



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

ELECTROFORESIS DE SALIVA PAROTÍDEA HUMANA EN PAPEL DE FILTRO

Trabajo de investigación correspondiente al 2º año de Adscripción en la Cátedra de Química Biológica.

La electroforesis en papel es uno de los métodos más simples y directos para la separación de mezclas de proteínas y ha tenido vasta difusión como procedimiento de análisis en ciertos líquidos biológicos como, por ejemplo, el suero sanguíneo. En cambio, otros humores ofrecen dificultades para este tipo de estudios, ya sea por su pobre concentración proteínica o por la interferencia que los iones inorgánicos ejercen sobre la migración de las macromoléculas. Esto obliga al tratamiento previo de las muestras, complica el método, y hace difícil la obtención de fraccionamientos reproducibles.

Estos inconvenientes se presentan al análisis de las proteínas de la saliva y, pese al aporte de numerosos autores (1 a 11) no se ha alcanzado a sistematizar un procedimiento que, al par de una técnica accesible, ofrezca resultados reproducibles en distintos laboratorios.

En vista de las posibles aplicaciones biológicas y clínicas que tal estudio ofrece, resulta necesario disponer de una técnica que permita salvar las limitaciones antedichas.

Con este objetivo, hemos tratado de desarrollar un método que brinde ba-

Od. SALVADOR LUIS BELLAVIA (*)

ses más firmes a la investigación clínica en un campo que creemos de promisorias perspectivas.

MATERIAL Y METODOS

Material: Se recogió saliva parotídea de 10 varones y mujeres cuyas edades oscilaban entre 18 y 30 años, sanos, sin alteraciones visibles en las glándulas salivales.

Recolección: Se utilizó el aparato de Lashley, modificado por Curby (12) (Fig. 1). Se tomaron muestras de 6 ml. recolectadas por estimulación con pastillas de mentol. En todos los casos se procedió entre 2 y 3 horas después del desayuno.

La saliva fue recibida en tubos sumergidos en hielo y centrifugada 20

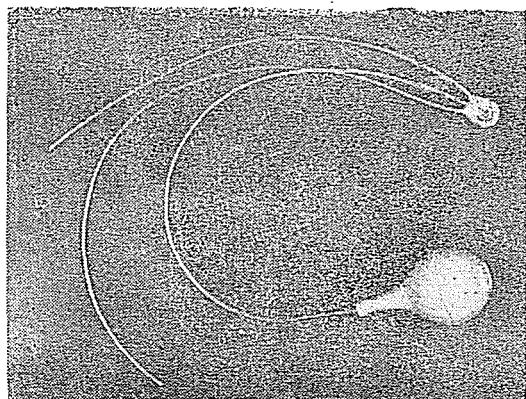


Fig. 1 Aparato colector de saliva parotídea (Lashley-Curby)

*(Ayudante Técnico Auxiliar de la Cátedra de Química Biológica.
Avellaneda 1513 - Córdoba - Rep. Argentina.

minutos a 3.000 r.p.m. Una fracción de 0,3 ml. fue separada y diluida convenientemente para determinar concentración de proteínas totales.

En algunos casos la saliva refrigerada mostró una turbidez de intensidad variable que desapareció a temperatura ambiente.

Concentración

La concentración se realizó por ultrafiltración en el dispositivo ideado por Brusilow y Kupchik (14). El aparato consta de un tubo de vidrio en forma de U de 2 cm. de diámetro cuyos extremos llevan tapones de goma perforados como se aprecia en la figura 2. Dentro del tubo de vidrio se coloca otro de acetato de celulosa de 1 cm. de diámetro, fijado a nivel de los tapones de goma y comunicado al exterior por sendas tubuladuras de vidrio. Además el tubo de vidrio posee a su vez dos tubuladuras laterales que conectan el sistema con un dispositivo de vacío y una inferior, cerrada durante la operación, que sirve para evacuar el ultrafiltrado.

La saliva se introduce en el interior del saco de celulosa y se aplica presión negativa a través de las tubuladuras laterales. Como el tubo de acetato de celulosa utilizado tiene poros de un diámetro de 4,8 micrones, todas las moléculas de alto peso como las proteínas quedan retenidas en él.

Hemos encontrado conveniente efectuar el vacío previo en un tanque hermético y conectar éste al aparato de concentración. Una presión negativa de 60 cm. de Hg. durante 16 hs. es suficiente para eliminar la totalidad del agua de una muestra de 5-ml. Habitualmente se trabaja con una "batería" de tubos de concentración que permite concentrar cuatro muestras

diferentes en forma simultánea.

La ultrafiltración se llevó a cabo a una temperatura de 4°C.

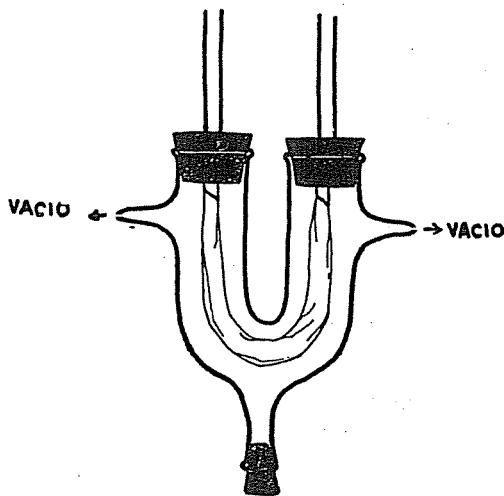


Fig. 2

Eliminación de Partículas

Difusibles

Una vez completada la operación anterior, el residuo del interior del tubo de celulosa fue suspendido en 1 ml. de agua bidestilada y se continuó la ultrafiltración hasta eliminar el agua añadida. El agua hace un "lavado" de la muestra arrastrando sustancias difusibles que interfieren la posterior migración de las moléculas proteicas. Esta acción perturbadora de los iones inorgánicos ha sido demostrada por Fischer y colaboradores (5) y corroborada, en nuestras experiencias. El lavado se repite en la misma forma dos veces más cuidando siempre de ultrafiltrar el máximo posible de agua.

Dilución

El residuo se suspende con 0,05 ml. de Buffer de Veronal pH 8,6 y se deja 30 minutos a temperatura ambiente lo cual facilita la solubilización de las proteínas. Resulta así un volumen total de 0,1 ml. aproximadamente que representa una concentración de 50 veces con relación al volumen original.

Para recuperar la totalidad del líquido del interior del saco de celulosa nos resultó muy práctico valernos de un tubo de polietileno de 1 mm. de diámetro y 10 cm. de largo al cual se le acopló una jeringa de vidrio para poder aspirar.

Determinación de

Proteínas Totales

La concentración de proteínas totales fue determinada en la saliva original después de dilución adecuada, mediante lectura de densidad óptica en la zona del ultravioleta (260 y 280 milimicras) (13).

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman modelo D.U. y se aplicó la siguiente fórmula:

$$(1,55 \times D.280) - (0,76 \times D.260) - \\ \text{Conc. proteínas en mg/ml.}$$

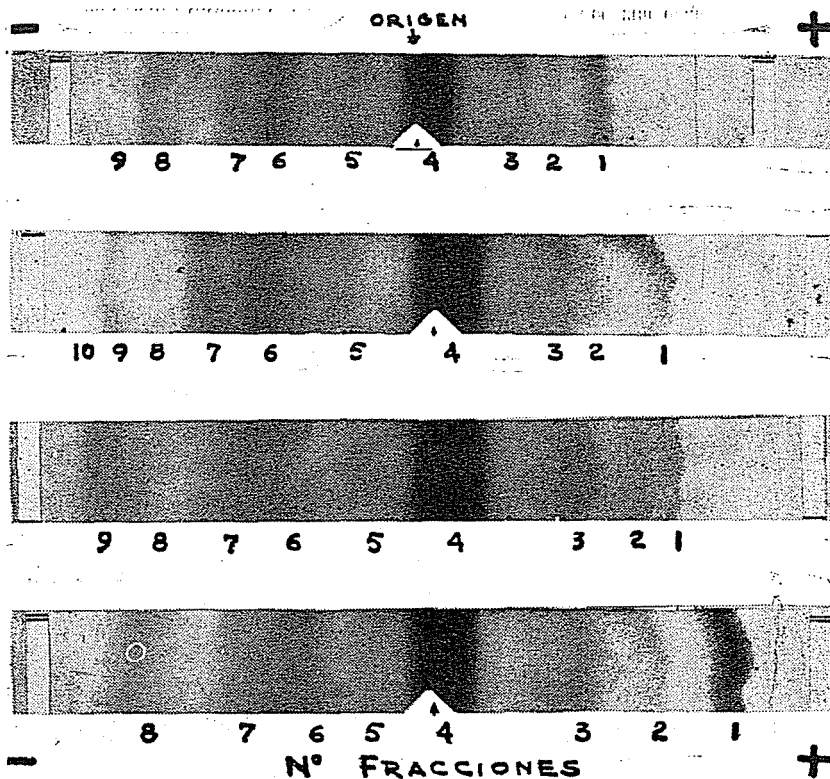


Fig. 3 Proteinogramas de saliva parofidea humana. Las fracciones han sido numeradas partiendo del componente más próximo al ánodo. El punto de origen está señalado con una flecha. Las fotografías de los distintos trazados han sido reproducidas a diferente escala, por lo tanto, las movi- lidades de las fracciones no son estrictamente comparables.

Electroforesis

Se utilizó un aparato Spinco Modelo R. con tiras de papel Whatman N° 1. Se aplicó al papel la totalidad de la muestra concentrada y se hizo migrar utilizando una corriente de 2,5 mA. durante 16 horas, a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo las tiras fueron retiradas del aparato y llevadas durante media hora a una estufa a 115°C para fijar las proteínas.

Coloración

Se ha comprobado que el colorante de elección para proteínas salivales es el Amidoschwartz 10 B, razón por la cual lo hemos adoptado. Las tiras fueron sumergidas durante 3 minutos en una solución de Amidoschwartz al 1% en metanol, ácido acético, agua, 5:1:5 y luego lavadas repetidamente en ese solvente.

La valoración de las diferentes bandas obtenidas se hizo por densitometría en el Analytrol de Spinco (Beckman) con registro e integración automáticos.

RESULTADOS

La electroforesis en papel de saliva parotídea humana permite separar

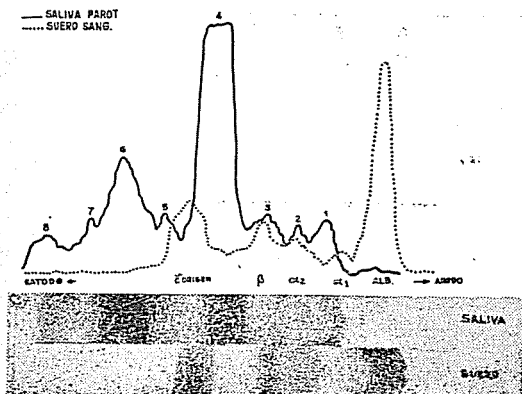


Fig. 4

hasta nueve fracciones proteínicas de diferente movilidad (*). La figura 3 muestra 4 trazados normales en los que se aprecia la complejidad proteica de la saliva humana. Se han numerado las bandas coloreadas partiendo de la fracción más próxima al ánodo.

La figura 4 muestra un trazado normal con su correspondiente curva densitométrica. Con fines comparativos, se ha colocado a la par un proteinograma de suero sanguíneo del mismo individuo cuya migración se realizó simultáneamente y en iguales condiciones.

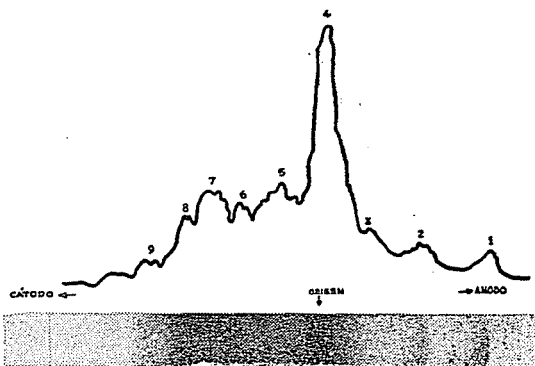


Fig. 5

Como puede apreciarse, la banda 1 migra hacia el lado anódico del punto de origen o "siembra", con una movilidad intermedia entre las de globulinas alfa 1 y alfa 2 del suero sanguíneo. Aunque hay una cierta variación individual en la intensidad, esta fracción siempre está presente y claramente definida. La zona 2 se desplaza con una velocidad semejante a la de globulinas alfa 2. Sus contornos a veces se esfuman lentamente, razón por la cual no siempre es tan neta como en el caso de la figura 4. La banda 3 mi

(*) En uno de los casos estudiados se encontró una décima banda.

gra con una velocidad semejante a la de globulinas beta del suero. La fracción 4 es una ancha banda que se tiñe muy intensamente con el colorante, y por lo tanto, origina el pico más prominente y extenso del trazado. Migra ligeramente hacia el lado anódico del punto de origen y se corresponde en parte, con el frente del área delimitada por las gamma globulinas séricas. Mediante elución del papel y ulterior determinación de actividad enzimática en el eluato, hemos comprobado que en esta zona se encuentra la casi totalidad de la amilasa salival o ptialina. En todos los casos, la banda 4 fue el componente más importante, pero su

6 y 7 aparecieron fusionadas como una amplia zona de tinción homogénea.

Las bandas 8 y 9 son generalmente fracciones débilmente coloreadas. En uno de los casos, la zona 9 no pudo ser detectada.

La concentración de proteínas totales dio un valor promedio de 0,41 g/100 ml. en saliva original, y los resultados de cada caso están expuestos en la tabla 1, pero es de hacer notar que estos valores no pueden aplicarse directamente al cálculo del valor absoluto de las fracciones, pues es muy posible que la cantidad real de proteínas "sembradas" en el papel de electroforesis, haya variado después

VALORES PORCENTUALES DE LAS DIVERSAS FRACCIONES

Nº	sexo	total prot. g/100 ml.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	M	0,4	3,6	5,3	8,0	52,3	11,6	11,4	4,6	1,7	1,5	
2	M	0,51	1,4	1,2	8,1	64,1	2,9	5,6	8,5	4,7	2,8	0,7
3	M	0,40	2,9	2,6	5,9	41,8	16,6	6,7	12,4	6,5	4,6	
4	M	0,40	9,1	5,2	25,7	34,4	3,4	11,1	6,9	2,5	1,7	
5	M	0,47	7,6	5,9	6,1	33,6	5,8	17,8	6,4	13,9	2,9	
6	M	0,53	10,5	17,9	11,6	32,1	5,5	9,4	6,8	4,1	2,1	
7	F	0,31	10,4	5,6	19,2	32,8	7,3	8,0	8,0	6,6	2,1	
8	M	0,50	3,5	5,9	18,3	41,9	11,9	9,2	6,4	2,9	—	
9	M	0,30	6,8	4,5	12,6	37,3	11,9	6,9	9,2	5,6	5,2	
10	F	0,34	2,0	13,1	3,2	33,7	4,7	9,4	18,8	9,4	5,7	
Promedio:		0,41	5,78	6,72	11,87	40,4	0	8,16	9,55	8,80	5,79	2,86

concentración relativa varía dentro de límites amplios. La figura 5 muestra un trazado de un caso en el que esta banda 4 tiene escasa concentración. Las bandas siguientes se desplazan en dirección al cátodo y, por lo tanto, no tienen correspondencia con fracciones del suero sanguíneo. La banda 5 que en algunos casos alcanza una proporción notable, no siempre está claramente delimitada, a causa de la intensa tinción de fondo. La 6 y 7, en cambio, son componentes constantes del trazado y pueden distinguirse con facilidad. En algunos casos las bandas

del procedimiento de preparación de la muestra.

No se observaron diferencias atribuibles al sexo. La tabla 1 resume los porcentajes de las diferentes fracciones en cada uno de los casos estudiados, y en ella pueden apreciarse las variaciones individuales.

DISCUSION

Numerosos autores han realizado estudios electroforéticos de saliva en papel de filtro. Algunos de ellos trabajaron con saliva total (1 a 5); otros, en cambio, lo hicieron con saliva pa-

rotidea (6 a 11). Una revisión de la literatura demuestra la falta de uniformidad en los resultados de diferentes autores. A tal punto que es imposible una adecuada sistematización de las fracciones proteínicas de saliva. En muy pocos trabajos se aprecia una resolución satisfactoria de las bandas y resulta difícil establecer un trazado típico que pueda servir como "patrón" normal.

En los análisis de este tipo, especialmente si se desea proyectarlos al campo de la investigación clínica es necesario que se cumplan al menos dos requisitos: a) la técnica empleada debe tener la sencillez y practicabilidad necesarias para aplicarla al estudio de grupos numerosos; b) los resultados en los grupos normales deben ser reproducibles para disponer de un "patrón" de referencia bien establecido. Para lograr este último objetivo creemos que el factor más importante es la estricta sistematización de la técnica y el empleo de medios inocuos para los componentes proteicos de la muestra durante el tratamiento a que ésta debe someterse.

Hemos descartado la saliva total como material de trabajo, pues siendo ésta la resultante de aportes parciales de diferentes glándulas, puede prestarse a mayores variaciones y hacer más difícil el obtener resultados reproducibles. Además, a pesar de todas las precauciones, es imposible evitar la contaminación con restos alimenticios, bacterias, células descamadas, etc., que acrecientan la complejidad de la muestra e introducen factores completamente extraños en el estudio. Se decidió, por lo tanto, usar saliva parotídea que cumple con las exigencias de ser una secreción pura y homogénea.

Como ya se dijo, para separar satisfactoriamente las proteínas de saliva mediante electroforesis, es necesario eliminar los iones inorgánicos y concentrar las muestras. Para lograr el primer objetivo, la mayoría de los autores hacen diálisis o electrodiálisis. Nosotros hemos reemplazado satisfactoriamente la diálisis por el "lavado" repetido de la preparación. Esto no sólo reduce el tiempo de operación sino también el manipuleo de la muestra.

Para concentrar, se utilizan corrientemente procedimientos de liofilización o de precipitación con reactivos adecuados (9). Esta operación de concentración complica notablemente la técnica, ya que los procedimientos mencionados necesitan de tiempo y medios especiales. Por otra parte, algunas proteínas resultan desnaturalizadas con tales tratamientos.

Por el contrario, la ultrafiltración realizada a 4°C resulta inocua para las proteínas. El sistema utilizado ofrece como ventajas adicionales, la simplicidad, corto periodo de trabajo y la posibilidad de utilizar volúmenes pequeños.

Ha sido probado con técnicas inmunoelectroforéticas que la saliva normal puede contener fracciones proteicas idénticas a algunas de las proteínas del suero sanguíneo. El hecho de que alguna de las fracciones reveladas en la saliva posean la misma movilidad electroforética que proteínas del plasma, no significa "per se" que ellas sean moléculas idénticas, pero es probable que esos componentes de igual movilidad puedan incluir iguales proteínas. Por otra parte, la saliva muestra una serie de bandas que no tienen correspondencia en el trazado del suero sanguíneo, lo que evidentemente señala la

existencia de proteínas salivales "autóctonas".

Se han observado algunas variaciones individuales: ellas radican principalmente en las bandas 3 y 5 que a veces no se destacan claramente, en las 6 y 7, que en ciertos casos se fusionan en una ancha zona coloreada y en las áreas 8 y 9 cuya pobre concentración no siempre permite visualizarlas.

La aplicación futura del método al estudio de las variaciones fisiológicas y patológicas que el trazado proteico puede experimentar, abre un vasto camino a la investigación clínica. La disponibilidad de una técnica "standarizada" y de resultados reproducibles, hace factible encarar esos estudios con más seguras perspectivas.

RESUMEN

Se presenta una técnica sistematizada de electroforesis de saliva parotídea humana en papel de filtro. Se aplican nuevos métodos de concentración y eliminación de partículas difusibles que creemos ventajosos con relación a los utilizados por otros autores.

Se estudiaron salivas parotídeas de diez jóvenes normales de ambos sexos. Se describe el trazado "tipo" normal, refiriendo las variaciones individuales observadas.

Finalmente, se destaca la importancia del método como valioso elemento en la investigación clínica.

SUMMARY

A standardized technique for paper electrophoresis of proteins from human saliva is presented. Advantageous methods for concentration and elimination of inorganic particles are proposed.

Parotid saliva from ten healthy young adults was studied and a "nor-

mal pattern" is described.

The importance of the method as a tool for clinical research is emphasized.

BIBLIOGRAFIA

1. KINERSLY, T. Preliminary paper electrophoretic study of saliva. *Yale J. Biol. Med.* 26: 211, 1953.
2. KINERSLY, T. and LEITE, H. B. Paper electrophoretic study of some components of saliva. *Yale J. Biol. Med.* 29: 496, 1957.
3. GELLER, J. H., HAMES, L. and REVELSTAD, G. H. Electrophoresis of saliva. *J. Dent. Res.* 38: 854, 1959.
4. MENDEL, I. D. and ELLISON, S. A. Characterization of salivary components separated by paper electrophoresis. *Arch Oral Biol.* 3: 77, 1961.
5. FISCHER, G., WYSHAK, H. and WEISBERGER. The separation of salivary proteins by paper electrophoresis under various conditions. *Arch Oral Biol.* 7: 297, 1962.
6. DREYON, D. and DONIKIAN, R. Sur le proteines de la salive parotidienne humaine. *C. R. Soc. Biol. (Par)* 150: 1206, 1956.
7. ZIPKIN, I., ADAMIK, E. R. and SAROFF, H. A. Boundary electrophoresis of human parotid saliva. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95: 69, 1957.
8. FERGUSON, M. H., KRAHN, H. P. and HILDES. Parotid secretion of protein in man. *Canad J. Biochem.* 36: 1001, 1958.
9. HOERMAN, K. C. Zone electrophoresis of human parotid saliva in starch gels. *J. Lab. Clin. Med.* 53: 64, 1959.
10. WEINSTEIN, E., HESKINS and JACSON, S. W. An improved technique for the paper electrophoresis of saliva. *J. Dent Res.* 39: 110, 1960.
11. D'SILVA, J. L. and FERGUSON, D. B. Electrophoresis of human parotid saliva in various media. *Arch Oral Biol.* 7: 563, 1962.
12. CURBY, W. A. Device for collection of human parotid saliva. *J. Lab. Clin. Med.* 41: 493, 1953.
13. LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric method for measuring proteins (en: *Methods in enzymology*/by/ S. P. Colowick and N. O. Kaplan. V. 3: p. 454, 1957).
14. BRUSILOV, S. and KUPCHYK, L. An ultrafiltration cell. *Nature (Lond)* 206 (4981): 294, 1965.