

## CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES SALIVALES CON ÁCIDO SULFOSALICÍLICO DURANTE EL EJERCICIO

JAVIER PORRAS ÁLVAREZ, MGR\*, FERNANDO COTE MOGOLLÓN, MGR\*\*,  
FERNANDO JAVIER ÁVILA CORREA, MGR\*\*\*

Recibido para publicación: 15-04-2014 - Versión corregida: 25-09-2014 - Aprobado para publicación: 04-11-2014

### Resumen

**Objetivo:** Identificar proteínas totales en saliva con ácido sulfosalicílico al 3% en una prueba incremental y determinar la correlación con la intensidad de ejercicio. **Materiales y Métodos:** Este estudio es correlacional descriptivo, la muestra fue constituida por 5 ciclistas profesionales, edad  $23 \pm 5$  (años). La prueba se realizó en Cicloergómetro, iniciando con 100 vatios aumentando la carga de 50 vatios en 50 vatios cada 2 min hasta el agotamiento. La muestra de saliva se recogió en el cambio de carga, una vez colectada se agregó 2.5 ml de ácido sulfosalicílico al 3% y a continuación se leyó en espectrofotómetro. **Resultados:** La concentración de proteínas totales salivales varió desde 2,7 mg/dl hasta 41,2 mg/dl durante el protocolo de ejercicio. Pero no se correlaciona con la intensidad del ejercicio, ya que se obtuvo una correlación de Pearson  $-0,001$  Sig. (Bilateral)  $0,997 > 0,05$ . Los datos fueron procesados en SPSS. **Conclusiones:** El ácido sulfosalicílico al 3% detectó proteínas totales en saliva desde 2,7 mg/dl hasta 41,2 mg/dl durante una prueba incremental. Por otro lado, no se encontró una correlación significativa con la intensidad del ejercicio en el protocolo utilizado.

**Palabras Clave:** Ejercicio, saliva, proteínas.

Porras-Álvarez J, Cote-Mogollón F, Ávila-Correa FJ. Concentración de proteínas totales salivales con ácido sulfosalicílico durante el ejercicio. Arch Med (Manizales) 2014; 14(2):203-9.

Archivos de Medicina (Manizales), Volumen 14 N° 2, Julio-Diciembre 2014, ISSN versión impresa 1657-320X, ISSN versión en línea 2339-3874. Porras Álvarez, J.; Cote Mogollón, F.; Ávila Correa, F.J.

\* Magister en ciencias de la Actividad física y Deporte. Profesor Asistente Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Grupo de investigación FIMED. EMAIL: japadbco@gmail.com

\*\* Magister en fisiología del ejercicio. Profesor Universidad de Pamplona Colombia. Email: fer2avico@hotmail.com

\*\*\* Magister en Pedagogía de la Cultura Física. Docente Escuela de Educación Física, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Chiquinquirá, Colombia. Grupo de investigación FIMED. Email: fernandojavieravilacorre@yahoo.es

## Concentration of salivary total protein during exercise

### Summary

**Objective:** To identify total proteins in saliva of 3% sulfosalicylic acid in an incremental test and determine the correlation with the intensity of exercise. **Materials and Methods:** This descriptive correlational study, the sample consisted of five professional cyclists, age  $23 \pm 5$  (years). The test was performed on a cycle ergometer, starting with 100 W load increasing in 50 vatios 50 vatios every 2 min until exhaustion. The saliva sample was collected at the rate of charge, a time collected added 2.5 ml of 3% sulfosalicylic acid and then read in a spectrophotometer. **Results:** The salivary total protein concentration ranged from 2,7 mg / dl to 41,2 mg / dl during the exercise protocol. But it does not correlate with the intensity of exercise, and a Pearson correlation  $-0.001$  Sig was obtained. (Bilateral)  $0.997 > 0,05$ . The data were processed in SPSS. **Conclusions:** 3% sulfosalicylic acid detected saliva total proteins from 2.7 mg / dl to 41,2 mg / dl during an incremental test. Furthermore, a significant correlation with the intensity of the exercise protocol used was found.

**Keywords:** Exercise, saliva, protein.

### Introducción

La saliva es producida por un grupo de glándulas salivales (parótidas, sublinguales, de von Ebner, palatinas, y otras situadas en la lengua y en las mucosas de la boca) situadas en la cavidad bucal<sup>1-4</sup>. La secreción de la saliva se encuentra, en mayor parte, bajo el control del sistema nervioso autónomo. En reposo la secreción salivar aumenta por la estimulación de los nervios simpáticos y parasimpáticos, pero aumenta predominantemente por la estimulación de la vía parasimpática. De igual forma, durante el ejercicio la secreción salival está bajo el control del sistema nervioso autónomo, pero la estimulación de la vía simpática que predomina durante el ejercicio ocasiona cambios en la composición de diferentes elementos de la saliva como: las catecolaminas<sup>5-7</sup>, el lactato salival<sup>8-11</sup>, los electrolitos salivales "Cl<sup>-</sup>Na<sup>+</sup>"<sup>12,13</sup> y las proteínas salivales. Respecto a las proteínas en la saliva, se han identificado cientos de ellas, entre las que se encuentran histatinas, lisozima, mucinas, inmunoglobulinas, albúmina, Zn-alpha2-glicoproteína, cistatinas,

kallikrein, cromogramina A,  $\alpha$ -Amilasa entre otras, cada una con sus funciones fisiológicas y mecanismos de secreción respectivas<sup>14,15,4</sup>.

La enzima  $\alpha$ -amilasa es una de las proteínas que más se ha estudiado, ya que varía su concentración durante el ejercicio, hecho demostrado por Oliveira,<sup>16</sup> al identificar proteínas totales y diferenciales mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). También se ha sugerido que es el polipéptido  $\alpha$ -amilasa el responsable del aumento de la concentración de proteínas totales salivales en el ejercicio,<sup>17</sup> ya que aumenta progresivamente durante ejercicio incremental según el análisis de densitometría (IOD) para la banda  $\alpha$ -amilasa, correlacionándose con el lactato sanguíneo<sup>16</sup>. También se ha propuesto que es la  $\alpha$ -amilasa la proteína que presenta un mayor aumento en su concentración de acuerdo con la intensidad durante el ejercicio<sup>18,17,19,13,20,21</sup> y aumenta su concentración por estrés psicológico<sup>22</sup>. Por consiguiente, se ha propuesto entonces que la concentración total de proteínas salivales es un método

fiable para la determinación de la intensidad del ejercicio y un marcador bioquímico para determinar el umbral aeróbico<sup>23,18,24,17,25</sup>. Además, la concentración de proteínas salivales es un método bioquímico no invasivo y eficaz para determinar la intensidad del ejercicio<sup>16,17</sup>.

El ácido sulfosalicílico es un reactivo utilizado para determinar proteinuria en pacientes con deficiencia renal<sup>26</sup> y es el método para detectar todo tipo de proteínas en la orina, incluidas las cadenas ligeras. La prueba de ácido sulfosalicílico se realiza mezclando un volumen de orina con un volumen triple de ácido sulfosalicílico al 3% y midiendo posteriormente la turbidez resultante<sup>27</sup>. En el caso de la saliva, los métodos comúnmente utilizados para la determinación y cuantificación de proteínas son: el método de Lowry y el método colorimétrico de azul de Coomassie descrito por Bradford<sup>28</sup>, método de oro por excelencia, que fue utilizado por Banderas<sup>29</sup>, para la cuantificación de las proteínas en saliva por espectrofotometría. Otro método para determinar y cuantificar proteínas en saliva es el SDS-PAGE IOD descrito por Oliveira<sup>16</sup>.

En este estudio se utilizó ácido sulfosalicílico al 3% para identificar proteínas totales salivales y cuantificarlas por espectrofotometría en una prueba de esfuerzo incremental, con el fin de observar si la Concentración de Proteínas Totales en Saliva (CPTSa) presenta correlación significativa con la intensidad del ejercicio. En futuros estudios puede utilizarse el ácido sulfosalicílico como reactivo para la identificación de proteínas totales en saliva y para determinar la intensidad del ejercicio.

## Materiales y métodos

Este estudio es correlacional descriptivo, participaron 5 ciclistas profesionales de resistencia de larga duración, pertenecientes a liga de ciclismo de Norte de Santander Colombia, con edades entre 23±5 años, peso de 63±9 kg, talla de 1,69±9 cm y con 8±5 años de entrenamiento. Todos firmaron un documento

de consentimiento y de pleno conocimiento de los protocolos que se llevaron a cabo antes durante y después de la prueba.

El día anterior a la prueba, los ciclistas se abstuvieron de realizar cualquier tipo de esfuerzo físico intenso. El día de la prueba desayunaron dos horas antes y con el fin de asegurar una adecuada hidratación los sujetos bebieron 350 ml de agua 30 min antes de la realización de la prueba, también fueron instruidos para cepillarse los dientes y limpiar correctamente la cavidad oral la noche anterior y dos horas antes de la colección. Las pruebas se llevaron a cabo entre las 9:00 y las 11:00 a.m., con la temperatura ambiente de 24°C, en el laboratorio de fisiología de ejercicio Universidad de Pamplona donde se adecuaron los equipos de espectrofotometría y cicloergómetro.

La prueba incremental se desarrolló en un ergómetro Cyclus 2, donde se ubicó la bicicleta de propiedad de cada ciclista, antes de iniciar la prueba realizaron ejercicios de estiramientos y un breve calentamiento de 5 min sin carga. Se utilizó el Protocolo Tipo II para cicloergómetro de MacDougal<sup>30</sup>, protocolo escalonado y continuo que comienza con una carga inicial de 100w a una cadencia de pedaleo de 70 hasta 90rpm durante dos minutos, a continuación los incrementos progresivos de carga son de 50 vatios cada 2 minutos hasta el agotamiento (cuando no se logra mantener la cadencia de 70rpm). Las muestras de saliva se colectaron 10 minutos antes de iniciar el ejercicio, después de cada escalón de 2 min en el cambio de carga y 12 minutos después de finalizada la prueba. Para la recogida de las muestras, los sujetos tuvieron que escupir en un recipiente estéril, seguidamente se juagaban la boca con agua desionizada. Una vez colectada la muestra (0,5 ml de saliva), sin centrifugar ni diluir las muestras se agregó 2,5 ml de ácido sulfosalicílico al 3%. Se agito suavemente y se dejó en reposo durante 5 min. A continuación se leyó en el espectrofotómetro génesis 20, frente al blanco de reactivo a 535 nanómetros (nm). La

cuantificación de la concentración de proteínas totales salivales se determinó al dividir la absorbancia de la muestra (absorbancia dada por la lectura del espectrofotómetro) sobre la absorbancia patrón (Absorbancia patrón 0,981) y multiplicarla por la concentración patrón (Patrón de proteínas de 100 mg/dl) como se observa en a continuación:  $0,026/0,981 \times 100 = 2,65$  mg/dl, de esta manera se procedió con cada una de las muestras las cuales arrojaron los respectivos resultados (**Tabla 1**).

Estos datos fueron analizados con estadística descriptiva, los valores promedio muestran inicialmente una tendencia creciente con los incrementos aplicados en el protocolo, como aparece en la tabla anterior, pero para determinar si existía o no una correlación se aplicó el método de correlación de Pearson. Además se analizó el comportamiento de la CPTSa para cada ciclista y en los cambios de carga.

## Resultados

La concentración de proteínas totales salivales (CPTSa) identificadas con ácido sulfosalicílico al 3% y cuantificadas por espectrofotometría varió desde 2,7 mg/dl hasta 41,2 mg/dl durante el protocolo de ejercicio. La CPTSa es diferente para cada ciclista (figura 1) y para

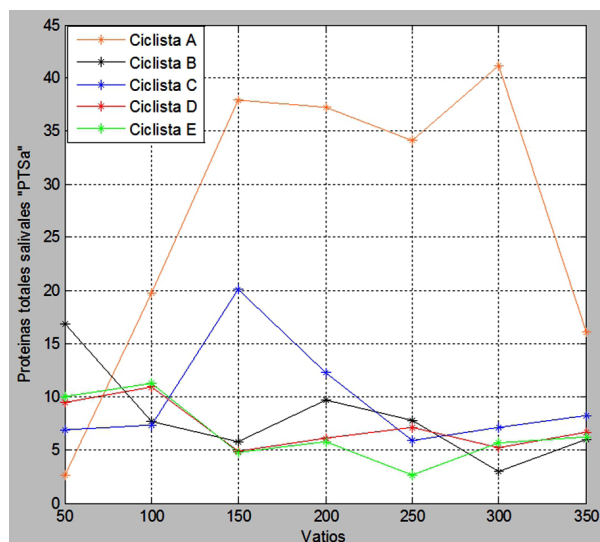
cada etapa de intensidad pero no se correlaciona con la intensidad del ejercicio (figura 2) debido a que el coeficiente de correlación de Pearson = -0,001 Sig. (Bilateral) 0,997.

El interés de este estudio fue determinar la cantidad de proteínas totales salivales producidas durante cada escalón de 2 minutos de ejercicio. Por lo que, con el protocolo utilizado se identificaron en promedio 9 mg/dl de proteínas totales en cada etapa de ejercicio para cada ciclista, lo que significa que durante los 12 minutos que duró la prueba se identificaron en promedio 54 mg/dl de proteínas totales en la saliva para cada ciclista por este protocolo. Los resultados presentados en este estudio solo hacen referencia a los datos del protocolo realizado por esta técnica, esto indica que es apresurado descartar el ácido sulfosalicílico para identificar la CPTSa durante el ejercicio, sería necesario profundizar en la utilización del método. El estudio pretende resaltar la idea de que utilizar la saliva como parámetro fisiológico en la determinación y evaluación de la intensidad del ejercicio, ofrece una nueva alternativa que brinda, gran facilidad en la colección de la muestra, puesto que es indolora y sin el uso de técnicas invasivas, además hace posible recoger en cualquier momento múltiples muestras de forma cómoda, fácil y libre de estrés.

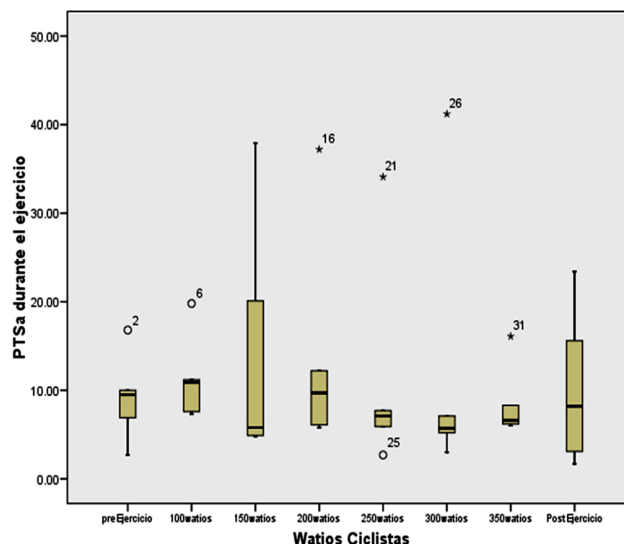
**Tabla 1. Concentración total de proteínas salivales (mg/dl) respecto a la intensidad del ejercicio (vatios), en pre y pos ejercicio**

| Tiempo               | Vatios | A                                | B                                | C                                | D                                | E                                | Promedio Proteínas Totales Saliva (ml/dl) |
|----------------------|--------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|
|                      |        | Proteínas Totales Saliva (ml/dl) | Proteínas Totales Saliva (ml/dl) | Proteínas Totales Saliva (ml/dl) | Proteínas Totales Saliva (ml/dl) | Proteínas Totales Saliva (ml/dl) |                                           |
| 0                    | 0      | 2,7                              | 16,8                             | 6,9                              | 9,5                              | 10,0                             | 9,2                                       |
| 2                    | 100    | 19,8                             | 7,6                              | 7,3                              | 10,9                             | 11,2                             | 11,4                                      |
| 4                    | 150    | 37,9                             | 5,8                              | 20,1                             | 4,9                              | 4,8                              | 14,7                                      |
| 6                    | 200    | 37,2                             | 9,7                              | 12,2                             | 6,1                              | 5,8                              | 14,2                                      |
| 8                    | 250    | 34,1                             | 7,7                              | 5,9                              | 7,1                              | 2,7                              | 11,5                                      |
| 10                   | 300    | 41,2                             | 3,0                              | 7,1                              | 5,2                              | 5,7                              | 12,4                                      |
| 12                   | 350    | 16,1                             | 6,0                              | 8,3                              | 6,6                              | 6,2                              | 8,6                                       |
| 12 min. recuperación | 0      | 15,6                             | 8,2                              | 1,7                              | 3,1                              | 23,4                             | 10,4                                      |

Fuente: Datos recolectados por el autor



**Figura 1.** Comportamiento de las proteínas totales presentes en la saliva de acuerdo a la intensidad del ejercicio (vatios) durante una prueba incremental.



**Figura 2.** Concentración de PTSa en pre y pos-ejercicio, así como a los 100, 150, 200, 250 y 300 vatios de los 5 ciclistas presentes en el estudio.

## Discusión

Los datos de este estudio no presentan una correlación significativa entre la CPTSa y la intensidad del ejercicio (vatios), probablemente, una de las causas es que el protocolo utilizado para coleccionar la muestra de saliva durante el ejercicio incluía enjuagar la boca con agua una vez coleccionada cada muestra de saliva. El agua pudo haber diluido las proteínas salivales tal como lo menciona Taylor<sup>31</sup> quien demostró que incluso un poco de enjuague con agua puede diluir las proteínas salivales en la mucosa oral de hasta 10 minutos después del enjuague. En el estudio de Oliveira<sup>16</sup>, se analizó la correlación entre los valores medianos de la concentración de lactato sanguíneo (medida relacionada con la intensidad del ejercicio) con la concentración de proteína total de la saliva obtenidos de los voluntarios evaluados de cada práctica del ejercicio y reposo, los resultados mostraron un  $r=0,77$  y  $p=0,0004$ , lo que evidenció que la evaluación del lactato puede ser predicha por el análisis de la proteína total de la saliva aunque sus valores sean significativamente diferentes ( $p<0,05$ ).

Los datos hallados en este estudio permiten concluir por un lado que el ácido sulfosalicílico al 3% detectó proteínas en saliva desde 2,7 mg/dl hasta 41,2 mg/dl durante una prueba incremental. Cabe aclarar que se recomienda para futuros estudios, comparar los niveles de proteínas en saliva detectados con ácido sulfosalicílico al 3% con los obtenidos a través de métodos ampliamente utilizados como el de Bradford<sup>28</sup>.

Por otro lado, no se encontró una correlación significativa con la intensidad del ejercicio, posiblemente por el protocolo utilizado en este estudio. No obstante, es apresurado descartar el ácido sulfosalicílico para identificar la CPTSa durante el ejercicio.

Según Quintero y Manrique<sup>32</sup>, es posible correlacionar la intensidad de ejercicio con componentes salivales por medio de métodos no invasivos, de fácil aplicación, rápidos, sensibles y de bajo costo (como la utilización de la saliva), sin embargo se debe estandarizar el procedimiento de recolección y análisis de las muestras y definir los niveles máximos y mínimos de concentración para poder



planear un entrenamiento con la intensidad apropiada.

Existe la necesidad de realizar procesos de investigación en diversos tipos de edad, con el propósito de obtener y comparar los valores promedio de "normalidad" relacionados con la cuantificación de proteínas totales en saliva para población colombiana. Aplicando estos datos en situaciones clínicas, la saliva podrá ser utilizada como un medio de diagnóstico confiable y de bajo costo.

### Agradecimientos

A la Facultad de Educación Física Universidad de Pamplona por facilitar los equipos del laboratorio de fisiología del ejercicio. Al

departamento de bacteriología y laboratorio Clínico U. Pamplona por facilitar los equipos del laboratorio. A Mg. María Del Pilar Trujillo por su colaboración en la identificación y cuantificación de proteínas en saliva y a los ciclistas de la Liga de Norte de Santander por participar de forma voluntaria en la prueba de esfuerzo.

### Conflictos de interés

No hay conflicto de intereses entre los que participaron en la realización del presente estudio.

### Fuentes de financiación

Universidad de Pamplona y Laboratorio Clínico universitario.

## Literatura citada

1. Gómez M, Campos M. **Histología y Embriología Bucodental**. Madrid: Médica Panamericana; 2002.
2. Hand A, Pathmanathan D, Field R. **Morphological features of the minor salivary glands**. *Arch Oral Bio* 1999; 44(1):3-10.
3. Schenkels L, Veerman E, Nieuw A. **Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids**. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6(2):161-175.
4. Bradway S, Levine M. **Salivary glands and saliva**. *Encyclopedia of human biology*; N Y: Academic Press; 1991.
5. Port K. **Serum and saliva cortisol responses and blood lactate accumulation during incremental exercise testing**. *Int J Sports Med* 1991; 12:490-494.
6. Vining R, McGinley R. **The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls**. *J Steroid Biochem* 1987; 27(1-3):81-94.
7. Anderson L, Garrett JR, Jonson D, Kauffman D, Séller P, Tulin A. **Influence and circulation catecholamine on protein secretion into rat parotid saliva during parasympathetic stimulation**. *J Physiol* 1984; 352:163-71.
8. Pérez M, Lucía A, Carvajal A, Pardo J, Chicharro J. **Determination of the maximum steady state of lactate (MLSS) in saliva: an alternative to blood lactate determination**. *J Physiol* 1999; 49(4):395-400.
9. Segura R, Javierre C, Ventura J, Lizarraga M, Campos B, Garrido E. **A new approach to the assessment of anaerobic metabolism: measurement of lactate in saliva**. *Br J Sports Med* 1996; 30(4):305-9.
10. Ohkuwa T, Itoh H, Yamazaki Y, Sato Y. **Salivary and blood after supramaximal exercise in sprinters and long-distance runners**. *Scand J Med Sci Sports* 1995; 5(5):285-90.
11. Mendez J, Franklin B, Kollias J. **Relationship of blood and saliva lactate and pyruvate concentrations**. *Biomedicine* 1976; 25(9):313-4.
12. Chicharro J, Calvo F, Alvarez J, Vaquero A, Bandrés F, Legido J. **Anaerobic threshold in children: determination from saliva analysis in field tests**. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1995; 70(6):541-4.
13. Chicharro J, Pérez M, Carvajal A, Bandrés F. **The salivary amylase, lactate and electromyographic response to exercise**. *Jpn J Physiol* 1999; 49(6):551-4.
14. Castle D, Castle A. **Intracellular transport and secretion of salivary proteins**. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9(1):4-22.
15. Steerenberg P, Van A, Van N, Amerongen A, Biewewnga A, et al. **Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes**. *Eur J Oral Sci* 1997; 105(4):305-9.

16. Oliveira V, Bortolini M, Jeis J, Lamounier R, Espíndola F. **Salivary biomarkers for evaluation of anaerobic threshold.** *Fit Perf J* 2005; 4(2):85-89.
17. Oliveira V, Bessa A, Lamounier R, De-Santana M, De-Mello M, Espindola F. **Changes in the salivary biomarkers induced by an effort test.** *Int J Sports Med* 2010; 31(6):377-81.
18. Diaz M, Bocanegra O, Teixeira R, Soares S, Espindola F. **Response of salivary markers of autonomic activity to elite competition.** *Int J Sports Med* 2012; 33(9):763-8.
19. Van S, Rohleder N, Everaerd W, Wolf O. **Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade.** *Psychoneuroendocrinology* 2006; 31(1):137-141.
20. Chicharro J, Lucía A, Pérez M, Vaquero A, Ureña R. **Saliva composition and exercise** *Sports Med* 1998; 26(1):17-27.
21. Calvo F, Chicharro J, Bandrés F, Lucía A, Pérez M. et al. **Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase.** *Can Journal Applied Physiol* 1997; 22(6):553-61.
22. Nater U, Rohleder M, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, et al. **Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm.** *Int J Psychophysiol* 2004; 22(6):553-561.
23. Díaz M, Bocanegra O, Teixeira R, Espindola F. **Salivary surrogates of plasma nitrite and catecholamines during a 21-week training season in swimmers.** 2013. *PLoS ONE* 8(5): e64043.
24. Bocanegra O, Diaz M, Teixeira R, Soares S, Espindola F. **Determination of the lactate threshold by means of salivary biomarkers: chromogranin A as novel marker of exercise intensity.** *Eur J App Physiol* 2012; 112(9):3195-3203.
25. Bortolini M, De-Agostini G, Reis I, Lamounier R, Blumberg J, Espindola F. **Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold.** *Res Exerc Sport* 2009; 80(3):604-610.
26. Kumar A, Kapoor S, Gupta R. **Comparison of urinary protein: creatinine index and dipsticks for detection of microproteinuria in diabetes mellitus patients.** *J Clin Diagn Res* 2013; 7(4):622-626.
27. Hernando L. **Nefrología clínica.** 3º ed. Madrid: Panamericana; 2008.
28. Bradford M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochemistry* 1976; 72(1-2):248-254.
29. Banderas JA, González M, Sánchez M, Millán E, López A, Vilchis, A. **Flujo y concentración de proteínas en saliva total humana.** *Salud Pública Méx* 1997; 39(5):433-443.
30. Macdougall JD, Wenger HA., y Green HL. **Evaluación Fisiológica del deportista.** Barcelona: Paidotribo; 2000.
31. Taylor N, Van A, Kerry P, McGhee S, Pueblos G, et al. **Observations on saliva osmolality during progressive dehydration and partial rehydration.** *Eur J Appl Physiol* 2012; 112(9):3227-3237.
32. Quintero RI, Manrique FG. **El lactato sanguíneo y su correlación con biomarcadores salivales, como indicadores de la intensidad del ejercicio.** *Rev salud hist sanid on-line* 2011; 6(1):3-11.

