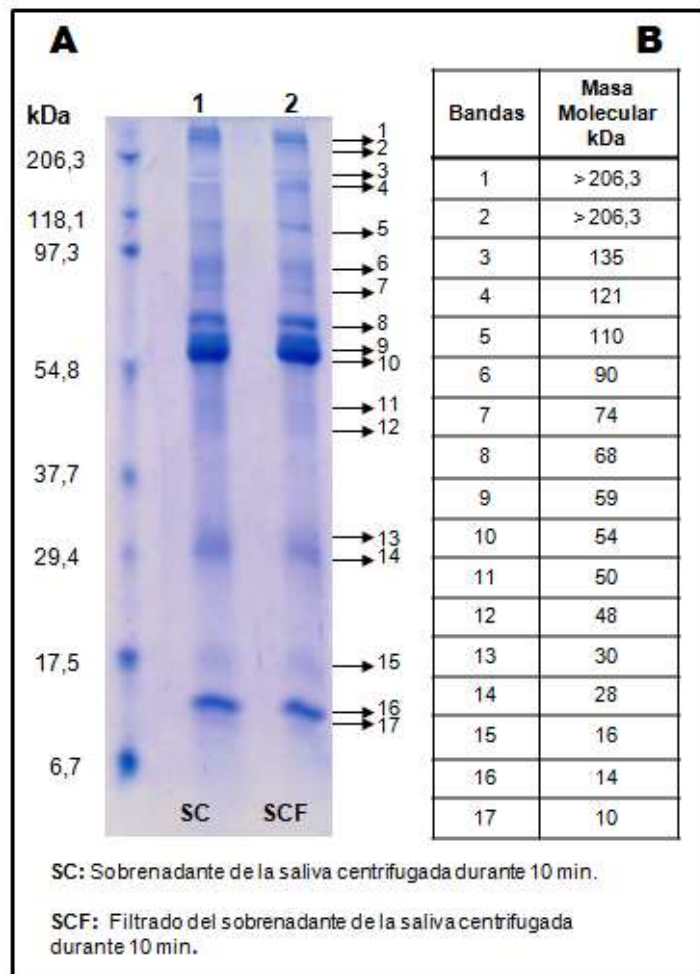
**Figura 9.- Crecimiento bacteriano en sobrenadante de saliva sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada..** Cultivo de 20  $\mu$ L de muestras de saliva sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada, en medio de cultivo líquido. Se muestra el crecimiento bacteriano de 4 muestras para cada tratamiento.

### **3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes de muestras de saliva sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada.**

Con el propósito de establecer si existen o no diferencias en cuanto al patrón de proteínas de las muestras de saliva centrifugada y centrifugada y filtrada se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida.

La figura 10 representa un gel en gradiente de acrilamida teñido con azul de Coomassie R250. Se muestra el patrón de proteínas correspondiente al sobrenadante de una muestra de saliva centrifugada durante 10 minutos (carril 1)

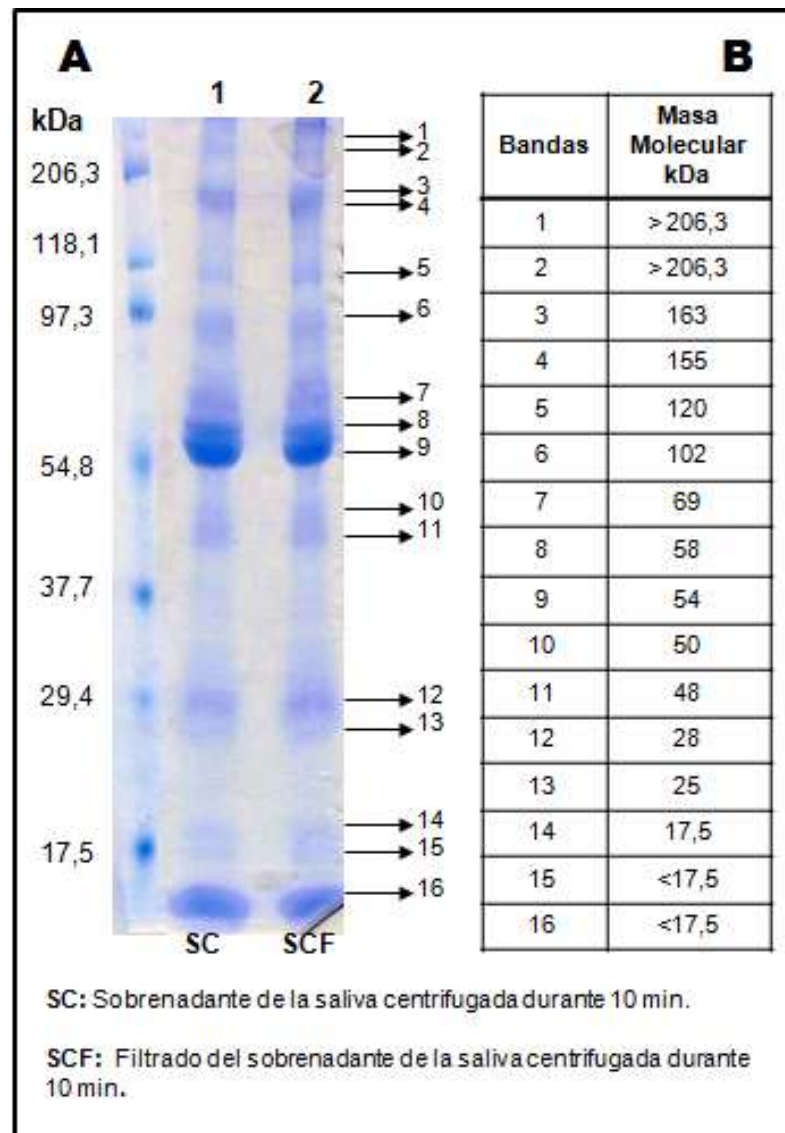
y una alícuota de la misma muestra que fue filtrada con filtros para jeringas de 0,20 micras (carril 2).



**Figura 10-. Perfil electroforético de muestras de saliva centrifugada y filtrada.** Gel de electroforesis en condiciones disociantes (13x14 cm) de poliacrilamida en gradiente de 10 a 20% teñido con azul de coomasie. Panel A: Perfil electroforético del sobrenadante de la saliva humana (carril 1) y del sobrenadante de la saliva filtrado (carril 2), a la izquierda se observa el estándar de masa molecular (kDa). Panel B: Tabla con las masas moleculares aproximadas de las 17 bandas indicadas y numeradas en A.

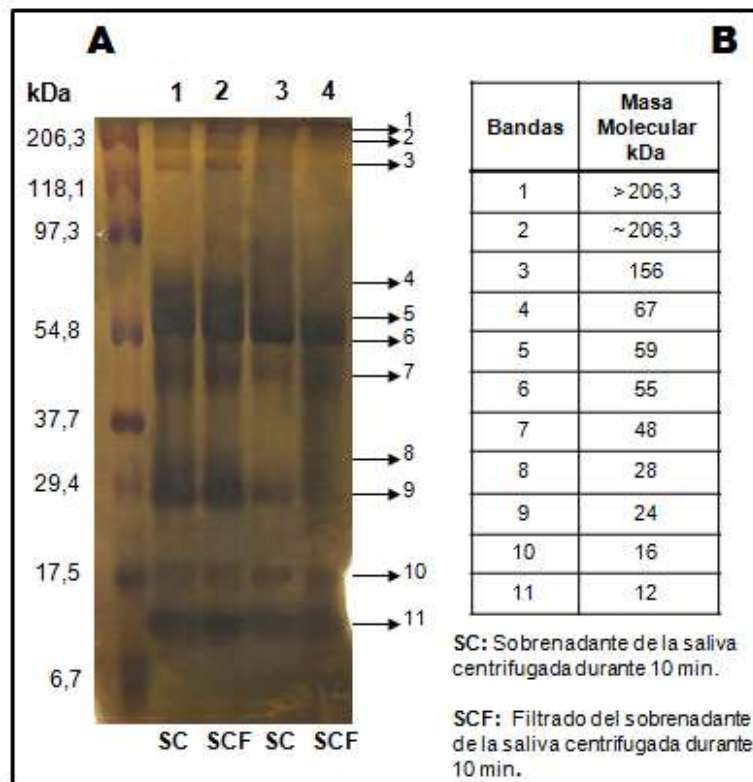
Se distinguieron 17 bandas las cuales fueron numeradas. El tamaño correspondiente a cada banda se muestra en la tabla que se muestra en la figura 10. Se observa el mismo número de bandas en ambos carriles a pesar de que la muestra recibió diferentes tratamientos. Las bandas 4, 5, y 6 se observaron un poco más intensas y definidas en el sobrenadante de la saliva que fue filtrado.

La figura 11 muestra un gel en gradiente de acrilamida teñido con azul de Coomassie R250. En el carril 1 se encuentra el sobrenadante de una muestra de saliva centrifugada durante 10 minutos y en el carril 2 una alícuota de la misma muestra cuyo sobrenadante producto de la centrifugación fue filtrado. En este gel se observaron 16 bandas, las bandas 1, 2, 3, 4, 5 y 13 se observan más intensas en el carril 2, cuando el sobrenadante de la muestra es filtrado.



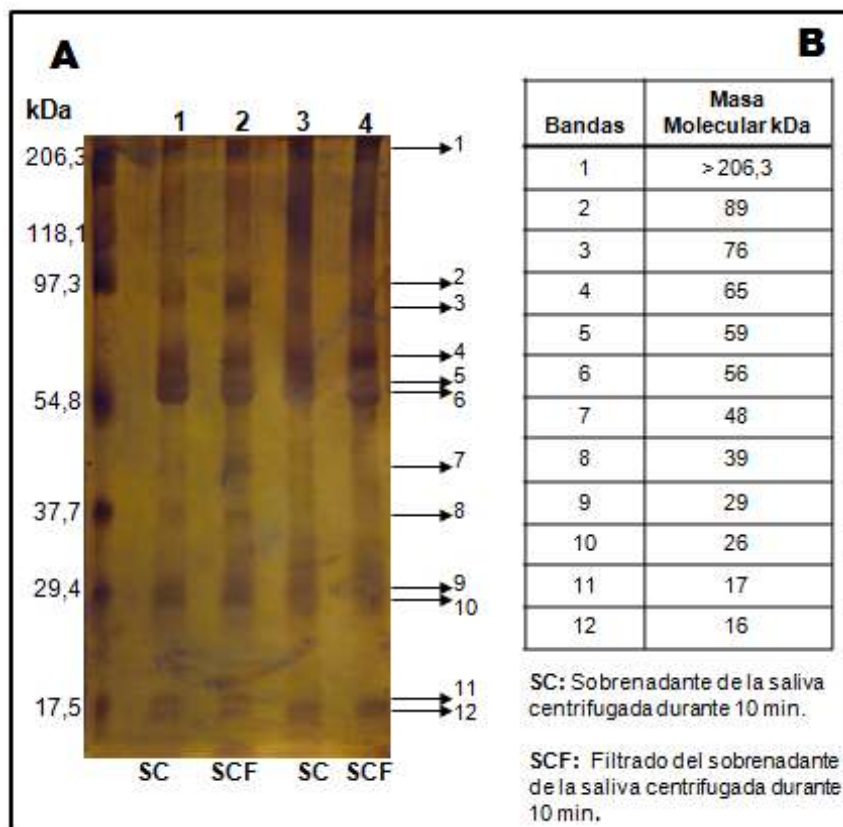
**Figura 11-. Perfil electroforético de muestras de saliva centrifugada y centrifugada y filtrada.** Gel de electroforesis en condiciones disociantes en gel (13x14 cm) de poli-acrilamida en gradiente de 10 a 20% teñido con azul de coomasie. Panel A: Perfil electroforético del sobrenadante de la saliva humana (carril 1) y del sobrenadante de la saliva filtrado (carril 2), a la izquierda se observa el estándar de masa molecular (kDa). Panel B: Tabla con las masas moleculares aproximadas de las 16 bandas indicadas y numeradas en A.

El perfil electroforético de las muestras de saliva que fueron centrifugadas y centrifugadas y filtradas, fue visualizado empleando la tinción de plata según el método de Merrill y col, (1982). En las figuras 12 y 13 se observa el patrón de proteínas del sobrenadante de la saliva centrifugada (carriles 1 y 3) y el filtrado del sobrenadante de una alícuota de la muestra que fue centrifugada (carriles 2 y 4).



**Figura 12- Perfil electroforético de muestras de saliva centrifugada y centrifugada y filtrada.** Gel de electroforesis en condiciones disociantes en gel (16x14 cm) de poliacrilamida en gradiente de 10 a 20% teñido con plata. Panel A: Perfil electroforético del sobrenadante de la saliva humana (carril 1 y 3) y del sobrenadante de la saliva filtrado (carril 2 y 4), a la izquierda se observa el estándar de masa molecular (kDa). Panel B: Tabla con las masas moleculares aproximadas de las 11 bandas indicadas y numeradas en A.

En las figuras 12 y 13, los carriles 1 y 2, y 3 y 4 presentan patrones similares de bandas aunque las alícuotas difieren en los tratamientos recibidos. Se observa el mismo número de bandas al comparar los carriles 1 con 2 y 3 con 4 en ambas figuras (figura 12 y 13).



**Figura 13-. Perfil electroforético de muestras de saliva centrifugada y centrifugada y filtrada.** Gel de electroforesis en condiciones disociantes en gel (13x14 cm) de poliacrilamida en gradiente de 10 a 20% teñido con plata. Panel A: Perfil electroforético del sobrenadante de la saliva humana (carril 1 y 3) y del sobrenadante de la saliva filtrado (carril 2 y 4), a la izquierda se observa el estándar de masa molecular (kDa). Panel B: Tabla con las masas moleculares aproximadas de las 12 bandas indicadas y numeradas en A.

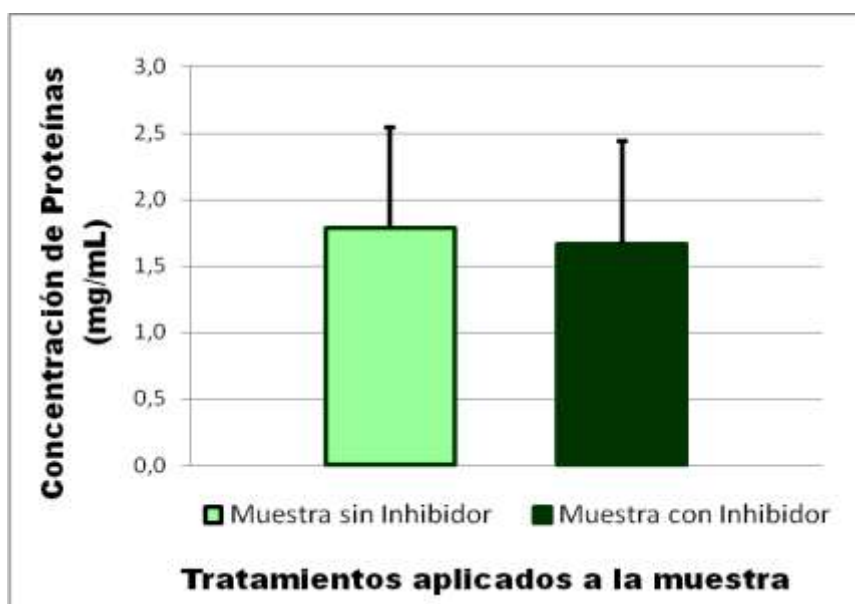
#### 4. Empleo de una mezcla de inhibidores de proteasas.

Se tomaron 10 muestras de saliva y cada una fue separada en dos alícuotas al momento de la recolección. La primera alícuota fue mantenida a 4 °C y a la segunda alícuota se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas que contiene AEBSF, Aprotinin, Bestatin, EDTA, E-64 y Leupeptin, igualmente fue mantenida a 4 °C. Posteriormente ambas alícuotas fueron centrifugadas y a cada alícuota se le determinó la concentración de proteínas totales.

#### 4.1. Concentración de proteínas totales en la muestra con y sin inhibidor de proteasas.

La concentración de proteínas totales en saliva fue determinada por el método colorimétrico de Lowry y col. (1951). En la figura 14 se observa el promedio de la concentración de proteínas totales de las alícuotas que no contenían y de las que si contenían la mezcla de inhibidores de proteasas.

El promedio de la concentración de proteínas totales de las alícuotas que no contenían inhibidores de proteasas fue  $1,79 \pm 0,75$  mg/mL y el promedio de proteínas totales de las alícuotas que contenían la mezcla de inhibidores de proteasas fue de  $1,66 \pm 0,78$  mg/mL.



**Figura 14-. Determinación de proteínas totales en muestras de saliva humana con y sin mezcla de inhibidores de proteasas.** Cada barra representa el promedio de la concentración de proteínas totales (mg/mL) en el sobrenadante de las muestras de saliva  $\pm$  la desviación estándar, obtenida a diferentes tratamientos (sin mezcla de inhibidores y con mezcla de inhibidores). La determinación de proteínas se realizó por triplicado para cada muestra y empleando el método de Lowry y col. (1951).  $n=10$  para cada tratamiento.

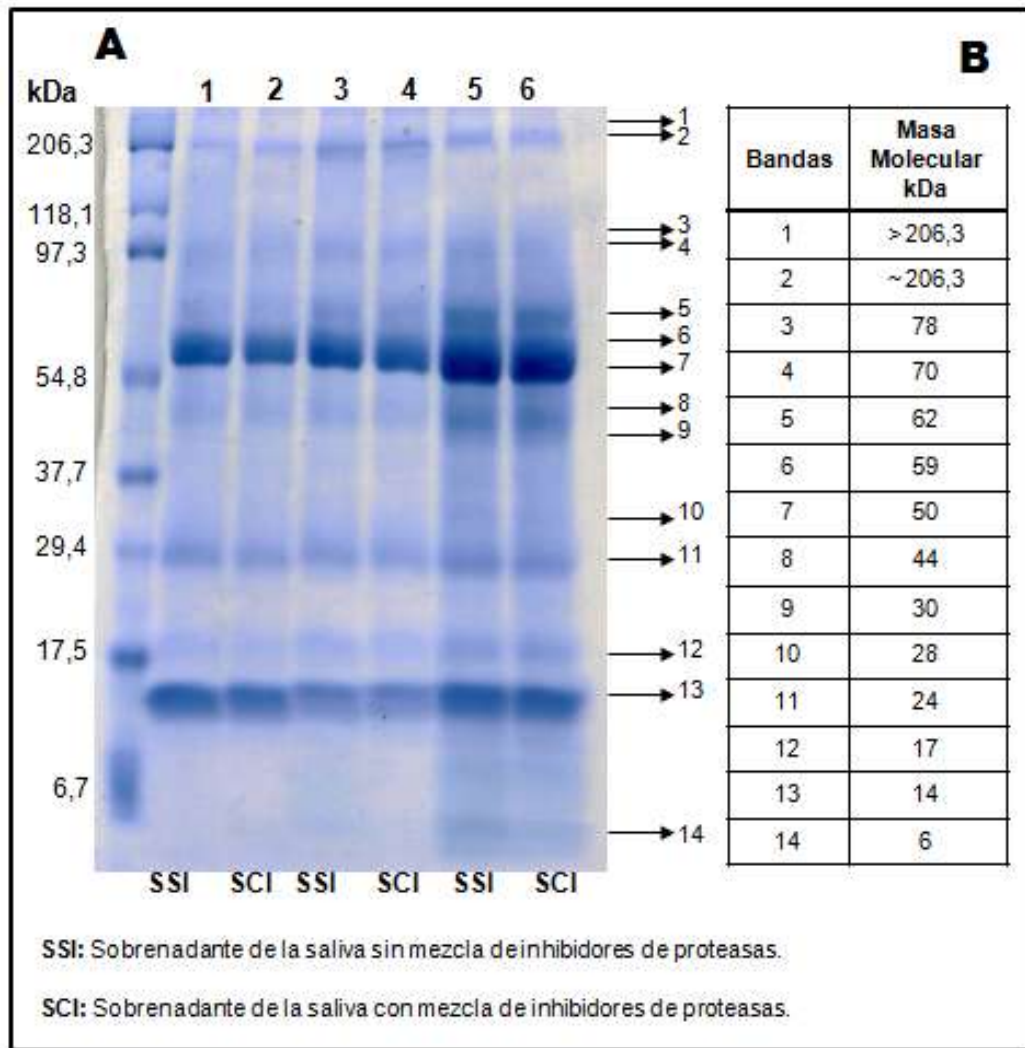
Las diferencias entre la concentración de proteínas fueron analizadas estadísticamente empleando sólo la prueba estadística de Fisher. Al comparar la concentración de proteínas totales las muestras sin inhibidor de proteasas con la concentración de las que contenían inhibidor de proteasas no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

#### **4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes de muestras de saliva con y sin inhibidor de proteasas.**

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes con muestras de saliva tratadas con y sin inhibidor de proteasas, con el objetivo de establecer si existen o no diferencias, en cuanto al patrón electroforético derivado del tratamiento que recibió la muestra de saliva.

El perfil de proteínas de tres de estas muestras se muestra en la figura 15. En los carriles 1, 3 y 5 se observan las muestras sin la mezcla de inhibidor de proteasas y en los carriles 2, 4 y 6 se observa una alícuota de las muestras tratadas con la mezcla de inhibidores de proteasas. Se observan 14 bandas correspondientes a proteínas salivales. Al comparar los carriles 1 con 2, 3 con 4 y 5 con 6 se observa que el patrón de proteínas en cuanto al número e intensidad de las bandas el mismo en la muestra con y sin la mezcla de inhibidor de proteasas.





**Figura 15-. Perfil electroforético de muestras de saliva tratadas con y sin mezcla de inhibidores de proteasas.** Gel de electroforesis en condiciones disociantes en gel (16x14 cm) de poliacrilamida en gradiente de 10 a 20% teñido con azul de coomasie. Panel A: Perfil electroforético del sobrenadante de la saliva (carril 1, 3 y 5) y del sobrenadante de saliva con mezcla de inhibidores de proteasas (carril 2, 4 y 6), a la izquierda se observa el estándar de masa molecular (kDa). Panel B: Tabla con las masas moleculares aproximadas de las 14 bandas indicadas y numeradas en A.

### 13. Cromatografía para la extracción de proteínas de la muestra de saliva.

Se tomaron 200  $\mu$ L de sobrenadante de 6 muestras de saliva, se combinaron para formar una mezcla o *pool*, el cual fue tratado con el “Protein Enrichment Kit” de Bio-Rad®. A los eluatos (E1 y E2) obtenidos se les determinó la concentración de proteínas totales y se analizaron sus perfiles electroforéticos.



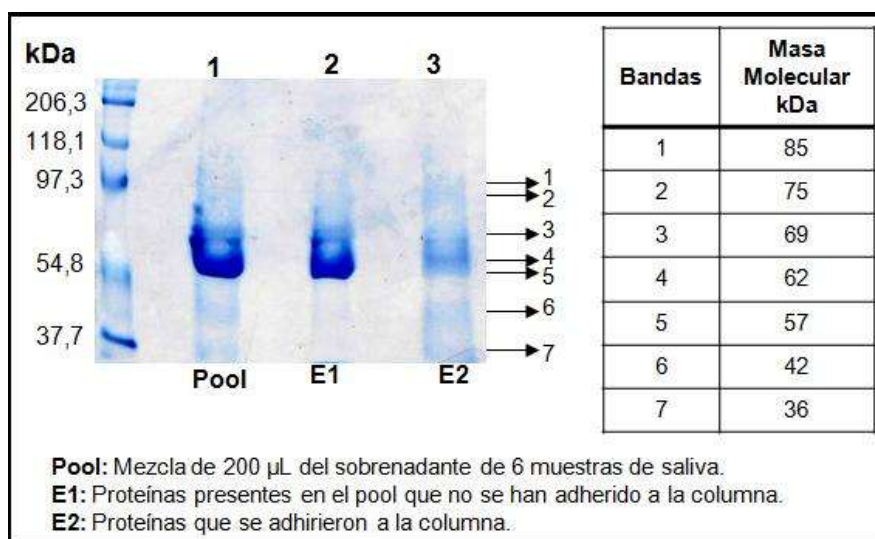
#### **4.3. Concentración de proteínas totales en el *pool* antes y después de realizar la cromatografía de extracción**

La concentración de proteínas totales fue determinada por el método colorimétrico de Lowry y col. (1951). La concentración de proteínas totales del *pool* de muestras, antes ser tratada con la cromatografía (2,21 mg/mL) y la concentración de proteínas del eluato (E2) (1,66 mg/mL), es decir las proteínas que se unieron a la columna.

#### **4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes del *pool* de las muestras de saliva, antes y después de realizar la cromatografía de extracción**

A fin de conocer el patrón electroforético del *pool* de muestras de saliva y su cambio después de ser tratado con la cromatografía de extracción, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes, el cual se observa en la figura 16.

En el perfil de proteínas del *pool* de las muestras de saliva antes y después de ser tratado con la cromatografía de extracción (carriles 1 y 3) se observan 6 bandas de proteínas salivales que pueden ser asociadas a proteínas ya identificadas y reportadas.



**Figura 16-. Perfil electroforético de muestras de saliva centrifugada antes y después de realizar la cromatografía de extracción.** Gel de electroforesis en condiciones disociantes en gel (9x6 cm) de poliacrilamida en gradiente de 10 a 20% teñido con azul de coomasie. Panel A: Perfil electroforético del pool de muestras antes y después de ser tratado con el cromatografía de extracción (carril 1 y 3) y del resto de la muestra que no se unió a la columna de cromatografía de extracción (carril 2), a la izquierda se observa el estándar de masa molecular (kDa). Panel B: Tabla con las masas moleculares aproximadas de las 7 bandas indicadas y numeradas en A.

En el carril 2 de la figura 16 se encuentra el perfil de proteínas del *pool* de muestras que no se adhirió a la columna, se observa que las proteínas de baja masa molecular (menos de 55 kDa) no se encuentran en este perfil electroforético.

## V-. Discusión.

La saliva ofrece un papel vital en el mantenimiento de la salud bucal, esto se atribuye a sus múltiples componentes, que pueden destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos en la cavidad bucal (Llena, 2006; Schipper y col, 2007).

La idea de emplear la saliva para el diagnóstico, detección precoz de ciertas enfermedades, el control de la evolución de estas enfermedades y la detección de drogas adictivas, surgió aproximadamente a mitad del siglo XX (Chiappin y col, 2007; Lee y col, 2009).

Enfermedades hereditarias como la fibrosis quística y el síndrome de Sjögren han sido relacionadas con cambios en algunos componentes de la saliva (Slomiany y col, 1982; Tishler y col, 1999). La presencia de *Helicobacter pylori* en la saliva evidenciada mediante PCR, demuestra la vía de transmisión oral-oral de esta bacteria (Loeb y col, 1997). La saliva también ha sido utilizada para la detección de anticuerpos frente al virus de la rubéola, VIH, parotiditis y sarampión.

La presencia de algunas hormonas como el cortisol, la aldosterona, la testosterona, el estradiol y la insulina, pueden detectarse en la saliva con una alta correlación con sus concentraciones en suero (Kaufman y Lamster, 2002; Walsh, 2008).

El uso de la saliva como alternativa para el diagnóstico es una vía prometedora, la cual puede hacer posible controlar varios biomarcadores, incluso

en muchas circunstancias en las que la sangre y muestras de orina no están disponibles (Motemayel y col, 2010). El análisis de la saliva puede ofrecer un enfoque rentable para la proyección de grandes poblaciones (Kaufman, 2002); debido a que la extracción de sangre es más costosa y no es conveniente para el paciente, ya que las muestras deben ser recogidas en la clínica, y se puede inducir un estrés traumático, sobre todo cuando las muestras deben ser tomadas en repetidas ocasiones (Voss, 1999; Nieuw y col, 2004).

No obstante, los investigadores difieren en el protocolo para la obtención de la muestra, ya que esta puede ser estimulada o en condición de reposo; en su almacenamiento e incluso en el procesamiento de la misma.

En este trabajo han sido estudiados algunos componentes de la saliva como el patrón y concentración de proteínas, además de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , para establecer parámetros en cuanto al empleo de saliva como muestra diagnóstico de enfermedades bucales como la enfermedad periodontal y las caries.

Una vez tomada la muestra de saliva es importante que el manejo no afecte la naturaleza y composición de la misma (Schipper y col, 2007), por lo que esta, es colectada en un vial mantenido en frío. Una vez colectada es igualmente mantenida en una cava con hielo, a fin de evitar cambios en su composición.

Schipper y colaboradores (2007), sugirieron centrifugar las muestras de saliva antes de realizar la determinación de parámetros a fin de eliminar los restos de alimentos, células epiteliales desprendidas, microorganismos,

componentes insolubles y la turbidez de la saliva que puede interferir con algunas técnicas analíticas.

Así mismo Chiappin y colaboradores (2007), recomiendan centrifugar la saliva, descartar el sedimento y almacenar el sobrenadante a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta que sea empleado para realizar la determinación de los distintos parámetros.

Con el propósito de establecer el rango de tiempo en el que las muestras puedan mantenerse almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sin que se afecten drásticamente los parámetros de interés, se realizó un ensayo en el que la muestra se separó en 6 alícuotas, las cuales fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y descongeladas un día específico, para realizar la determinación de los parámetros.

El promedio de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y proteínas totales de cada una de las muestras, determinadas los días 0, 1, 5, 15, 20 y 25 se observan en las figuras 3, 4 y 5 respectivamente.

Las muestras siguen una tendencia de disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , al aumentar el tiempo de almacenamiento. Desde el día 0 al día 1, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las muestras, disminuye aproximadamente en un 20%. Al día 5 de congelación la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye un 25% y después del día 10 la concentración es menos de la mitad de concentración inicial.

La concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  al igual que la de  $\text{Ca}^{2+}$ , se ve afectada al aumentar los días de congelación de las muestras. El día 15 de congelación la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  disminuyó en promedio, aproximadamente 20% de la concentración inicial.

De la misma manera, la concentración de proteínas totales en las muestras disminuye al aumentar los días de congelación, con una pérdida en promedio de aproximadamente un 30% de la concentración inicial de proteínas totales para el día 5 de congelación y de 43% para el día 25 de congelación.

La disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y proteínas totales en las muestras durante el aumento de los días de congelación, evidencia que aún manteniendo las muestras congeladas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  su concentración varía, por lo que se recomienda el empleo de las muestras para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y proteínas totales durante los primeros 5 días después de la recolección de la muestra.

Una disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  en saliva fue demostrada por Raynal y colaboradores en 2003, con la formación de un gel en la muestra, sugiriendo que el  $\text{Ca}^{2+}$  media enlaces intermoleculares entre mucinas, que a su vez se unen con facilidad a proteínas como histatina, estaterina y ligandos hidrofóbicos (Iontcheva y col, 2000; Loomis y col, 1987).

Durante el tiempo en que se realizó el ensayo observamos que, a partir del día 1 al descongelar las muestras se observaba un precipitado con aspecto mucoso, que en algunos casos impedía la toma correcta del volumen de muestra necesario para la determinación de los parámetros, esto podría deberse a que los cambios lentos de temperatura a los que es sometida la muestra, favorecen la formación de este gel o precipitado (Schipper y col, 2007). Por otra parte las moléculas de mucinas en solución pueden entrecruzarse para formar agregados vía puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, así como

por fuerzas de Van der Waals. El incremento en el número de entrecruzamientos conduce a la formación de un gel (Gésime y col, 2009).

Como se mencionó anteriormente las muestras de saliva deben ser centrifugadas. Con el fin de determinar el tiempo de centrifugación adecuado para las muestras de saliva humana no estimuladas empleadas para determinar la concentración de proteínas totales, se realizó un ensayo en el que la muestra fue centrifugada a diferentes tiempos 5, 10 y 15 minutos a una velocidad constante de  $16.000 \times g$ .

La figura 6, corresponde a la concentración promedio de proteínas totales de las muestras centrifugadas a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de proteínas totales no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la prueba de análisis de varianzas ni en la prueba estadística de Fisher, entre los diferentes tiempos de centrifugación. Los valores obtenidos para la concentraciones de proteínas totales son cercanos a los reportados por Chiappin y colaboradores (2007) y por Mejía (2008).

En la figura 7, se observa el crecimiento bacteriano obtenido del cultivo de  $20 \mu\text{L}$  del sobrenadante producto de la centrifugación de las muestras y en este se puede apreciar el crecimiento de las bacterias al incrementar la turbidez del medio. El medio de cultivo con el sobrenadante que sólo fue centrifugado durante 5 minutos presentó mayor crecimiento de bacterias que el de 10 minutos y en el de 15 minutos el crecimiento de bacterias fue menor, demostrando que aún al centrifugar durante 15 minutos, se encuentran bacterias presentes en la muestra.

Las concentraciones de proteínas totales presentes en las muestras centrifugadas a diferentes tiempos no presentan una diferencia marcada entre los valores, sin embargo, es necesario comprobar si los valores obtenidos no son afectados por la presencia de microorganismos, que permanecen en la muestra después de la centrifugación, aunque la misma sea mantenida en frío. Es por ello que se realizó un ensayo en el que el sobrenadante producto de la centrifugación de la muestra es filtrado, para descartar todos los microorganismos que puedan estar presentes en el sobrenadante.

Los resultados observados en la figura 8, corresponden al promedio de la concentración de proteínas totales de la muestra sin centrifugar, centrifugada y centrifugada y filtrada, observándose disminución en los valores de proteínas totales al centrifugar y centrifugar y filtrar las muestras.

En la saliva total (sin centrifugar), se encontró la mayor concentración de proteínas y en la que fue filtrada la menor, la diferencia entre la concentración de proteínas totales con estos tratamientos fue significativa ( $p < 0,05$ ) para la prueba de Fisher. Sin embargo la diferencia entre la concentración de proteínas de la muestra no centrifugada y la centrifugada no fue significativa ( $p > 0,05$ ) para la prueba de Fisher.

La diferencia entre la concentración de proteínas totales entre las muestras centrifugadas y las centrifugadas y filtradas no fue significativa ( $p > 0,05$ ) para la prueba de Fisher, lo cual nos indica que el tratamiento de filtración elimina pocas proteínas con respecto a la centrifugación sola.



La concentración elevada de proteínas totales presentes en la muestra de saliva total o sin centrifugar con respecto a los otros dos tratamientos, puede deberse a la turbidez y alta viscosidad de la muestra o a la pérdida de algunas proteínas de gran masa molecular como glicoproteínas y mucinas que pueden sedimentar durante la centrifugación (Schipper y col, 2007). Proteínas como la lisozima tiende a sedimentar durante la centrifugación, al formar complejos con las mucinas (Virella y Goudswaard, 1978).

La muestra sin centrifugar presenta alta viscosidad por lo que se dificulta la toma del volumen exacto para la determinación de los parámetros.

En la figura 9 se observa cultivo de la muestra de saliva sin centrifugar, mostrándose turbio por el crecimiento de la gran cantidad de microorganismos que se encuentran presentes en la muestra, el cultivo con la muestra que fue centrifugada, el cual es menos turbio en relación al cultivo de la saliva total y el medio de cultivo con la muestra centrifugada y filtrada, el cual se observó translucido, indicando la ausencia o presencia de un bajo nivel de microorganismos no detectable a simple vista.

A fin de comprobar si al filtrar la muestra, la misma queda libre de microorganismos, se recomienda realizar estudios posteriores, para cuantificar el crecimiento bacteriano.

Al centrifugar y centrifugar y filtrar las muestras no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre la concentración de proteínas totales, sin embargo a fin de observar si existían diferencias o no en cuanto al perfil

electroforético, se realizó una electroforesis en condiciones disociantes con estas muestras.

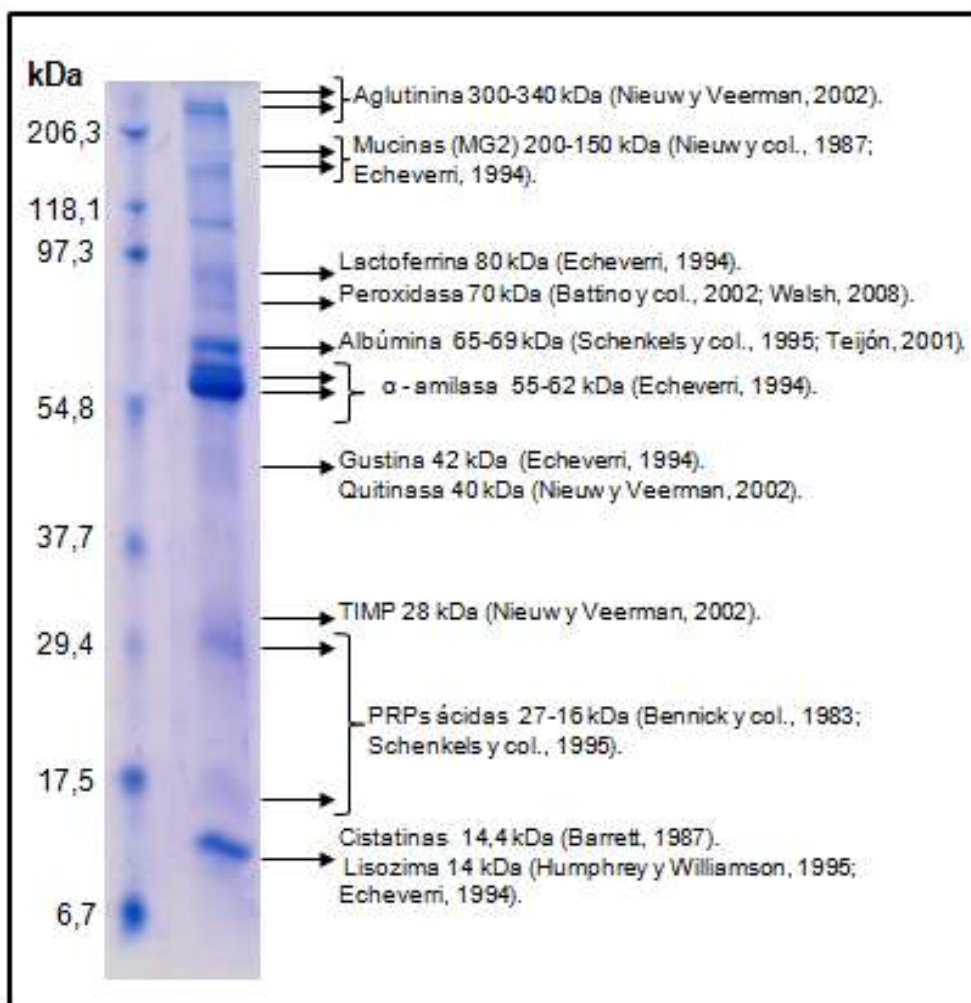
La electroforesis fue realizada en geles con una concentración en gradiente de acrilamida de 10 a 20 %. Escárte (2008), recomendó el uso de gel en gradiente de 10 a 20 % para poder observar las bandas con la mejor resolución posible, según resultados obtenidos a través del análisis desintométrico del perfil electroforético de las proteínas salivales.

El perfil electroforético de las proteínas salivales obtenido en las muestras de saliva no estimulada de estudiantes de odontología de la Universidad Central de Venezuela (figura 9) es similar al obtenido por Mejía (2008) con adultos venezolanos y al obtenido por Escárte (2008) con niños venezolanos.

En la figura 10 se distinguieron 17 bandas en el sobrenadante de la muestra y en el filtrado de este sobrenadante. Sin embargo las bandas 4, 5, y 6 se observaron un poco más intensas y definidas en el sobrenadante de la saliva que fue filtrado.

El perfil electroforético del sobrenadante de otra muestra y del filtrado de éste sobrenadante se muestra en la figura 11. Aunque se distingue en mismo número de bandas (16) para los distintos tratamientos, las bandas 1, 2, 3, 4, 5 y 13 se observan más intensas en el carril 2, cuando el sobrenadante de la muestra es filtrado.

Las bandas de proteínas salivales, fueron caracterizadas de acuerdo al estándar de masa molecular (kDa) y en la figura 17 se realizó una analogía entre las masas moleculares de las proteínas encontradas en los perfiles electroforéticos de la saliva en este trabajo, con las proteínas de masa moleculares conocidas, identificadas por otros investigadores.



**Figura 17-. Caracterización de bandas observadas con proteínas salivales identificadas y reportadas.** Se observaron 17 bandas de las cuales 14 han sido asociadas a proteínas ya reportadas de acuerdo a su masa molecular.

Las bandas 1 y 2 presentan una masa molecular mayor a 206,3 kDa y se podrían asociar la aglutinina que ha sido reportada con una masa de 340 kDa (Nieuw y Veerman, 2002; Nieuw y col, 2004).

Las siguientes bandas con un tamaño de 135 a 121 kDa, son asociadas con las mucinas (MG2) de 200 a 150 kDa en sus isoformas, las cuales son diferentes en su contenido de carbohidratos (Nieuw y col, 1987; Echeverri, 1994; Nieuw Amerongen y col, 2007). Entre estas bandas se podría encontrar IgA en forma de monómero con aproximadamente 170 kDa de masa molecular e IgG provenientes del fluido crevicular con una masa molecular de 160-150 kDa (Romero, 2007; Koneman y Allen, 2008).

Las bandas de aproximadamente 90 y 75 kDa podrían asociarse a lactoferrina de 80 kDa (Echeverri, 1994; Humphrey y Williamson, 2001) y peroxidasa de 70 kDa (Battino y col, 2002; Walsh, 2008).

La albúmina de suero de 65 a 69 kDa llega a la saliva a través del surco gingival, en el gel de electroforesis esta podría asociarse a la banda de aproximadamente 68 kDa (Schenkels y col, 1995).

La proteína con mayor abundancia en saliva es la  $\alpha$ -amilasa (55 y 62 kDa), que posee dos isoformas, glicosilada y sin glicosilación (Echeverri, 1994). Las bandas de aproximadamente 59 y 54 kDa en el perfil electroforético de la saliva humana, podrían corresponder con las isoformas de la  $\alpha$ -amilasa.

Las bandas de aproximadamente 50 y 48 kDa tienen una masa equivalente que las proteínas gustina de 42 kDa y quitinasa de 40 kDa. Entre las bandas de 30 a 16 kDa se encuentran las PRP ácidas y TIMP (Schenkels y col, 1995; Nieuw y Veerman, 2002).

La cistatina de 11,4 kDa y lisozima de 14 kDa son proteínas que se encuentran en la saliva, en el perfil electroforético mostrado en la figura 10 estas podrían relacionarse con la banda de aproximadamente 14 kDa.

En los casos en que los geles son teñidos con plata, se distinguen un número menor de bandas, debido al “fondo” producto de la sensibilidad de la tinción. En la figura 13, al comparar el carril 1 y 2, se observa que las bandas 1, 2 y 3 son un poco más intensas en el filtrado del sobrenadante de la muestra (carril 2). Al comparar el carril 3 y 4, en las bandas 3 y 7 pareciera haber desigualdad en la intensidad de las bandas, sin embargo esto podría deberse al “fondo” del gel.

La tinción de plata por ser más sensible que la tinción con azul de Coomassie R250, nos permite visualizar pequeñas cantidades de proteínas (0,3 ng de proteína), no obstante presenta como desventaja, que las proteínas que se encuentran en grandes cantidades no se puedan observar claramente. Por ello el uso de esta tinción se emplea con el fin de visualizar proteínas salivales de bajo peso molecular.

En la figura 14 se muestran otras dos muestras sometidas al tratamiento de centrifugación y filtración. En este caso las bandas de alta masa molecular no se observan con claridad, al comparar el carril 1 con el 2, las bandas 2, 3, 7 y 8 presentan mayor intensidad en el sobrenadante de la muestra que fue filtrado.

El perfil electroforético de las muestras de saliva, presenta el mismo número de bandas aún cuando el sobrenadante de estas muestras es o no filtrado. Sin embargo se puede observar que la intensidad de algunas bandas aumenta, después del tratamiento de filtración del sobrenadante.

Las diferencias del patrón electroforético entre las muestras de saliva centrifugada y centrifugada y filtrada podría deberse a productos del metabolismo de microorganismos presentes en el sobrenadante o a proteasas provenientes de los mismos, que pueden degradar proteínas salivales (Caldwell y Pigman, 1964).

No obstante, debido a las pocas diferencias observadas en el patrón de proteínas salivales, se recomienda el empleo de la centrifugación a fin de eliminar los elementos insolubles y algunos microorganismos que puedan estar presentes en la muestra.

Entre los componentes orgánicos de la saliva, se encuentran diversas enzimas. Estas pueden llegar a la saliva a través de la secreción de las glándulas salivales mayores o menores e incluso a través del fluido crevicular y degradan otras proteínas salivales con alta eficiencia (Sun y col, 2009).

La degradación de proteínas salivales, producto de proteólisis es un factor importante que se debe tener en cuenta al emplear la saliva en investigación e incluso como muestra diagnóstico. La presencia de enzimas propias de la saliva y de enzimas bacterianas, han sido implicadas en la destrucción de los tejidos bucales conduciendo a estados patológicos. Sin embargo se desconoce la identidad de algunas de las enzimas presentes en la cavidad bucal (Sun y col, 2009).

Sun y colaboradores (2009), realizaron estudios en los que compararon la actividad proteolítica de la saliva humana sin centrifugar y centrifugada. Sus resultados mostraron que la tasa de degradación de la saliva sin centrifugar es 7,5 veces más rápida que en el sobrenadante de la saliva, y que aproximadamente el

88,2% de la actividad proteolítica de la saliva es asociada con sus componentes insolubles. Estos resultados resaltan la importancia de centrifugar las muestras de salivas antes de que la misma sea analizada.

A fin de establecer si la centrifugación de las muestras de saliva es suficiente para que la actividad proteolítica de las enzimas no afecte su concentración de proteínas totales y su perfil electroforético, se realizó un ensayo empleando una mezcla de inhibidores de proteasas P2714 de uso general de la marca Sigma-Aldrich®.

La figura 14 muestra el promedio de la concentración de proteínas totales de las muestras con y sin inhibidor de proteasas. Las diferencias entre la concentración de proteínas de las alícuotas de las muestras con y sin inhibidor de proteasas no fueron significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de Fisher.

El empleo o no inhibidores de serin proteasas, cisteín proteasas, aspartil proteasas y metaloproteasas, no afecta significativamente la concentración de proteínas totales en muestras de saliva.

No obstante, a fin de observar si el empleo o no estos inhibidores de proteasas afecta el perfil electroforético de las proteínas salivales, se realizó una electroforesis en condiciones disociantes empleando muestras con y sin inhibidor de proteasas.

En la figura 15 se muestra el perfil electroforético de tres muestras tratadas con y sin la mezcla de inhibidores de proteasas. Los carriles 1 y 2 corresponden a una muestras (M1), 3 y 4 a una segunda muestras (M2) y los carriles 5 y 6 corresponden a una tercera muestra (M3).

Cuando las muestras no son tratadas con la mezcla de inhibidores de proteasas (carriles 1, 3 y 5) se muestra el perfil electroforético, el mismo número de bandas que se observan cuando la muestras es tratada con la mezcla de inhibidores de proteasas (carriles 2, 4 y 6).

En el perfil electroforético de las alícuotas de las muestras de saliva tratadas sin la mezcla de inhibidor de proteasas, no se observa la desaparición de bandas de alta masa molecular o la aparición de bandas de poco peso molecular que puedan ser producto de proteólisis.

Se han identificado serin proteasas, cisteín proteasas, aspartil proteasas y metaloproteasas en saliva (Sun y col, 2009). Sin embargo los inhibidores AEBSF, Aprotinin, Bestatin, EDTA, E-64 y Leupeptin que componen la mezcla utilizada y que inhiben estos tipos de proteasas encontradas en la saliva, en estos ensayos preliminares, no afectan de forma notable el perfil electroforético de las proteínas salivales.

Se recomienda realizar zimografía con las muestras con y sin la mezcla de inhibidores de proteasas a fin de comprobar la inhibición o no de las proteasas salivales.

La proteína albúmina de 69-65 kDa, llega a la saliva a través del surco gingival (Schenkels y col, 1995). Sin embargo su concentración en saliva podría verse afectada debido a lesiones en la cavidad bucal.

A fin de establecer si la proteína albúmina presente en saliva, enmascara otra u otras proteínas salivales en el perfil electroforético, se realizó un ensayo en el que se empleó la columna de cromatografía



Se empleó un *pool* de muestras al cual se le determinó la concentración de proteínas totales antes y después del tratamiento con la columna. Después del tratamiento con la columna de cromatografía, el eluato obtenido contiene 75% de la concentración de proteínas que contenía el *pool* de muestras inicialmente.

No obstante es necesario conocer si el empleo de la columna de cromatografía afecta el perfil electroforético de las proteínas salivales, al eliminar la proteína albúmina. Con este fin se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones disociantes, el cual se observa en la figura 16.

En el carril 1 (figura 16), se encuentra el *pool* de muestras antes de ser tratada con la columna de cromatografía, en el carril 2 se encuentran las proteínas presentes en el *pool* que no se unieron a la columna y en el carril 3 se encuentra el eluato que contiene las proteínas que se unieron.

Se observa que en el carril 1 y 3, se pueden visualizar 7 bandas las cuales pueden ser asociadas a proteínas salivales ya reportadas. Sin embargo en el carril 2 se distinguen sólo 3 bandas (bandas 3, 4 y 5) , las cuales son asociadas de acuerdo a su masa molecular (entre 69-55 kDa) con proteínas como la albúmina y las dos isoformas de la  $\alpha$ -amilasa, las cuales se encuentran en concentraciones abundantes en saliva (Echeverri, 1994; Schenkels y col, 1995).

El empleo de la columna de cromatografía, facilita la visualización de algunas bandas de poca intensidad en el perfil electroforético de las proteínas salivales y disminuye la intensidad de algunas bandas que generalmente son muy abundantes, cuya masa molecular esta comprendida entre los 69 y 55 kDa.

Carpenter y colaboradores (1996), realizaron estudios de la saliva producida por la glándula parótida e identificaron una lectina con una masa molecular de aproximadamente 60 kDa, cercana a la posición de la  $\alpha$ -amilasa. Esta proteína podría encontrarse en el carril 3 (figura 16), en alguna de las bandas que nosotros asociamos con la albúmina o la  $\alpha$ -amilasa.

Sin embargo serían necesarios ensayos para el reconocimiento específico de las proteínas que se encuentran en las bandas entre 69 y 55 kDa, a fin de comprobar si la columna de cromatografía, descarta completamente la proteína albúmina de las muestras de saliva y de ser así, identificar que proteínas se encuentran en el perfil electroforético cercanas a la masa molecular de la albúmina.

## VI-. Conclusiones.

- La determinación de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y proteínas totales en las muestras de saliva debe realizarse una vez tomadas las mismas o luego de 1 o 2 días de almacenamientos a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .
- Las muestras de saliva deben ser centrifugadas a  $16.000\text{ x g}$  durante 15 minutos y el sobrenadante filtrado, para eliminar restos de alimentos y células.
- El empleo de inhibidores de proteasas, no afecta significativamente la concentración de proteínas totales, ni el perfil electroforético de las muestras.
- Se requiere identificar las proteínas de masa molecular 69 y 57 kDa unidas a la columna de cromatografía de afinidad a fin de determinar si son diferentes a las proteínas eluidas.
- Estos resultados, proporcionan una base para establecer protocolos en la colección, manipulación, procesamiento y almacenamiento de las muestras de saliva.

## Bibliografía

- Actis, A. B., Simbrón, A., Brunotto, M., Gómez de Ferraris, M. E. 2006. Concentración de proteínas totales en saliva de jóvenes consumidores sociales de alcohol. *Acta odontol. Venez.* 44(2): 171-175.
- Atkinson, K., Lo, K., Payne, S., Mitchell, J., Ingram, J. 2008. Rapid Saliva Processing Techniques for Near Real-Time Analysis of Salivary Steroids and Protein. *J of Clin Lab Analysis.* 22: 395–402.
- Bagán, J. V., Alapont, L., Sanz, C., del Olmo, J. A., Morcillo, E., Cortijo, J., Milián, A., Rodrigo, J. M. 1998. Alteraciones dentales y salivales en los pacientes con cirrosis hepática: estudio de 100 casos. *Med Clin.* 111(4): 125-128.
- Bardow, A., Moe, D., Nyvad, B., Nauntofte, B. 2000. The buffer capacity and buffer system of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. *Arch Ora Biol.* 45: 1-12.
- Barrancos, M. J., Barrancos, P. 2006. Operatoria dental integración clínica. Editorial médica panamericana. 4<sup>ta</sup> edición. Capítulo Cariología. 300-302.
- Barrett, A. J. 1987. The cistatinas: a new class of peptidase inhibitors. *Trens biochem Sci.* 12: 193-196.
- Battino, M., Ferreiro, M. S., Gallardo, I., Newman, H. N., Bullon, P. 2002. The antioxidante capacity of saliva. *J Clin Period.* 29(3): 189-194.
- Baynes, J., Dominiczak, M. H. 2011. Tercera Edición. Bioquímica médica. Editorail Elsevier. Cap 3. 35-40.
- Beeley, J. A. 1991. Clinical applications of electrophoresis of human salivary proteins: Review. *J. Chromatogr.* 569(1): 261-280.
- Bennick, A., Chau, G., Goodlin, R., Abrams, S., Tustian, D., Madapallimattam, G. 1983. The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch of Oral Biol.* 28(1): 19-27.
- Bergandi, L., Defabianis, P., Re, F., Preti, G., Aldieri, E., Garetto, S., Bosia, A., Ghigo, D. 2007. *Eur J of Oral Sci.* 115(2): 93-96.
- Bustos, I. P., Zillmann, G., Yébenes, I., Silva, S. N., 1999. Factores de Riesgo Cariogénico: Estreptococcus Mutans, Caries por Superficie, Ca<sup>2+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> Salival en Niños de 6 Años de Edad. *Rev Delt de Chile.* 90: 9-12.
- Caldwell, R. C., Pigman, W. 1964. Disc electrophoresis of human saliva in polyacrylamide gel. *Arch biochem biophysics.* 110(1): 91-96.
- Campese, M., Sun, X., Bosch, J. A., Oppenheim, F. G., Helmerhorst, E. J. 2009. Concentration and fate of histatins and acidic proline-rich proteins in the oral environment. *Arch Oral Biol.* 54(4): 345-353.

- Carol, A. F., Mark, P.H, Gordon, B.P. 2000. Precipitation of specific proteins by freeze-thawing of human saliva. *Archives of Oral Biology*. 45: 601-606.
- Carpenter, G. H., Proctor, G. B., Pankhurst, C. L., Linden, R. W., Shori, D. K., Zhang, X. S. 1996. Glycoproteins in human parotid saliva assessed by lectin probes after resolution by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 17(1): 91-97.
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., De Palo, E. 2007. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*. 383: 30-40.
- Connerty, H. V., Briggs, AR. 1966. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol*. 45: 290-6.
- Costa, P. P., Trevisan, G. L., Macedo, G. O., Palioto, D. B., Souza, S. L. S., Grisi, M. F. M., Novaes, A. B., Taba, M. 2009. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol*. 81(3): 384-391.
- Cowman, R. A., Schaefer, S. J., Fitzgerald, R. J. 1979. Specificity of Utilization of Human Salivary Proteins for Growth by Oral Streptococci. *Caries Research*. 13(4): 181-189.
- Dawes, C. 1993. Considerations in the development of diagnostic tests on saliva. *Ann NY Acad Sci*. 694: 265-269. 34.
- De Almeida P. D. V., Grégio A. M. T., Machado M. Â. N., De Lima A. A. S., Azevedo L. R. 2008. Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *J Contemp Dent*. 3: 72-80.
- Douglas, C. W. I. 1994. Bacterial-Protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res*. 8: 254-262.
- Dreizen, S., Brown, L. R., Handler, S., Ley, B. M. 1976. Radiation-induced xerostomia in cancer patients. Effect on salivary and serum electrolytes, *Cancer*. 38(1):273-278.
- Echeverri, M. T. 1994. La saliva: componentes, función y patología. *Rev Estom*. 5(1): 55-64.
- Edgar, W. M. 1992. Saliva: its secretion, composition y funciones. *Br Dent J*. 172: 305-312.
- Edgerton M., Koshlukova, S. E. 2000. Salivary Histatin 5 and its Similarities to the Other Antimicrobial Proteins in Human Saliva. *Advances in Dental Research*. 14(1): 16-21.
- Escárte, J. L. 2008. Determinación de los niveles de  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y estudio de los patrones electroforéticos de proteínas salivales en pacientes infantiles venezolanos con y sin caries. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Escárte, J., Gagliardi, A., Mejía, J., Cortés, C., More, J., Carmona, A., Pousa, S., Guevara, L., Salas, V. 2008. Determinación de la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$ , proteínas totales y estudio de los patrones electroforéticos de proteínas salivales

en pacientes infantiles venezolanos con y sin caries. *Mem Inst Biol Exp.* 5: 17-20.

- Fabre, B., Maccallini, G., Oneto, A., Smithuis, F., Radzuck, G., Hirschler, V., Aranda, C. 2007. Medición de insulina en saliva. Validación analítica. *Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo.* 44.
- Fiske, C. H., Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- Ferguson, D. B. 1987. Current diagnostic uses of saliva. *J Dent Res.* 66: 420-424.
- García, B. M. J. 2006. Laboratorio de bioquímica. Editorial MAD. Cap 8. 159
- Gavião, M. B. D., Engelen, L., Bilt, A. 2004. Chewing behavior and salivary secretion. *Eur J Oral Sci.* 112: 19-24
- Gésime, J. M., Acevedo, A. M., Lalaguna, F. 2009. Las mucinas salivales y sus implicaciones en la reología de la saliva humana y los sustitutos salivales. *Acta Odont Venez.* 47(2): 1-10.
- Gonçalves, A. K. S., Giraldo, P., Barros, M. S., Lins, G. M., Luce, A. R., Jacyntho, C. 2006. Secretory immunoglobulin A in saliva of women with oral and genital HPV infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio.* 124(2): 227-231.
- Gutiérrez, P. J. 2006. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Editorial pontificia Universidad Javeriana. Capitulo aspectos bioquímicos de la película salival adquirida.
- Harfin, J. F. 2005. Tratamiento ortodóntico en el adulto. Editorial Médica Panamericana. 2<sup>da</sup> edición. Capitulo 1.
- Heathcote, J. Cameron, C. H., Dane, D. S. 1974. Hepatitis-B antigen in saliva and semen. *The Lancet.* 303(7847): 71-73.
- Heikkinen, M. A., Sorsa, T., Pitkaniemi, J., Tervahartiala, T., Kari, K., Broms, U., Koskenvuo, M., Meurman, J. H. 2010. Smoking affects diagnostic salivary periodontal disease biomarker levels in adolescents. *J Periodontol.* 81(9): 1299-1307.
- Humphrey, S., Williamson, R. 2001. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 85: 162-169.
- Huang, C. 2004. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch of Oral Biol.* 49(12): 951-962.
- Hyypä, T. 2005. Studies on immunologic and inflammatory factors in saliva in patients with asthma and in patients with periodontitis. *J of Clin Period.* 8(6): 500-507.
- Iontcheva, I., Oppenheim, F. G., Offner, G. D., Troxler, R. F. 2000. Molecular mapping of statherin and histatin-binding domains in human salivary mucin MUC5B by the yeast two-hybrid system. *J Dent Res.* 79: 732-739.

- Izutsu, K. T., Truelove, E. L., Bleyer, W. A., Anderson, W. M., Schubert, M. M., Rice, J. C. 2006. Whole saliva albumin as an indicator of stomatitis in cancer therapy patients. *Cancer*. 48(6): 1450-1454.
- Jensen, J. L., Lamkin, M. S., Oppenheim, F. G. 1992. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva y glandular salivary secretions. *J Dent Res*. 71: 1569-1576.
- Jenzano, J. W., Hogan, S. L., Noyes, C. M., Featherstone, G. L., Lundblad, R. L. 1986. Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. *Anal Biochem*. 159: 370-376.
- Kaufman, E., Lamster, I. B. 2002. The diagnostic applications of saliva. A review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 13(2):197-212.
- Koneman, E. Allen, S. 2008. Sexta edición. Diagnóstico microbiológico. Editorail medica panamericana. Cap 3. 110-112.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227. 680-685.
- Lamkin, M. S., Arancillo, A. A., Oppenheim, E. G. 1996. Temporal and Compositional Characteristics of Salivary Protein Adsorption to Hydroxyapatite. *J of Dental Res*. 75(2): 803-808.
- Lee Yu- Hsiang, Wong, D.T., Garon, E. 2009. Salivary diagnostic. *Orthod Craniofac Res*. 12(3): 206-211.
- Lee Yu-Hsiang, Wong, D.T. 2009. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 22(4): 241–248.
- Llena, P. C. 2006. La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 11: 449-455.
- Loeb, M. B., Riddell, R. H., James, C., Hunt, R., Smaill, F. M. 1997. Evaluation of salivary antibodies to detect infection with *Helicobacter pylori*. *Can J Gastroenterol*. 11: 437-440.
- Loomis, R.E., Prakobphol, A., Levine, M. J., Jones, P. C. 1987. Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibular-sublingual saliva. *Arch Biochem Biophys*. 258: 452-464.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A., Randall, R. A. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193. 265.
- Malamud, D. 1992. Saliva as a diagnostic fuid. *Br Med J*. 305: 207-208.
- Malgorzata, H. J., Sikorska-Jaroszynska, Blaszcak, J. 2007. Saliva and caries- a literature review. *Annales Universitatis Mariacurie, S. K. Lodowska Lublin, Polonia*. 57: 30-34.
- Mandel, I. D. 1990. The diagnostic uses of saliva. *J Oral Path Med*. 19: 119-125.

- Mejía, J. D. 2008. Determinación de parámetros bioquímicos en saliva de adultos venezolanos con enfermedad periodontal. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Merrill, C. R., Goldman, D., Van Keuren, M. L. 1982. Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 3: 17-23.
- Motemayel, A. F., Davoodi, P., Dalband, M., Hendi, S. S. 2010. Saliva as a Mirror of the Body Health. *D H J*. 1(2): 1-23
- Navazesh, M. 1993. Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci*. 694: 72-77. 96.
- Nieuw A., Oderkerk, C., Driessen, A. 1987. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralisation in vitro. *Caries Res*. 21. 297-309.
- Nieuw Amerongen, A., Veerman, E. C. (2002). Saliva – the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*. 8. 2-22.
- Nieuw A., Bolscher, J.G.M., Veerman, E.C.I. 2004. Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology?. *Caries Res*. 38:247-253.
- Nieuw, A. A., Ligyenberg, A. J. M., Veerman, E. C. I. 2007. Implications for Diagnostics in the Biochemistry and Physiology of Saliva. *N.Y. Acad. Sci.* **1098**: 1-6.
- Parris, W. C. V., Kambam, J. R., Naukam, R. J., Rama S. B. V. 1990. Immunoreactive substance P is decreased in saliva of patients with chronic back pain syndromes. *Anesth Analg*. 70: 63-7.
- Pramanik, R., Osailan, S. M., Challacombe, S. J., Urquhart, D., Proctor, G. B. 2010. Protein and mucin retention on oral mucosal surfaces in dry mouth patients. *Eur J of Oral Sci*. 118(3): 245-253.
- Rahn, K. H., Van Baak, M., Van Hooff, M., Schols, M. 1983. Studies on salivary flow in borderline hypertension. *J Hypertens Suppl*. 1(2): 77-78.
- Raynal, B. D. E., Hardingham, T. E., Sheehan, J. K., Thornton, D. J. 2003. Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible crosslink in salivary mucus. *J Biol Chem*. 278: 28703-28710.
- Romero, C. 2007. Tercera Edición. Microbiología y parasitología humana. Editorial medica panamericana. Cap 12. 111-115
- Ross, M. H., Pawlina, W. 2008. Quinta Edición. Histología: Texto a atlas a color con Biología celular y molecular. Editorial medica panamericana. Buenos Aires. Cap. 16. 518-561.
- Schipper, R. G., Silletti, E., Vingerhoeds, M. H. 2007. Saliva as research material: biochemical, physiochemical, and practical aspects. *Archives of Oral Biology*. (52): 1114-35.



- Schenkels, L. C. P. M., Veerman, E. C. I., Nieuw, A. A. V. 1995. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med.* 6:161-175.
- Sloane, B. F., Honn, K. V. 1984. Cysteine proteinases and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews.* 3(3): 249-263.
- Slomiany, B. L., Aono, M., Murty, V. L., Slomiany, A., Levine, M. J., Tabaka, L. A. 1982. Lipid composition of submandibular saliva from normal and cystic fibrosis individuals. *J Dent Res.* 61: 1163-1166.
- Sreebny, L. M., Zhu, W. X. 1996. The use of whole saliva in the differential diagnosis of Sjögren's syndrome. *Adv Dent Res.* 10: 17-24.
- Sun, X., Salih, E., Oppenheim, F. G., Helmerhorst, E. J. 2009. Activity-based mass spectrometric characterization of proteases and inhibitors in human saliva. *Proteomics Clin Appl.* 3(7): 810-820.
- Tapia, C., Quiroga, T. 1998. Valores de referencia de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en saliva de niños sanos. *Rev Chil Pediatr.* 69 (2): 72-76.
- Teijón, R. J. M. 2001. Bioquímica estructural. Editorial Tébal. Tema 3. 109-110.
- Tishler, M., Yaron, I., Shiraiz, I., Levartovsky, D., Yaron, M. 1999. Salivary and serum soluble interleukina-2 receptor in primary Sjögren syndrome. *Arch Otol Biol.* 44: 305-308.
- Virella, G., Goudswaard, J. 1978. Measurement of salivary lysozyme. *J Dent Res.* 57: 326-328.
- Voss, H. F. 1999. Saliva as a fluid for measurement of estriol levels. *Am J Obstet Gynecol.* 180: 226-231.
- Wan, L. K. A., Seow, W. K., Purdie, D. M., Bird, P. S., Walsh, L. J., Tudehope, D. I. 2003. Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. A longitudinal study from 0.18 months of age. *Oral Microbiol Immunol.* 18: 72-78.
- Walsh, L. J. 2008. Aspectos clínicos de biología salival para el Clínico Dental. *Minim Interv Dent.* 1(1): 5-23.
- White, M. R., Helmerhorst, E. J., Ligtenberg, A., Karpel, M., Teclé, T., Siqueira, W. L., Oppenheim, F. G., Hartshorn, K. L. 2009. Multiple components contribute to ability of saliva to inhibit influenza viruses. *Mol O Microbiol.* 24(1): 18-24.
- Zehetbauer, S., Wojahn, T., Hiller, K. A., Schmalz, G., Ruhl, S. 2009. Resemblance of salivary protein profiles between children with early childhood caries and caries-free controls. *Eur J Oral Sci.* 117: 369-373.
- Consultas en línea:  
www.integradental.cl. Consulta 20 de abril de 2011.