

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Lugar donde se realizó el servicio social:
Laboratorio "101" Biología Experimental
Edificio "N" UAM unidad Xochimilco

Fecha de inicio: 30/10/2018
Fecha de término: 13/05/2019

Proyecto:
**“Cuantificación de proteínas y electroforesis
en gel de poliacrilamida en saliva”**

Alumna: Rosas Javier Zayre Doubrina

Matrícula: 2152028836

Asesor interno: M en C. Felipe Mendoza Pérez
Asesor externo: M en C María Cristina Fresán Orozco.

Fecha entrega: Diciembre 2019

Índice

	Pág.
Introducción	3
Objetivos	4
Objetivo general	
Objetivo específico	
Marco teórico	5
Generalidades de la saliva	
Electroforesis en gel de poliacrilamida	
Sistema de amortiguación del gel	
Sistema buffer continuo	
Sistema buffer discontinuo	
Metodología	8
Muestras	
Procedimiento cuantificación de proteínas por el método de Lowry	
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio (EGPA-SDS). Técnica de Laemmli U.K	
Resultados	12
Discusión	16
Conclusión	17
Resumen	19

INTRODUCCIÓN

La saliva es un fluido oral que se recolecta fácil y rápido y no requiere un equipo o técnicas especializadas (Kejriwal et al. 2014). La saliva está involucrada en varias funciones de protección de estructuras dentales tanto promoción, remineralización, retardación de desmineralización, neutralización de ácidos, y prevención de adherencia microbiana (Angwaravong et al. 2015).

La saliva tiene numerosas proteínas de defensa, como inmunoglobulinas salivales, chaperocina salival, péptidos catiónicos salivales, sus efectos son acumulativos y/o sinérgicos, resultando en una eficiente red de defensa molecular de la cavidad oral (Acquier et al. 2015).

La electroforesis en gel de poliacrilamida de Laemmli, U.K separa mezclas complejas de moléculas en función a su peso molecular y carga. Durante la electroforesis hay una interacción intrincada de muestras, tampones de matriz de gel y corriente eléctrica que resulta en la separación de moléculas individuales. Por lo tanto, las variables que deben ser consideradas en la electroforesis son el tamaño del poro del gel, los sistemas de amortiguadores del gel y las propiedades de la molécula de interés.

OBJETIVO GENERAL

- Estandarizar una técnica para la caracterización de proteínas de la saliva.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar proteínas de la saliva
- Efectuar la electroforesis en gel de poliacrilamida de la saliva.

MARCO TEÓRICO

Generalidades de la saliva

La saliva es un fluido oral que se recolecta fácil y rápido y no requiere un equipo o técnicas especializadas (Kejriwal *et al.* 2014). Las glándulas salivales pueden responder por enfermedades orales para mejorar la síntesis de algunas proteínas acinares y de este modo incrementa el potencial protector de la saliva (Acquier *et al.* 2015).

La saliva está involucrada en varias funciones de protección de estructuras dentales como promoción, remineralización, retardación de desmineralización, neutralización de ácidos, y prevención de adherencia microbiana (Angwaravong *et al.* 2015). Estas también participan formando una capa protectora en la mucosa oral y una película de esmalte dental que tiene afinidad por los microorganismos, atrapando y aglutinando bacterias, hongos y partículas virales (Acquier *et al.* 2015).

La saliva tiene numerosas proteínas de defensa, como inmunoglobulinas salivales, chaperonina salival, péptidos catiónicos salivales; estas moléculas están presentes en bajas concentraciones en toda la saliva, sin embargo podría considerarse que sus efectos son acumulativos y/o sinérgicos, resultando en una eficiente red de defensa molecular de la cavidad oral (Acquier *et al.* 2015). Se puede considerar que las concentraciones locales de estas proteínas cerca de la superficie mucosa, surcos periodontales y heridas orales o úlceras pueden ser mucho mayores y en algunos casos están reforzando la respuesta inmune y/o reacciones de inflamación de la mucosa oral (Acquier *et al.* 2015).

Las mucinas salivales son glicoproteínas y son principalmente sintetizadas por las células mucosales acinares de la pared submandibular y glándulas sublinguales y también en glándulas salivales menores (Angwaravong *et al.* 2015). Uno de los componentes de la saliva son las mucinas salivales que juegan un papel importante en el mantenimiento de salud oral, la lubricación y el recubrimiento de los tejidos (Kejriwal *et al.* 2014).

La amilasa es una proteína altamente abundante en saliva. La función más conocida de la amilasa es su actividad endoglicosidasa, pero también, la amilasa forma parte de la película adherida en la superficie del diente (Acquier *et al.* 2015). Esto produce un efecto directo inhibitorio en el crecimiento de ciertas bacterias y también se une al lipopolisacárido bacteriano, una superficie de estructura bacteriana y toxina bacteriana, que es responsable en algunos casos para la destrucción del tejido en las reacciones inflamatorias (Acquier *et al.* 2015).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida de Laemmli, U.K separa mezclas complejas de moléculas en función a su peso molecular y carga. Durante la electroforesis hay una interacción intrincada de muestras, tampones de matriz de gel y corriente eléctrica que resulta en la separación de moléculas individuales. Por lo tanto las variables que deben ser consideradas en la electroforesis son el tamaño del poro del gel, los sistemas de amortiguadores del gel y las propiedades de la molécula de interés (Mini-PROTEAN).

Los poros del gel son creados por el entrecruzamiento de poliacrilamida con bis-acrilamida para crear una red de poros. Esta estructura permite el tamiz molecular mediante la matriz del gel. El tamaño del poro del gel es una función de la concentración de monómero de acrilamida utilizada (%T). Los geles de poliacrilamida son caracterizados por %T, que es el porcentaje en peso del monómero total que incluye el entrecruzador. El %T da una indicación del tamaño relativo del poro del gel; el tamaño del poro disminuye con el incremento de %T.

Los geles pueden estar hechos con una concentración única en todo el gel, o podría ser moldeado como un gradiente %T en todo el gel. Las composiciones típicas son de 7.5% a 20% para geles de único porcentaje, o gradientes que van de 4-15% a 10-20% (Mini-PROTEAN).

Sistema de amortiguación del gel

El sistema de amortiguación determina los requerimientos de energía y los efectos de separación. El sistema de amortiguación está compuesto del buffer utilizado en el gel y el buffer de funcionamiento. Existen sistemas discontinuos de buffer como es el

caso de la técnica de Laemmli UK (Mini-PROTEAN). Este utiliza dos buffers de diferente molaridad y pH.

- **Sistema buffer continuo**

En el sistema buffer continuo, los mismos iones buffer están presentes a pH constante en el gel y depósitos de electrodos. El gel esta típicamente hecho de un %T continuo y la muestra se carga directamente en la parte del gel donde la separación ocurrirá. La banda ancha está determinada en parte por la altura de la muestra cargada, así que las muestras deben estar concentradas y en pequeños volúmenes para mejores resultados (Mini-PROTEAN).

- **Sistema buffer discontinuo**

En el sistema buffer discontinuo diferentes moléculas están presentes en el gel y depósitos de los electrodos. Mediante el uso de diferentes buffers en el gel y en las soluciones de electrodos y añadiendo un gel de apilamiento para el gel de resolución, las muestras se comprimen en una banda de partida delgada y proteínas individuales son finamente resueltas y separadas.

El sistema buffer discontinuo fue inicialmente ideado para uso con proteínas desnaturalizadas, o proteínas nativas. Sin embargo, el sistema discontinuo más popular empleado es el SDS-PAGE sistema buffer de Laemmli (1970) (Mini-PROTEAN).

METODOLOGÍA

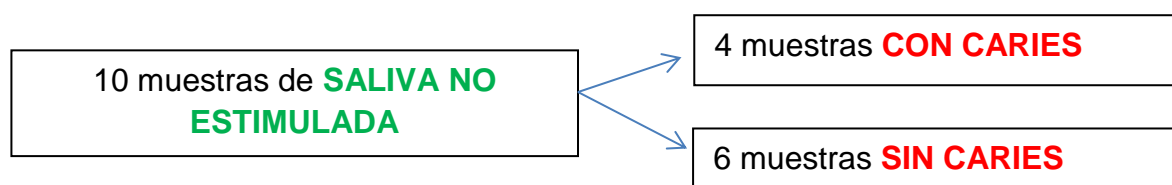
Muestras

Las muestras empleadas pertenecen a muestras de saliva de niños con y sin caries, proporcionadas por la Dra. Leonor Sánchez Pérez. Se eligieron un total de 10 muestras de saliva no estimulada o en reposo.

La preparación de las muestras se realizó cuidando en todo momento que se mantuvieran en baño de hielo y almacenadas en congelador. El tratamiento previo de las muestras de saliva consistió en centrifugar a 4°C, 15 minutos a 10,000 RPM, rescatando el sobrenadante y desechando el *pellet*.

A cada muestra se le realizaron 2 diluciones: 1:20 y 1:50, ya que anteriormente han sido las que mejor resultado dan (probado por Zayre).

Diagrama 1. Detalles de las muestras analizadas



De las muestras anteriormente analizadas por ELISA, se tomaron las primeras 10 muestras de saliva no estimulada para su cuantificación de proteínas.

Tabla 1. Relación de las muestras de saliva analizadas

Muestra	¿Caries?	Nombre	Expediente
1	NO	Arellano Ortega Jade Yorley	19
4	NO	Echeverría Fernández Victoria	23
5	NO	Escobedo Zarate Amberli Leilani	24
9	SÍ	Martínez García Xel Ha	29
16	NO	Álvarez Cerón Oziel Alejandro	36
17	SÍ	Cordero López Carlos Román	37
22	SÍ	Faustino Maravillas Nathalya	40
23	NO	Hernández Blas Johan	42
26	SÍ	Murillo Clara Yatziri Sayuri	45
28	NO	Reyes Rodríguez Rodrigo	48

Datos proporcionados por la Dra. Leonor

Procedimiento cuantificación de proteínas por el método de Lowry

La cuantificación de proteína se llevará a cabo mediante la técnica colorimétrica de Lowry. Para la curva estándar se utilizará una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) de 100 µg/ml con las siguientes concentraciones: 20, 40, 60, 80 y 100 µg en un volumen final de 1 ml. La concentración de proteína de las muestras se determinará haciendo la dilución apropiada de cada una de ellas. Posteriormente se añadirán 3 ml de una solución que contiene tartrato de sodio 2%, sulfato de cobre 1% y carbonato de sodio 2% en hidróxido de sodio 0.1 N. La curva junto con las muestras se incubarán durante 10 min a temperatura ambiente, después de lo cual se añadirán 0.3 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (vol/vol) y se incubarán los tubos 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se determinará en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm. La concentración de proteína se determinará por interpolación de la curva de calibración de albúmina.

1. Preparación de soluciones

Las soluciones que se muestran en la siguiente tabla fueron preparadas por Aztlani, un día antes del experimento y se almacenaron en el refrigerador, minutos antes del experimento, se dejaron a temperatura ambiente.

Tabla 2. Preparación de soluciones			
		Para 100 mL	Para 50 mL
Reactivo A-1	Tartrato de sodio/potasio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 - 2\text{H}_2\text{O}$)	2 g	1 g
	H ₂ O destilada	c.b.p. 100 mL	c.b.p. 50 mL
Reactivo A-2	Sulfato cúprico (Cobre II Sulfato 5-Hidratado) $\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$	1 g	0.5 g
	H ₂ O destilada	c.b.p. 100 mL	c.b.p. 50 mL
Reactivo A-3		Para 1 L	Para 500 mL
	Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	20 g	10 g
	NaOH 0.1 N	4g	2 g
	H ₂ O destilada	c.b.p. 1 L	c.b.p. 500 mL

2. Preparación del reactivo A

Cada persona preparó su propio reactivo "A" momentos antes de utilizarlo, empleando las soluciones descritas en la tabla anterior.

Tabla 3. Preparación del reactivo A		
	Para 51 mL	Para 127.5 mL
Reactivo A-1	0.5 mL	1.25 mL
Reactivo A-2	0.5 mL	1.25 mL
Reactivo A-3	50 mL	125 mL

3. Preparación de BSA para la curva

Se partió de un stock de BSA 1 mg/mL congelado, minutos antes de utilizarlo se dejó descongelar a temperatura ambiente.

A partir del stock de 1 mg/mL, se preparó una solución de 10 mL a una concentración de 100 ug/mL, realizando una dilución 1:10.

4. Preparación de las muestras

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente momentos antes de utilizarlas.

Partiendo de las muestras (sobrenadantes) se realizaron diluciones 1:20 y 1:50 a cada una de ellas, preparando 1 mL de ellas.

3. Procedimiento general de Lowry

Una vez preparadas las diluciones de BSA y de las muestras, se siguieron los siguientes pasos.

Tubo	BSA 100µg/ml	H ₂ O ml	[µg/ml]	Reactivo A	Reactivo II
1	0.000	1.000	0.00	3.0 ml	0.3 ml
2	0.125	0.875	12.5	3.0 ml	0.3 ml
3	0.250	0.750	25.0	3.0 ml	0.3 ml
4	0.500	0.500	50.0	3.0 ml	0.3 ml
5	0.750	0.250	75.0	3.0 ml	0.3 ml
6	1.000	0.000	100.0	3.0 ml	0.3 ml

1. Preparar las diluciones 1:20 y 1:50, de la muestra de saliva.
2. Adicionar el reactivo A tanto a los tubos de la curva, como a los de las diluciones 1:20 y 1:50 de las muestras problema Incubar 10 min. a temperatura ambiente
3. Adicionar el reactivo de Folin diluido 1:2 tanto a los tubos de la curva, como a los de las diluciones de las muestras problema, Incubar a temperatura ambiente 30 min.
4. Leer en un espectrofotómetro a 500 nm

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio (EGPA-SDS). Técnica de Laemmli U.K.

Se utilizó una electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) el gel se cargó con 50 µg de proteína total, y para ello se preparó un gel separador de poliacrilamida al 10% (41% de ddH₂O, 25% de Tris-HCl a 1.5 M, 33% de acrilamida/bis-acrilamida, 1% de SDS, 0.5% de persulfato de amonio y 0.05% de TEMED; pH de 8.8) sobre una base de vidrio y cuando dicho gel solidifique, se preparará sobre éste, el gel concentrador de poliacrilamida al 5% (57% de H₂O, 25% de Tris-HCl a 0.5M, 17% de acrilamida/bis-acrilamida, 1% de SDS, 0.5% de persulfato de amonio y 0.05% de TEMED; pH de 6.8).

Gel separador	10%
Acrilamida	5 mL
1.5M Tris pH 8.8	3.25 mL
H ₂ O	6.1 mL
10% SDS	0.3 mL
Temed	10 µL
Amm Ps	0.1 mL

Gel concentrador	4%
Acrilamida	1 mL
Tris pH 6.8	1.9 mL
H ₂ O	4.6 mL
10% SDS	0.75 mL
Temed	15 µL
Amm Ps	60 µL

Las muestras de saliva se centrifugaron para obtener un sobrenadante claro para posteriormente cargar las muestras en el gel, se tomaron 200 µg de proteína de cada sobrenadante y se ajustaron a un volumen de 30 µl con amortiguador de lisis, además se adicionaron 30 µL de una solución amortiguadora de muestra 2X (62.5 mM de Tris, 25% de glicerol, 2% de SDS, 5% de β-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol, pH 6.8) para obtener un volumen final de 60 µl.

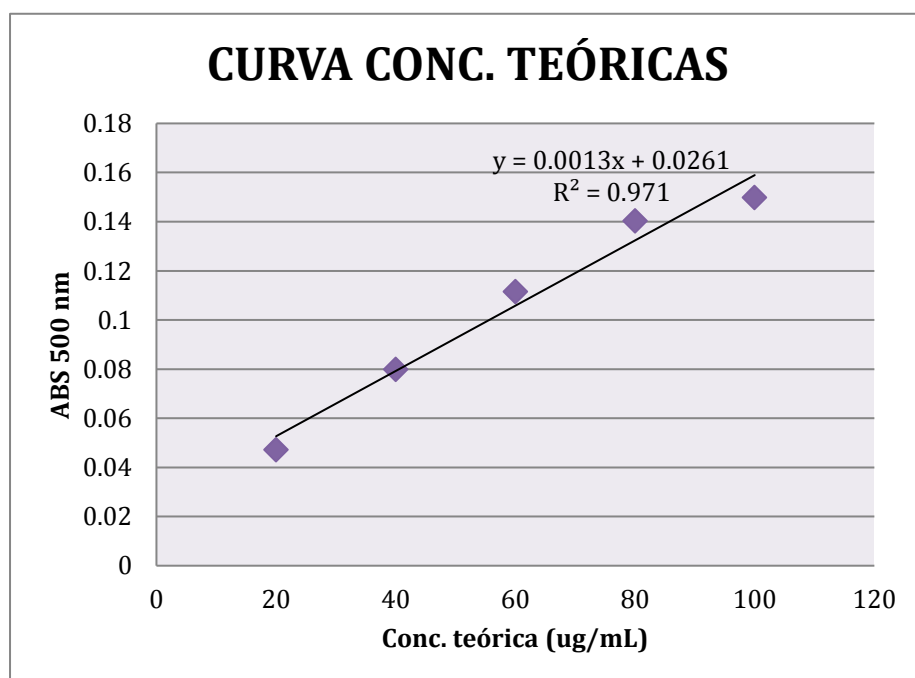
Las muestras se colocaron en un baño María durante 1 min y se enfriaron a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente, en el gel de poliacrilamida, se cargaron 30 µl de la mezcla antes mencionada para tener una concentración final de proteína total de 100 µg; además, en cada gel se colocaron en el primer carril 5µl de marcador de peso molecular (Biorad, 161-0318). Las muestras ya cargadas en los respectivos pozos serán colocadas en una cámara electroforética con amortiguador de corrida frío (25 mM de Tris, 190 mM de glicina y 0.1% de SDS, pH 8.3). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 120 V (gel separador) hasta que el frente de corrida llegó a la base del gel separador.

RESULTADOS

Con las absorbancias que aparecen en la tabla, se trazó la curva con concentraciones teóricas, las cuales se calcularon de acuerdo a las cantidades de BSA agregadas a cada punto de la curva, tomando en cuenta la concentración de la solución de la que se partió (100 ug/mL).

Tabla 6. Datos de la curva de BSA		
	CONC. TEÓRICA	
Puntos de la curva	ug/mL	D.O.
1	20	0.04725
2	40	0.07995
3	60	0.11165
4	80	0.14040
5	100	0.14985

Gráfica 1. Curva BSA con concentraciones teóricas



Con la ecuación de la recta de la curva anterior, se calcularon las concentraciones reales (experimentales) de cada punto de la curva.

EC. DE LA RECTA

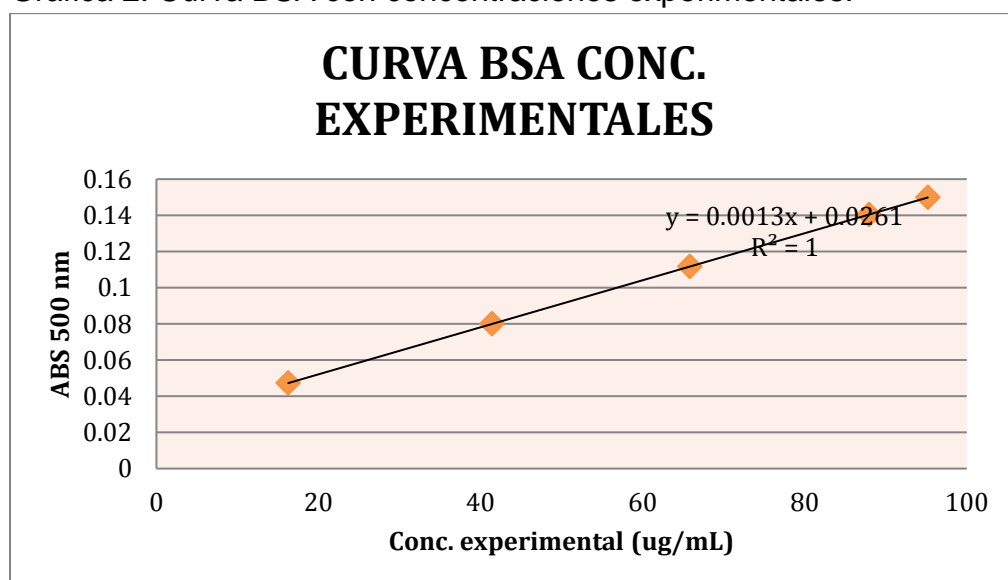
$$X = (\text{ABS} - 0.0261) / 0.0013$$

Tabla 7. Concentraciones reales de la curva

	Conc. Teóricas	Conc. Experimentales	
	ug/mL	ug/mL	ABS
1	20	16.26923077	0.04725
2	40	41.42307692	0.07995
3	60	65.80769231	0.11165
4	80	87.92307692	0.14040
5	100	95.19230769	0.14985

Con dichos datos, se trazó una nueva curva.

Gráfica 2. Curva BSA con concentraciones experimentales.



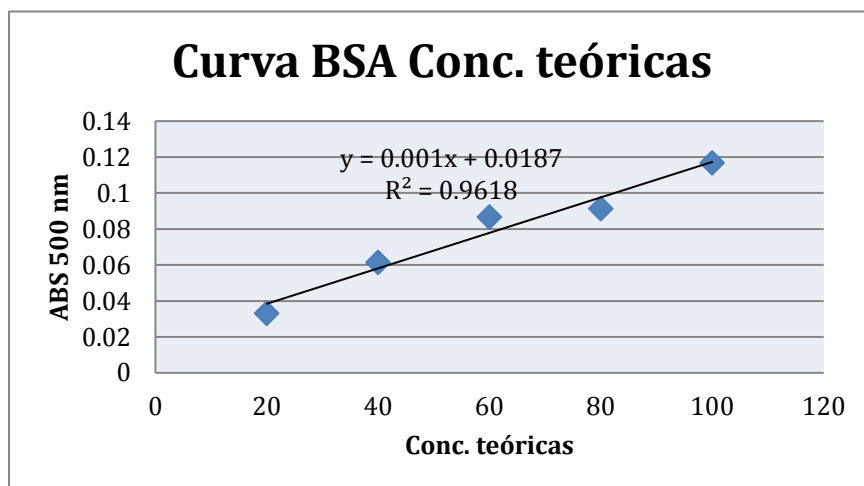
Se repitió el procedimiento y de igual forma, con las absorbancias se trazó la curva con concentraciones teóricas, las cuales se calcularon de acuerdo a las cantidades de BSA agregadas a cada punto de la curva tomando en cuenta la concentración de la solución de la que se partió (100 ug/mL).

Tabla 9. Datos de la curva con concentraciones teóricas

	Concentraciones Teóricas	
Tubo	ug/mL	D.O.
1	20	0.03315
2	40	0.0614
3	60	0.08665
4	80	0.09135
5	100	0.1168

Con esos datos, se trazó la siguiente curva.

Gráfica 3. Curva BSA con concentraciones teóricas



Con la ecuación de la recta de esa curva, se calcularon las concentraciones reales (experimentales) de cada punto de la curva.

EC. DE LA RECTA

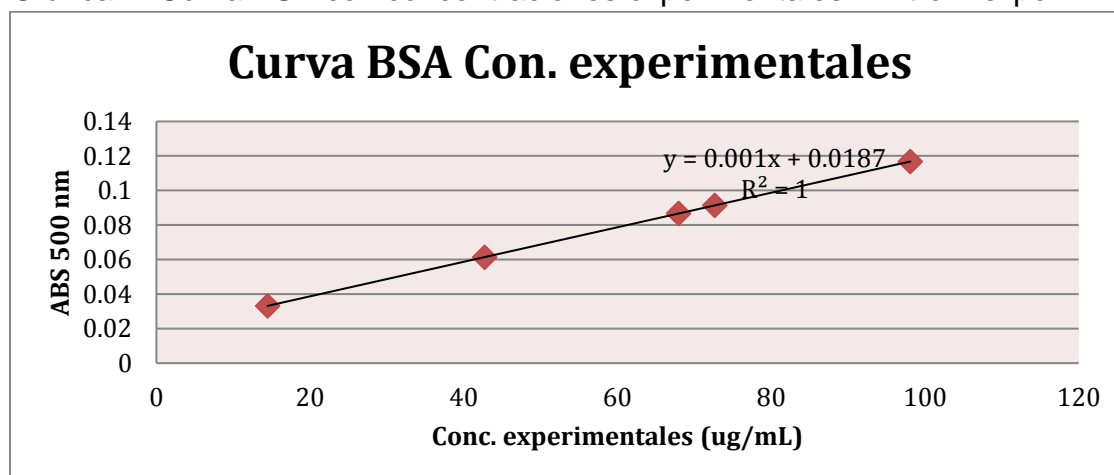
$$X = (y - 0.0187) / 0.001$$

Tabla 10. CONCENTRACIONES REALES DE LA CURVA

	CONC. TEOR	Conc. Exp	
	ug/mL	ug/mL	ABS
1	20	14.45	0.03315
2	40	42.7	0.0614
3	60	67.95	0.08665
4	80	72.65	0.09135
5	100	98.1	0.1168

Con estos datos, se trazó la siguiente curva.

Gráfica 4. Curva BSA con concentraciones experimentales – Mtro. Felipe.



Cálculo de concentración de proteína en las muestras de saliva

Empleando la ecuación de la recta de la curva primera gráfica

A continuación, se muestran las absorbancias de las dos diluciones de cada muestra y a un costado (en azul y rojo) la concentración calculada ya corregida con el correspondiente factor de dilución (20 y 50).

Tabla 11. Concentraciones de las muestras de saliva

Los datos en rojo son negativos, indican que están por debajo del punto más bajo de la curva.

	1		4		5		9		16		17		22		23		26		28	
	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]
01:50	0.0188	-280.77	0.035	323.077	0.054	1053.846	0.033	276.92	0.028	69.231	0.0408	565.38	0.019	-276.92	0.002	-942.31	0.0353	353.85	0.039	484.615
01:20	0.0487	347.69	0.09	981.538	0.121	1466.154	0.1	1130.8	0.032	89.231	0.102	1167.7	0.034	116.923	0.023	-50.769	0.0792	816.92	0.085	906.154

Tabla 12. Concentraciones de las muestras de saliva

	5		16		28	
	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]
01:50	0.0806	2096.2	0.476	17303.8	0.058	1230.769
01:20	0.14	1752.3	0.073	721.538	0.083	875.3846

Empleando la ecuación de la recta de la curva (gráfica 3)

A continuación se muestran las absorbancias de las dos diluciones de cada muestra y a un costado (en azul y rojo), que son las mismas mostradas en la tabla anterior, pero ahora, la concentración calculada corregida con el correspondiente factor de dilución se calculó con la ecuación de la recta de la curva 2.

Tabla 13. Concentraciones de las muestras de saliva

Los datos en rojo son negativos, indican que están por debajo del punto más bajo de la curva.

	1		4		5		9		16		17		22		23		26		28	
	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]
01:50	0.0188	5	0.035	790	0.054	1740	0.033	730	0.028	460	0.0408	1105	0.019	10	0.002	-855	0.0353	830	0.039	1000
01:20	0.0487	600	0.09	1424	0.121	2054	0.1	1618	0.032	264	0.102	1666	0.034	300	0.023	82	0.0792	1210	0.085	1326

Tabla 14. Concentraciones de las muestras de saliva

	5		16		28	
	ABS	[]	ABS	[]	ABS	[]
01:50	0.0806	3095	0.476	22865	0.058	1970
01:20	0.14	2426	0.073	1086	0.083	1286

- Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se preparó un gel separador al 10 % y un gel concentrador al 4 % de un 1mm de grosor, los pocillos se llenaron con 50 μ g de muestra previamente preparada con coctel (dilución 1:1), se corrió en refrigeración con un voltaje de 150 y 400 amperes.

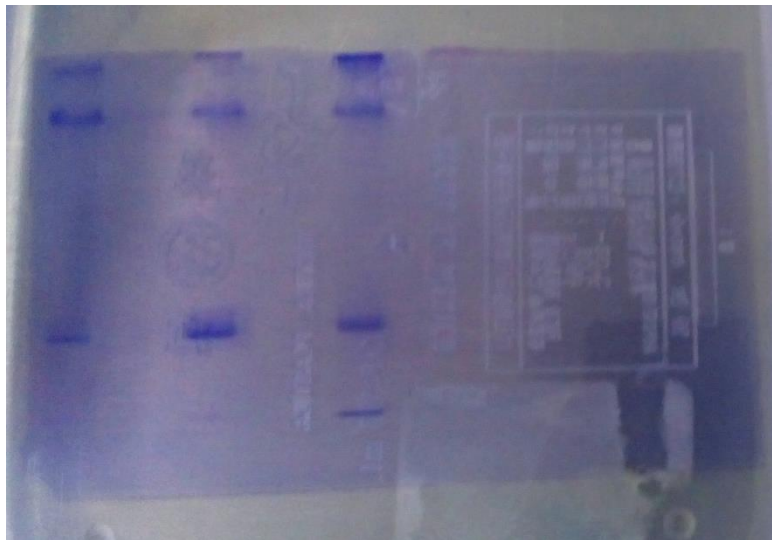


Imagen 1 Gel de poliacrilamida de muestras en estudio

Las muestras de saliva sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida mostraron solo algunas bandas como se puede observar en la fotografía del gel, esto se debe a que la cantidad de proteína presente en la saliva es muy baja.

Discusión

La concentración de proteínas en la saliva de niños resultó menor a la esperada, esto puede deberse a diferentes variantes, la edad de los pacientes es una de ellas, a medida que avanza la edad, aumenta el número de proteínas salivales totales (Castro et al. 2012); otra variante es el método de cuantificación, el contenido proteico total en saliva humana puede variar según el método de análisis utilizado. Se calcula que entre 85% y 90% de las proteínas encontradas en la saliva son secretadas por células acinares (Hernández et al 2012), ya que no existe la estandarización de alguna metodología o un valor de referencia para la concentración de proteínas y por consecuencia es difícil de comparar resultados con otros estudios existentes. Dado que no existen estudios con resultados concluyentes sobre una cantidad o valor específico de referencia para el recuento de proteínas totales, además de ausencia de un método único estandarizado (Castro et al. 2012). La secreción de la saliva (estimulada o no estimulada) puede influenciar en la cantidad de proteína que esta tiene, la concentración proteica tanto en muestras de saliva estimulada como no estimulada resulta interesante si se piensa que ambos flujos tienen diferente origen glandular, se secretan ante diferentes condiciones y presentan diferentes características bioquímicas (Castro et al. 2012).

En países desarrollados se ha demostrado que tienen una mayor concentración de proteína en saliva, ya que, el estado nutricional de la población es bueno en comparación con países en vías en desarrollo, entonces, otro factor a tomar en cuenta es el estado nutricional de los pacientes, estudios demuestran que la malnutrición afecta directamente con aspectos fisiológicos y biológicos en las personas, el estado nutricional puede en los cambios del flujo y de la concentración de proteínas en saliva (Banderas et al 1997).

Cabe mencionar que el sexo no es un factor que deba ser considerado, puesto que estudios demuestran que hay una similitud en la cantidad de proteína cuantificada y no existe evidencia sólida que muestre algún tipo de diferencia entre hombres y mujeres (Castro et al. 2012).

Conclusión

La cuantificación de proteína en saliva en niños fue muy baja, esto puede deberse a diversos factores entre los cuales destaca: la composición de la saliva, la edad del paciente y la forma de secretar la saliva (estimulada y no estimulada).

Se sugiere realizar un estudio con más individuos de rangos de edad diferentes, de igual manera, con la obtención de la muestra por ambas formas (estimulada y no estimulada) para obtener mejores resultados.

Referencias

Acquier Andrea B., Pita Alejandra K. de C., Busch Lucila, Sánchez G. A. 2015. Comparison of salivary levels of mucin and amylase and their relation with clinical parameters obtained from patients with aggressive and chronic periodontal disease. *JAppl Oral Sci.* 23;3 pp. 288-294.

Angwaravong Onauma, Pitiphat Waranuch, Bolscher Jan G. M., Chaiyarit Ponnlatham. 2015. Evaluation of salivary mucins in children with deiduousand mixed dentition: comparative analysis between high and low caries-risk groups. *Clin Oral Invest* 19:1931.

Banderas-Tarabay J. A., González-Begné M., Sánchez-Garduño M., Millán-Cortéz E., López-Rodríguez A. & Vilchis-Velázquez A. 1997. Flujo y concentración de proteínas en saliva total humana. *Salud Publica Mex.* 39 pp 433-441.

Castro R. J., Guzmán G. & Glacaman R. A. 2012. *Rec. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.* 5:1 pp 25-28.

Hernández C. Anne A. & Aranzazu M. Gloria C. 2012. Características y propiedades físico-químicas de la saliva. *UstaSalud.* 11 pp 101-111.

Kejriwal Swati, Bhandary Rahul, Biju Thomas, Kumari Suchetha. 2014. Estimation of levels of salivary mucin9 amylasa and total protein in gingivitis and chronic periodontitis patientss. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 8:10.

Mini-PROTEAN tetra cell. Instruction manual. BIO-RAD.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Lugar donde se realizó el servicio social:
Laboratorio "101" Biología Experimental
Edificio "N" UAM unidad Xochimilco

Fecha de inicio: 30/10/2018
Fecha de término: 13/05/2019

Proyecto:
"Cuantificación de proteínas y electroforesis en gel
de poliacrilamida en saliva"

Alumna: Rosas Javier Zayre Doubrina
Dirección: 8vo andador de Elvira Vargas No.183-A, Col. CTM 9
Culhuacan, CP 04909. Delegación Coyoacán, Ciudad de México.
Celular. 7351136494
E-mail: zayredoubrina@gmail.com
Matrícula: 2152028836

Asesor interno: M en C. Felipe Mendoza Pérez
Asesor externo: M en C María Cristina Fresán Orozco.

Fecha entrega: Diciembre 2019

RESUMEN

La saliva es un fluido oral que se recolecta fácil y rápido y no requiere un equipo o técnicas especializadas (Kejriwal *et al.* 2014). La saliva está involucrada en varias funciones de protección de estructuras dentales tanto promoción, remineralización, retardación de desmineralización, neutralización de ácidos, y prevención de adherencia microbiana (Angwaravong *et al.* 2015).

La saliva tiene numerosas proteínas de defensa, como inmunoglobulinas salivales, chaperonina salival, péptidos catiónicos salivales, sus efectos son acumulativos y/o sinérgicos, resultando en una eficiente red de defensa molecular de la cavidad oral (Acquier *et al.* 2015).

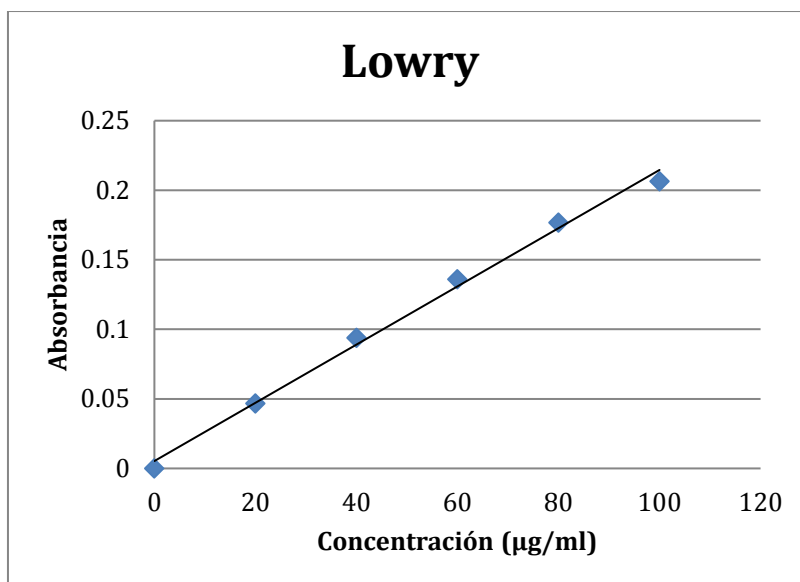
La electroforesis en gel de poliacrilamida de Laemmli, U.K separa mezclas complejas de moléculas en función a su peso molecular y carga. Durante la electroforesis hay una interacción intrincada de muestras, tampones de matriz de gel y corriente eléctrica que resulta en la separación de moléculas individuales. Por lo tanto, las variables que deben ser consideradas en la electroforesis son el tamaño del poro del gel, los sistemas de amortiguadores del gel y las propiedades de la molécula de interés.

- Cuantificación de proteína en saliva

La saliva recolectada se obtuvo de niños de edades entre 6 a 13 años. La recolección realizada fue por la mañana, sin aseo bucal previo, ni estimulación con 1 minuto de intervalo por 10 min en cada muestra. La saliva se mantuvo en congelación hasta su manipulación.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 8000 rpm por 15 min a 4° C para la obtención del sobrenadante. Este último se le realizó diluciones 1:20 y 1:50, siendo mejor la primera dilución.

La curva de calibración presenta una $R^2 = 0.9948$ y ecuación de la recta $y=0.0021x + 0.0053$, donde “y” es absorbancia y “x” concentración ($\mu\text{g/ml}$), la cual se utilizó para extrapolar los datos de las muestras en estudio.



Gráfica 1 Curva de calibración absorbancia vs concentración por el método de Lowry

Tabla 1 Absorbancias obtenidas por el método de Lowry; concentración (µg/ml) calculada con la extrapolación en ecuación de la recta de la curva de la calibración.

Muestra	D.O. dilución 1:20	D.O. dilución 1:50	Concentración (µg/ml)
A	0.1038	0.0459	952.38
B	0.0949	0.0421	864.76
C	0.1646	0.0729	1563.33

- Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se preparó un gel separador al 10 % y un gel concentrador al 4 % de un 1mm de grosor, los pocillos se llenaron con 50 µg de muestra previamente preparada con coctel (dilución 1:1), se corrió en refrigeración con un voltaje de 150 y 400 amperes.



Imagen 2 Gel de poliacrilamida de muestras en estudio.

Discusión

La concentración de proteínas en la saliva de niños resultó menor a la esperada, esto puede deberse a diferentes variantes, la edad de los pacientes es una de ellas, a medida que avanza la edad, aumenta el número de proteínas salivales totales (Castro *et al.* 2012); otra variante es el método de cuantificación, el contenido proteico total en saliva humana puede variar según el método de análisis utilizado. Se calcula que entre 85% y 90% de las proteínas encontradas en la saliva son secretadas por células acinares (Hernández *et al.* 2012), ya que no existe la estandarización de alguna metodología o un valor de referencia para la concentración de proteínas y por consecuencia es difícil de comparar resultados con otros estudios existentes. Dado que no existen estudios con resultados concluyentes sobre una cantidad o valor específico de referencia para el recuento de proteínas totales, además de ausencia de un método único estandarizado (Castro *et al.* 2012). La secreción de la saliva (estimulada o no estimulada) puede influenciar en la cantidad de proteína que esta tiene, la concentración proteica tanto en muestras de saliva estimulada como no estimulada resulta interesante si se piensa que ambos flujos tienen diferente origen glandular, se secretan ante diferentes condiciones y presentan diferentes características bioquímicas (Castro *et al.* 2012).

En países desarrollados se ha demostrado que tienen una mayor concentración de proteína en saliva, ya que, el estado nutricional de la población es bueno en comparación con países en vías de desarrollo, entonces, otro factor a tomar en cuenta es el estado nutricional de los pacientes, estudios demuestran que la malnutrición afecta directamente con aspectos fisiológicos y biológicos en las personas, el estado

nutricional puede en los cambios del flujo y de la concentración de proteínas en saliva (Banderas *et al* 1997).

Cabe mencionar que el sexo no es un factor que deba ser considerado, puesto que estudios demuestran que hay una similitud en la cantidad de proteína cuantificada y no existe evidencia sólida que muestre algún tipo de diferencia entre hombres y mujeres (Castro *et al.* 2012).

Conclusión

La cuantificación de proteína en saliva en niños fue poca, esto puede deberse a diversos factores entre los cuales destaca la edad del paciente y la forma de secretar la saliva (estimulada y no estimulada).

Se sugiere realizar un estudio con más individuos de rangos de edad diferentes, de igual manera, con la obtención de la muestra por ambas formas (estimulada y no estimulada) para obtener mejores resultados.

Referencias

- Acquier Andrea B., Pita Alejandra K. de C., Busch Lucila, Sánchez G. A. 2015. Comparison of salivary levels of mucin and amylase and their relation with clinical parameters obtained from patients with aggressive and chronic periodontal disease. *JAppl Oral Sci.* 23;3 pp. 288-294.
- Angwaravong Onauma, Pitiphat Waranuch, Bolscher Jan G. M., Chaiyarit Ponnlatham. 2015. Evaluation of salivary mucins in children with deciduous and mixed dentition: comparative analysis between high and low caries-risk groups. *Clin Oral Invest* 19:1931.
- Banderas-Tarabay J. A., González-Begné M., Sánchez-Garduño M., Millán-Cortéz E., López-Rodríguez A. & Vilchis-Velázquez A. 1997. Flujo y concentración de proteínas en saliva total humana. *Salud Pública Mex.* 39 pp 433-441.
- Castro R. J., Guzmán G. & Glacaman R. A. 2012. *Rec. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.* 5:1 pp 25-28.
- Hernández C. Anne A. & Aranzazu M. Gloria C. 2012. Características y propiedades físico-químicas de la saliva. *UstaSalud.* 11 pp 101-111.
- Kejriwal Swati, Bhandary Rahul, Biju Thomas, Kumari Suchetha. 2014. Estimation of levels of salivary mucin9 amylasa and total protein in gingivitis and chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 8:10.
- Mini-PROTEAN tetra cell. Instruction manual. BIO-RAD.