

## Revista Odontológica Mexicana

Volumen **8**  
Volume

Número **3**  
Number

Septiembre **2004**  
September

*Artículo:*

Determinación de pH y proteínas totales  
en saliva en pacientes con y sin  
aparatos ortodóncica fija  
(estudio piloto)

Derechos reservados, Copyright © 2004:  
Facultad de Odontología, UNAM

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



## Determinación de pH y proteínas totales en saliva en pacientes con y sin aparatología ortodóncica fija (estudio piloto)

Arith Nallely Zárate Daza,\* Elba Rosa Leyva Huerta,† Fernando Franco Martínez‡

### RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo determinar la concentración de las proteínas totales y pH en muestras de saliva humana, en pacientes de 15-25 años con tratamiento de ortodoncia. Se seleccionaron pacientes de la Clínica de Ortodoncia del Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM, con y sin aparatología ortodóncica. Se les pidió no comer, beber, fumar y realizar higiene bucal dos horas antes de la recolección de saliva estimulada y no estimulada; las muestras se tomaron bajo las mismas condiciones, por el mismo investigador entre las 8 y 10 a.m. Las muestras fueron almacenadas a menos 20°C, posteriormente se utilizó espectrofotometría mediante la técnica de Bradford para la determinación de proteínas totales y la medición del pH salival se realizó, utilizando un potenciómetro. Dentro de los resultados se encontró que existieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el experimental en el pH de la saliva total no estimulada ( $t$  de Student  $P < 0.05$ ) no encontrando diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de proteínas en ambos tipos de salivas.

**Palabras clave:** Proteínas totales, pH, saliva estimulada, saliva total humana.

**Key words:** Total proteins, pH, stimulate saliva, total human saliva.

### ABSTRACT

The objective of this study was the determination of the total protein concentration and pH in samples of human saliva in patients of 15-25 years old subject to orthodontic treatment. The patients were selected from the Orthodontics Postgraduate Clinic of the Facultad de Odontología UNAM, with and without orthodontic appliances. They were asked to abstained from eating, drinking, smoking and to carry out oral hygiene two hours before the collection of stimulated and non-stimulated saliva; the samples were taken under the same conditions, by the same person between 8 and 10 a.m. The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Later spectrophotometry was used with the Bradford technique to determine the total proteins and the salivary pH was measured using a potentiometer. Statistically significant differences between control group and the experimental in the pH of the total non-stimulated saliva ( $t$  of Student  $p < 0.05$ ) without significant statistics difference of the protein concentration in both saliva were obtained.

### INTRODUCCIÓN

La secreción salival juega un papel importante en la homeostasis bucal; los mecanismos fisiológicos y la composición molecular de la saliva que contribuyen a los mecanismos de defensa, es uno de los aspectos más importantes de ella; el flujo salival está sujeto a una serie de cambios, como son la ingesta de alimentos, el ritmo circadiano, la edad, el género y las enfermedades bucales.<sup>1</sup> La relación entre la saliva y la salud bucal es ampliamente aceptada pero la naturaleza, magnitud y dirección de esta relación no ha sido plenamente establecida.<sup>2</sup>

La saliva es un fluido compuesto de moléculas complejas que protegen a los tejidos blandos contra la sequedad y puede influir en la reparación de los tejidos. Es importante en el mantenimiento del pH, ya que posee diversos mecanismos para regular el pH de la placa dentobacteriana y ayuda a neutralizar el reflujo de ácidos a la cavidad bucal.<sup>2</sup>

La composición molecular de la saliva se puede agrupar en varias familias, constituidas por más de un tipo de proteínas, las cuales difieren en su estructura química, propiedades biológicas y funcionales; sirviendo de protección a los tejidos bucales contra la desecación, las agresiones del medio ambiente, la regulación de los procesos de desmineralización-remi-neralización, la lubricación de superficies oclusales y el mantenimiento del balance ecológico.<sup>3,4</sup>

Las proteínas también intervienen en un gran número de procesos biológicos, como el soporte celular, la tensión y la flexibilidad de los tejidos, la respuesta inmune y las reacciones enzimáticas.<sup>5</sup> Pero su especifici-

\* Alumna de la Especialidad de Ortodoncia, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

† Subjefa de Investigación, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

‡ Profesor de la Facultad de Odontología, UNAM.

dad en sus funciones biológicas varía de acuerdo al tipo de moléculas presentes en ella, dentro de éstas tenemos: las encargadas de dar protección que son glucoproteínas básicas ricas en prolina-albúmina; las que regulan el mantenimiento de la integridad dental como son: fosfoproteínas, tirosina, cistatina S, PRP's aniónicas, histatinas neutras; las que mantienen la integridad de las mucosas: mucinas, cistatinas, PRP's. Las encargadas de la reparación de los tejidos blandos como es el factor de crecimiento epidermal; las reguladoras del mantenimiento del pH como son: bicarbonatos, fosfatos, urea, péptidos ricos en histidina, aminoácidos; y por último las responsables de la actividad antimicrobiana, como la IgA secretoria, las mucinas, la lisozima, las glucoproteínas básicas, la lactoferrina, la peroxidasa y las histatinas.<sup>6</sup>

El contenido proteico total en saliva humana es en promedio de 300 mg/100 mL pero puede variar dependiendo el método de análisis utilizado; en este estudio utilizamos la técnica de Bradford.

El equilibrio y la integridad de la mucosa bucal depende de la calidad de la saliva, el tipo de pH y la concentración de proteínas; los cuales son factores que hacen posible que la saliva proteja a los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal. Quizá sea posible que el pH y la concentración de proteínas totales se encuentre alterado en pacientes que están sujetos a tratamiento de ortodoncia, ya que la aparatología teóricamente puede alterar la composición de la saliva.

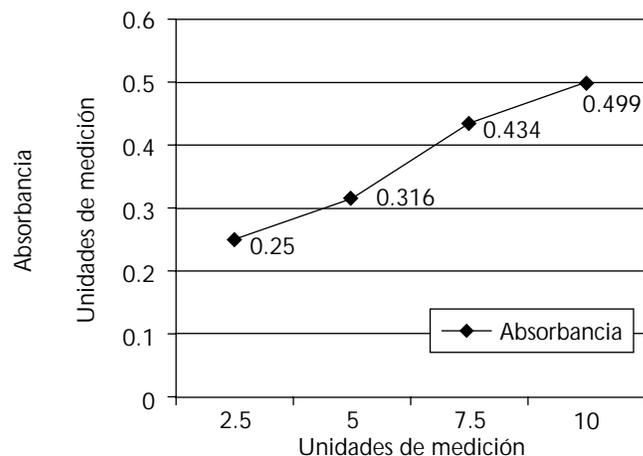
Por lo que se considera de importancia analizar si existen cambios significativos en el pH y la concentración de proteínas salivales en los pacientes sujetos a tratamiento ortodóntico.

El objetivo de este trabajo fue determinar el pH y la concentración de proteínas totales en pacientes con y sin aparatología ortodóntica.

## MÉTODOS

Este estudio fue transversal y prospectivo, para llevarlo a cabo se seleccionaron 30 pacientes voluntarios de la clínica de Ortodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM. De los 30, 15 integraron el grupo control (sin aparatología) y 15 con aparatología ortodóntica fija, correspondientes al grupo experimental con edades comprendidas entre los 15 y 25 años, de ambos géneros.

Se pidió a los pacientes que participaron en el estudio se abstuvieran de comer, beber, fumar y de realizar su higiene bucal dos horas antes de la colección de saliva; se tomaron dos muestras por paciente. Las muestras de saliva fueron colectadas en una sola sesión para cada individuo, bajo las mismas condiciones y por



Concentración de proteína BSA

Fuente: Directa.

**Figura 1.** Curva patrón para la determinación de proteína usando albúmina sérica bovina como estándar.

la misma persona entre las ocho y las diez de la mañana, con el propósito de reducir en lo posible la influencia de los ritmos circadianos de cada sujeto.<sup>7</sup> La primera muestra fue tomada sin estímulo (Saliva total humana, STH) durante 5 minutos; la segunda muestra fue de saliva estimulada (STHe) colectada inmediatamente, pidiendo a los pacientes producir un moderado estímulo masticando un trozo de plástico, durante un minuto. La saliva se colectó en un tubo de propileno desechable, estéril, con tapa enroscable de 15 mL marca Costar, una vez obtenidas las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un mes. Se descongelaron a temperatura ambiente, primero se midió el pH en un potenciómetro marca Conductronic pH 120, introduciendo el electrodo dentro de cada tubo con saliva.

Para la obtención de concentración de proteínas totales se utilizó la técnica de Bradford, utilizando azul de Coomassie G-250, transportándolas a un espectrofotómetro marca Gene Quant pro. Para la obtención de la concentración de proteínas se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (*Figura 1*). La cual consistió en:

**Obtención de la curva estándar** utilizando BSA (albúmina sérica de bovino), se prepararon 4 estándares y un blanco de la siguiente manera:

En 5 tubos eppendorf se realizó la tinción:

Tubo 1 se colocó 5  $\mu\text{L}$  de 0.5 mg/mL BSA, 95  $\mu\text{L}$  de 0.15N NaCl y 1 mL Bradford.

Tubo 2 se colocó 10  $\mu\text{L}$  de 0.5mg/mL BSA, 90  $\mu\text{L}$  de 0.15N NaCl y 1 mL Bradford.

Tubo 3 se colocó 15  $\mu\text{L}$  de 0.5mg/mL BSA, 85  $\mu\text{L}$  de 0.15N NaCl y 1 mL Bradford.

Tubo 4 se colocó 20 µL de 0.5mg/mL BSA, 80 µL de 0.15N NaCl y 1 mL Bradford y el tubo 5 sirvió de blanco o control colocando 100 µL de 0.15N NaCl y 1 mL del reactivo de Bradford.

Todos los tubos se llevaron al vortex para que se homogeneizaran los reactivos, y se dejaron a temperatura ambiente por un lapso de 2 minutos. Posteriormente se tomó 1 mL de la solución de cada tubo en una cubeta de plástico (especial para el espectrofotómetro) para determinar a 595 nm por medio de espectrofotometría una curva estándar así como la concentración de proteínas.

**Obtención de concentración de proteínas salivales**

Para poder cuantificar las proteínas se utilizó el método de Bradford que se basa en el acoplamiento del colorante azul de Coomassie con la proteína y se determina colorimétricamente, si existe una relación directa entre el desarrollo del color en el espectrofotómetro y la concentración de proteínas; para realizarlo se descongeló la saliva, se tomó con una micropipeta de 1 mL y se colocó en una microcentrífuga marca BIORAD modelo 14 a 12,000 rpm x 30 minutos. Después se tomaron 5 µL de sobrenadante y se colocaron en un tubo eppendorf colocándoles 95 µL de 0.15N NaCl y 1 mL Bradford. Se llevó al vortex y se dejó reposar 2 minutos (esto fue aplicado a todas las muestras). Acto seguido se pasaron a una cubeta de plástico para determinar a 595 nm 1 mL de esta solución en el espectrofotómetro, donde se generó una curva estándar por medio de absorbancia a 595 nm y se observó contra la concentración de proteínas.

El espectrofotómetro indicaba la inserción del blanco y la secuencia en que las muestras tenían que ingresar para ser analizadas. Por último se obtuvieron promedios, desviaciones estándar y t de Student para la determinación de concentración de proteínas y pH, a las muestras de saliva estimulada y no estimulada tanto en

el grupo control como en el grupo bajo tratamiento ortodóntico a un nivel de significancia del 5%.

**RESULTADOS**

El total de los pacientes muestreados fue de 30, de ellos 26 fueron femeninos y 4 masculinos con un promedio de edad de 19.8 años.

En el grupo control se obtuvieron en la saliva estimulada (STHe) un promedio para el pH de  $8.4 \pm 0.31$ , la concentración de proteínas fue de  $8.06 \pm 5.72$ , la absorbancia promedio que determinó el espectrofotómetro fue de 0.43 µg/mL; en la saliva no estimulada (STH) el pH promedio observado fue de  $7.48 \pm 0.55$  y la concentración de proteínas fue de  $8.22 \pm 5.64$  y la absorbancia promedio fue de 0.44 µg/mL.

En el grupo con tratamiento de ortodoncia los resultados promedio y desviación estándar para la saliva estimulada mostraron que el pH fue de  $7.67 \pm .64$  y la concentración de proteínas de  $9.72 \pm 3.97$ , la absorbancia tuvo un promedio de 0.49 µg/mL; para la saliva no estimulada el pH fue de  $6.76 \pm 1.01$ , la concentración de proteínas fue de  $7.96 \pm 2.92$  y la absorbancia promedio de 0.43 µg/mL.

También se muestra el promedio, desviación estándar y la t de Student obtenidos en la determinación de concentración de proteínas y el pH de ambas salivas. Dentro de los resultados se encontró que existieron diferencias estadísticamente significativas en el pH de la saliva total no estimulada  $P < 0.05$  (Cuadro I). Cabe recalcar que los rangos de desviación estándar son amplios debido a que es un estudio piloto.

**DISCUSIÓN**

La cantidad y calidad de la saliva que se secreta depende de procesos locales y sistémicos, incluyendo el control del sistema nervioso simpático y parasimpático, neuropéptidos, hormonales y de estimulación.<sup>8-10</sup> Hernández Herrera y cols,<sup>11</sup> mencionan que la con-

**Cuadro I.** Características de la saliva en pacientes con tratamiento de ortodoncia y grupo control. Posgrado de la Facultad de Odontología UNAM. 2002.

Características de la saliva	Control		Ortodoncia		Prueba estadística	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	t Student	Valor p
Concentración proteínas STHe	8.06	5.72	9.72	3.97	0.932	0.36
Concentración proteínas STH	8.22	5.64	7.96	2.94	0.152	0.88
pH STHe	8.02	0.31	7.67	0.64	1.860	0.08
pH STH	7.48	0.55	6.76	1.01	2.490	0.02*

Fuente: Directa

centración de proteínas totales es menor en los niños estudiados por ellos, que las cifras reportadas en los países desarrollados; ellos trataron de determinar los factores que predisponen a la caries como son el pH, flujo salival en reposo y estimulado, así como la cuantificación de proteínas salivales totales en niños con caries y sin caries; encontraron que existe tendencia al aumento en el flujo de STH y STHe conforme avanza la edad en los niños, lo que no ocurre con las niñas. La diferencia en la concentración de proteínas totales entre niños sin caries y con altos índices de caries fue estadísticamente significativa en las edades de 7 y 8 años con una  $p < 0.005$ . En cambio en las niñas, la diferencia estadísticamente significativa se observó a las edades de 10 y 11 años con una  $p < 0.08$ .<sup>11</sup> En este trabajo se encontró en jóvenes de 15 a 25 años, que el pH promedio fue 7.67 en la saliva estimulada y 6.76 en la saliva no estimulada en el grupo de estudio, lo cual puede indicar que podría existir mayor protección a los tejidos duros dentarios contra la desmineralización al basificarse el pH.

Con respecto a la concentración de proteínas, ésta no presentó diferencia estadísticamente significativa, probablemente debido a que los pacientes no tenían caries y a lo reducido de la muestra, ya que era una muestra cautiva.

En lo que respecta a la concentración de proteínas, Hernández y cols. observaron que al disminuir el porcentaje de caries aumenta la concentración de proteínas. En virtud de que las proteínas salivales desempeñan un papel fundamental contra la caries, ellos consideraron que deben hacerse campañas para mejorar los hábitos alimenticios de los niños, así como crear conciencia en los padres de familia de la necesidad de que sus hijos tengan una dieta balanceada y mejoren sus hábitos de higiene bucal.<sup>11</sup>

Banderas<sup>2</sup> encontró en su estudio sobre la concentración de proteínas totales en saliva total humana que las proteínas no estimuladas, los sujetos de 18 años del sexo masculino presentaron la mayor concentración de proteínas totales ( $1.544 \pm .20$ ), así como los índices más bajos tanto de prevalencia CPOD (6.7) y componente cariado (2.2). Las mujeres de 19 años presentaron la mayor concentración de proteínas ( $1.602 \pm .65$ ), con valores relativamente bajos tanto en la prevalencia de CPOD (10.7) como del componente cariado (1.3). La concentración de proteínas estimuladas fue mayor en los sujetos masculinos de 24 años ( $1.959 \pm 1.16$ ); sin embargo, éstos presentaron una alta prevalencia de CPOD (11.0) y de experiencia de caries (3.6). En lo referente al género femenino, las mayores concentraciones de proteínas estimuladas fueron en el grupo de 17

( $1.742 \pm .12$ ) y 23 años ( $1.720 \text{ mg/mL}$ ); en ambos casos la prevalencia de CPOD fue alta.<sup>2</sup>

Existen diferentes métodos para determinar la concentración de proteínas como: El método de Sedmark y Grossberg,<sup>7</sup> el de Biuret<sup>3</sup> y el método de Bradford.<sup>2,12</sup>

Con este método las proteínas tienen una capacidad de absorción máxima de 465, eso cambia a 595 nm cuando el colorante está unido a las proteínas. Este es el principio básico del azul de Coomassie para la determinación de proteínas por Bradford. El método de Bradford ha sido modificado por Read and Northcote, y estas modificaciones ocasionan un incremento en la concentración del tinte, desarrollando una mayor sensibilidad y una marcada disminución en la variabilidad del color con diferentes proteínas, lo cual es la principal desventaja del método.

La ventaja de este método es su simplicidad (solamente un reactivo) y su rapidez (5 min) la tira del tinte es más sensitiva que la del Folin Fenol y no es afectada por reactivos comunes, se ha demostrado que algunas sustancias pueden interferir con el desarrollo del color pero no hay evidencias de cambios sobre el color de las proteínas.

El método de Bradford puede ser usado en: suero, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, sudor, etc. Y las muestras se pueden almacenar refrigerando a 4° C hasta por 72 horas o bien congelarla a -20°C hasta por dos meses. Una vez obtenidas las muestras deberán centrifugarse a 3,000 rpm/3 min a fin de separar las células u otros detritus celulares.<sup>12</sup>

Las proteínas salivales totales y las específicas pueden determinarse por diversos métodos en búsqueda de su asociación con trastornos de la cavidad bucal o de tipo sistémico.

Como lo muestra un estudio piloto hecho por Charles,<sup>13</sup> en donde sugiere que la proteína c-erbB-2 presente en saliva podría ser una clave en el diagnóstico oportuno de cáncer de mama en hombres y mujeres.<sup>13</sup>

Así como en un estudio realizado en la Universidad de Iowa se encontró que los niveles de calprotectina en saliva estaban aumentados en pacientes con candidiasis.<sup>8</sup>

Hay pocos estudios básicos y clínicos que muestren las características fisiológicas y biológicas de la saliva y su correlación con entidades clínicas específicas de nuestra población.

## CONCLUSIONES

- En este trabajo dentro de los resultados encontramos que existieron diferencias estadísticamente significativas en el pH de la saliva total no estimulada del grupo de estudio ( $t$  de Student  $P < 0.05$ ).

- La aparatología ortodóntica cambia el medio ambiente bucal modificando el pH salival volviéndolo más ácido, en cambio no altera la concentración de proteínas totales.
- Hay que destacar que la saliva en un futuro quizá sea el medio de diagnóstico no invasivo de algunas enfermedades sistémicas y locales.

### AGRADECIMIENTOS

A la dirección de la Facultad de Odontología por el financiamiento del equipo utilizado en esta investigación.

### REFERENCIAS

1. González M, Ledesma C, Banderas JA. Saliva y cavidad bucal: Glándulas salivales: mecanismos fisiológicos de la secreción salival. *Práct Odonto* 1994; 15 Pt.1(6): 7-15.
2. Banderas JA, González B, Sánchez G, Milla E, López A, Vázquez A. Flujo y concentración de proteínas en saliva total humana. *Sal Pub* 1997; 39: 433-41.
3. Denny PC, Denny PA, Klauser DK, Hong SH, Navazesh M, Tabak LA. Age-related changes in mucins from human whole saliva. *J Dent Res* 1991; 70(10): 1320-7.
4. Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. *Arch Oral Biol* 2000; (45): 1-12.
5. Gutiérrez VG. Manual de Prácticas de Bioquímica Práctica V. Cuantificación de Proteínas Salivales. *UNAM Facultad de Odontología* 1995: 36-9.
6. Banderas JA, González M. Saliva y cavidad bucal. Proteínas salivales: funciones biológicas en el mantenimiento de la homeostasis bucal. *Prác Odont* 1994; 15 Pt. II: 13-20.
7. Dawes C, Ong YB. Circadian rhythms in the flow rate and proportional contribution of parotid to whole saliva volume in man. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 1145-53.
8. Kleinegger C, Stoeckel D, Kurago Z. A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod* 2001; 92: 62-7
9. Enberg N, Alho H, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentration in saliva after acute consumption. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod* 2001; 92: 292-8.
10. Pajukoski H, Meurman J, Halonen P, Sulkava R. Prevalence of subjective dry mouth and burning mouth in hospitalized elderly patients and out patients in relation to saliva, medication, and systemic diseases. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod* 2001; 92: 641-9.
11. Hernández HN, Chaves OH, Vega GJ. Cuantificación de proteínas totales en niños de 6-12 años de la Escuela Hermanos Serdán de la Ciudad de Puebla. *Laboratorio de Fisiología Facultad de Estomatología Oral* 1999; 1(2).
12. Gallardo MJ. Protocolos del laboratorio de toxicología y biomedicina experimental. Determinación de proteínas totales método de Bradford. *Labtox, Cibior-IMSS*; 1999.
13. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Cox J, McArthur A, Kingman A, Thigpen T. Reliability assessment of soluble c-erbB-2 concentrations in the saliva of healthy women and men. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod* 2001; 91: 174-9.

Dirección para correspondencia:

**Elba Rosa Leyva Huerta**

Facultad de Odontología

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Subjefatura de Investigación

Tel: 5622 5548 o 5622 5542

Correo electrónico: docelbaleyva@hotmail.com