



Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Odontología

“Evaluación de pH y concentración de proteínas totales
y EGF en saliva de fumadores crónicos”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANA DENTISTA
P R E S E N T A

PATRICIA GUTIÉRREZ NOVA

Tutora: Dra. Elba Rosa Leyva Huerta

Asesor: C.D. René Olivares Navarrete

Cd. de México

2005

m. 347313

A mis padres...

Patricia, que siempre ha sabido apoyarme y comprenderme...

Javier, cuya experiencia y ayuda siempre compartió...

...y a la Dra. Elba Rosa Leyva Huerta,
que siempre me dio una oportunidad...

... gracias, sin su apoyo y confianza esto no hubiera sido posible.

Agradezco especialmente...

a mi familia...

... Javier que me acompaña y quiero cada día más
... mis abuelos y tíos en quienes nunca ha faltado el amor y apoyo

incondicionales...

... y Mariana, Polo y Valeria...

mis amigos...

... por su cariño y compañía a través de los años...

... Eliseo, Sandra, Mariana, Zoila, Alfredo...

... y a René Olivares Navarrete cuya guía y enseñanza fueron invaluableles.

ÍNDICE

	pág
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	3
Planteamiento del Problema	15
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivos	17
Tipo de Estudio	18
Universo de Estudio	18
Material y Métodos	20
Selección de Pacientes	21
Recolección de Saliva	22
Determinación de pH	24
Cuantificación de Proteínas	25
Cuantificación de EGF	27
Análisis Estadístico	28
Resultados	29
Discusión	35
Conclusiones	40
Bibliografía	41

ÍNDICE DE TABLAS

	pág
Tabla 1	29
Tabla 2	30
Tabla 3	31
Tabla 4	32

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	pág
Gráfica 1	33
Gráfica 2	33
Gráfica 3	34

RESUMEN

Considerando que el tabaquismo es un factor de riesgo para diversas enfermedades y en las zonas urbanas afecta a la mayoría de la población, nuestro objetivo fue determinar si existe asociación entre el hábito del tabaco fumado y los niveles de pH, concentración de proteínas totales y factor de crecimiento epidermal (EGF). El EGF tiene como función mantener la integridad de los tejidos. su receptor se localiza en superficies celulares y se expresa principalmente en epitelios, hígado y placenta.

Se seleccionaron pacientes voluntarios, masculinos, fumadores, ex fumadores y no fumadores entre 20 y 60 años, que acudieron a consulta a la clínica de admisión de la DEPel de la F. O. de la UNAM. Se les realizó una historia clínica y toma de muestras de saliva total humana (STH) y saliva total humana estimulada (STHe), entre las 8:30 y las 11:30 am. Se midió el pH, se cuantificaron proteínas totales (PT) con el método de Bradford y la cantidad de EGF con la técnica de ELISA.

PT en no fumadores variaron de 0.021 a 2.03 mg/mL, en fumadores de 0.49 a 1.18 mg/mL y en ex fumadores de 0.65 a 1.79 mg/mL en STH. EGF en no fumadores varió de 7.77 a 22.45 ng/mL, en fumadores de 5.03 a 19.22 ng/mL y en ex fumadores de 3.51 a 14.79 ng/mL en STH. El pH fue más alcalino en STHe que en STH. Se encontró una menor cantidad de EGF en el grupo de fumadores a 90% de confiabilidad.

INTRODUCCIÓN

Hablar del tabaco significa, en el caso de México, remontarnos hasta los pueblos prehispánicos, entre los cuales este producto estaba al alcance de todos los grupos sociales y formaba parte de ritos religiosos. Con la revolución industrial a fines del siglo XIX, se da el surgimiento de la industria tabacalera moderna y su crecimiento en todo el planeta. La difusión del hábito de fumar, llevó en los años 50 del siglo XX a la realización de los primeros informes sobre la relación entre el tabaquismo y la salud de la población y se encontró una relación directa entre el consumo del tabaco y el desarrollo de enfermedades pulmonares y cardiovasculares. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que hay casi 1,100 millones de fumadores en el mundo. Del total de la población mundial, 30% de los adultos son fumadores y de estos, 4 millones fallecen al año. Se estima que para el año 2020 habrá más de 8.4 millones de muertes anuales por enfermedades atribuibles al consumo del tabaco.¹

Los datos de la Encuesta Nacional de Adicciones de 1998 indican que 28% de la población entre 12 y 65 años de edad del área urbana son fumadores activos, lo que representa más de 13 millones de personas fumadoras. Además 53% de la población son fumadores involuntarios o pasivos, lo que lleva a señalar que 7 de cada 10 personas en las ciudades de nuestro país se encuentran en mayor o menor grado expuestas a los daños que el tabaco ocasiona.^{2,3}

Considerando que el número de fumadores sigue en aumento, es necesario estudiar y reportar los efectos de éste hábito en fumadores sanos, aún cuando no se presenten manifestaciones clínicas.

ANTECEDENTES

El tabaquismo es la principal causa de muerte prevenible en nuestro país. Los datos nos indican que está relacionado con 45 mil fallecimientos cada año, 145 cada día, que equivalen a 11% total de muertes.²

El humo del cigarrillo entra al organismo por la boca y sale por esta y por la nariz, y está clasificado como un carcinógeno clase A por la OMS (ya que contiene 43 carcinógenos),⁴ siendo tan peligroso para los fumadores como para los no fumadores. La circulación del humo es una micro agresión continua que afecta los dientes, cavidad bucal, faringe, laringe, senos paranasales y parte superior del esófago, además de bronquios y pulmones.⁴ Entre sus efectos encontramos: cáncer pulmonar y cardiopatía coronaria en adultos, bajo peso al nacer, síndrome de muerte infantil súbita por la exposición durante y después del embarazo así como asma, bronquitis, neumonía, infecciones de oído, tos y sibilancia en niños. Cuando se combina el consumo de tabaco con alcohol, el riesgo de padecer cáncer oral aumenta 15 veces más que en personas que no consumen productos de tabaco ni alcohol.^{4,5}

Los productos del tabaco, el consumo excesivo de alcohol y en particular el uso combinado de ambos, son citados como las causas principales del cáncer oral. Un perfil típico de un sujeto de alto riesgo de padecer cáncer oral es: hombre, mayor de 40 años de edad, consumidor de tabaco y/o alcohol en exceso (más de 6 cigarrillos al día y más de dos copas al día), con una relación hombre - mujer de 2 : 1.^{3,4,6} André y cols. reportan que el consumo del tabaco incrementa el riesgo de desarrollar cáncer en laringe y cavidad bucal, siendo mayor el riesgo (2 : 1) en

personas que fuman cigarrillos sin filtro y aquellos que inhalan el humo en comparación a los que no lo inhalan. También encontraron que el riesgo disminuía tras una pausa mínima de 5 años en el consumo del tabaco.⁷

Las neoplasias bucales representan 3% de los cánceres diagnosticados en hombres y 2% en mujeres, la incidencia difiere ampliamente según los hábitos de tabaco prevalentes en diferentes partes del mundo, aumentando considerablemente en sociedades donde el consumo del tabaco empieza a edades tempranas. El carcinoma epidermoide es la neoplasia bucal más frecuente, diagnosticándose en aproximadamente 90% de los casos de cáncer bucal; sus localizaciones más frecuentes son labio inferior, bordes laterales de la lengua y piso de boca. La asociación entre tabaco y cáncer es aún más evidente en pacientes tratados por carcinoma bucal de células planas en los que la tasa de recidiva es del doble en pacientes que continúan fumando después del tratamiento.⁸ El riesgo de padecer un cáncer de cavidad oral en un fumador es 6 veces superior al de un no fumador. Comparados con los no fumadores, los fumadores de cigarrillos que inhalan el humo tienen 27 veces más probabilidades de desarrollar cáncer en boca, 15 veces más de desarrollar cáncer de esófago y 53 veces más de desarrollar cáncer de laringe.^{5, 7}

La cavidad bucal es la que tiene el primer contacto con el tabaco y sufre su acción irritante directa por el calor de la combustión, los componentes tóxicos del humo y la acción carcinogénica de los alquitranes, benzopirenos, radicales libres y nitrosaminas. Todo esto produce además una alteración en el equilibrio de metabolitos antioxidantes en la saliva, produciendo lesiones a corto, mediano y

largo plazo. Se puede decir que el tabaco sobre la boca provoca una sucesión de los daños, que se superponen en el tiempo:

- A corto plazo, trastornos como disminución del gusto y del olfato, halitosis y caries.
- A mediano plazo, se presentan manchas en los dientes, enfermedad periodontal, estomatitis nicotínica y leucoplasias.
- A largo plazo se desarrolla cáncer bucal, de laringe, faringe, esófago y labio.^{5, 9}

La saliva es una secreción exócrina, clara, isotónica, ligeramente ácida y mucoserosa. Es una mezcla compleja de fluidos de las glándulas salivales mayores y menores, del fluido crevicular gingival y que además contiene bacterias bucales y detritos alimenticios. Está compuesta por una variedad de electrolitos, incluyendo sodio, potasio, calcio, magnesio, bicarbonatos y fosfatos.¹⁰ También se encuentran inmunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas y productos nitrogenados como urea y amonio. Los componentes salivales, especialmente las proteínas, son multifuncionales, redundantes y amfifuncionales. A pesar de todos estos componentes, la saliva es un fluido muy diluido con más del 99% de agua. Las glándulas salivales se clasifican en mayores: dos parótidas, una submaxilar y una sublingual y menores: distribuidas en el epitelio del labio inferior, lengua, paladar, carrillos y faringe.^{10, 11}

Las células acinares determinan el tipo de secreción producida por las diferentes glándulas. La secreción se clasifica como serosa, mucosa o mixta; las secreciones serosas provienen principalmente de las glándulas parótidas, las secreciones

mucosas de las glándulas menores y las secreciones mixtas de las glándulas submaxilar y sublingual.¹⁰ El pH normal de la saliva varía entre 6 y 7 y está directamente relacionado con los niveles de CO₂ en sangre y saliva. Las glándulas mayores contribuyen con la mayoría de la secreción, en volumen, mientras que las glándulas menores contribuyen con poco volumen pero la mayor parte de las sustancias de la sangre.^{10, 12}

Las funciones salivales se agrupan en cinco categorías que juntas ayudan a mantener la salud bucal y el balance ecológico apropiado, ellas son: 1) lubricación y protección, 2) amortiguamiento, 3) mantenimiento de la integridad de los dientes, 4) acción antibacterial y 5) sentido del gusto y deglución.^{10, 13}

Las glándulas salivales son de tipo exócrino y como tales secretan fluidos con propiedades inmunológicas y no inmunológicas de protección para los dientes y las superficies mucosas. Dentro de los componentes inmunológicos se encuentran IgA, IgG e IgM, y dentro de los no inmunológicos proteínas, mucinas, péptidos y enzimas.¹⁰

La concentración de proteínas totales y el flujo salival están sujetos a cambios influenciados por los ritmos circadianos y hormonales. También hay factores psicológicos que tienen relación con la composición de la saliva, se ha encontrado que el estrés y la depresión prolongados disminuyen la concentración de proteínas entre 20 y 68 kDa de peso molecular, mientras que en voluntarios bajo condiciones de actividad creativa (investigadores) los valores de proteínas entre 20 y 68 kDa de peso molecular estaban aumentados.¹⁴ El cepillado dental induce cambios transitorios en el flujo salival que se ve incrementado durante los 5 minutos posteriores al cepillado pero disminuye después de 15 minutos; la

concentración total de proteínas no se ve afectada pero si hay un incremento significativo en la concentración de albúmina que se mantiene hasta 45 minutos posteriores al cepillado.¹⁵ El ejercicio habitual (mínimo 6 horas a la semana de actividad aeróbica) también tiene efectos en la concentración salival, disminuyendo la concentración de IgA a pesar de que la concentración total de proteínas se puede encontrar aumentada. El flujo salival disminuye durante la ejercitación aeróbica.¹² La concentración total de proteínas es mayor en casos de inflamación y/o infección bucales.^{11,16} Un flujo salival disminuido por una alta ingesta de medicamentos implica una menor concentración de bicarbonatos, calcio, fosfatos y proteínas totales aumentando las colonias de lactobacilos y el riesgo de desarrollar caries.¹⁷

El promedio de flujo diario de saliva en sujetos sanos varía entre 1 y 1.5 L. El rango aceptado como normal de flujo de saliva total humana (STH) es >0.1 mL/min. Para saliva total humana estimulada (STHe), el volumen mínimo aceptado como normal es de 0.2 mL/min, de cualquier manera, el flujo salival es un evento muy personalizado. En promedio, la tasa de flujo no estimulado es de 0.3 mL/min, en un promedio total de 16 horas diarias para un total de 300 mL. El flujo salival durante el sueño es prácticamente nulo. La tasa de flujo bajo estímulo es máximo de 0.7 mL/min. La saliva estimulada representa entre el 80 y 90% de la producción salival diaria, que se produce principalmente durante las actividades relacionadas con las comidas que son una respuesta directa a la estimulación refleja por estímulos olfatorios, gustatorios y mecánicos (durante la masticación).¹⁸ La cantidad de flujo de STH a lo largo del día también obedece a ritmos circadianos. La secreción salival está bajo control nervioso, es desencadenada por

impresiones olfatorias, gustativas y mecánicas, que llegan a través del nervio facial para concentrarse en el núcleo salival superior, ubicado en el puente del tronco encefálico.¹⁹ Otros factores que pueden alterar la secreción son: físicos, como el dolor, ciertos medicamentos, enfermedades locales y sistémicas, trastornos psiquiátricos, etc.¹⁶

Las glándulas salivales están inervadas por fibras tanto simpáticas como parasimpáticas. Cuando las inervaciones simpáticas dominan, la secreción contiene más proteínas y cuando predominan los impulsos parasimpáticos la secreción es más bien acuosa.^{10,12}

El momento del día con menos flujo es durante el sueño y los picos se dan durante los períodos de mayor estimulación.¹⁶ La época del año con menos flujo salival es en el verano, siendo la que mayor tasa de secreción presenta el invierno. Los cambios y/o deficiencias nutricionales también alteran el flujo y composición salival. Los ritmos circadianos afectan no sólo la cantidad del flujo sino también la concentración de componentes como proteínas y electrolitos. El flujo salival no es el mismo en toda la boca sino que hay variaciones regionales, siendo el piso de boca el área con mayor flujo y el vestíbulo superior la de menor flujo; estas variaciones regionales ejercen una influencia directa en la concentración de productos del metabolismo bacteriano y por lo tanto en la acidez relativa en diferentes áreas de la cavidad bucal. Considerando las variantes de componentes, tipo y cantidad de flujo entre las diferentes glándulas y áreas bucales, se considera que la saliva provee un tipo diferente de protección para cada parte de la cavidad bucal. En múltiples ocasiones, el flujo reducido en

pacientes ancianos corresponde a efectos colaterales de medicamentos y no a la edad.^{10, 20}

Entre las proteínas salivales encontramos al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés). Fue uno de los primeros factores de crecimiento polipeptídicos encontrados. En los 60's, Cohen describió una proteína aislada de las glándulas submaxilares de un ratón macho que causó apertura de ojos y erupción dental prematuros en ratones neonatales. Basados en la aparente maduración histológica y el crecimiento de la epidermis en los tejidos de ratón tratados, se le dio su nombre.²¹ Es una cadena polipeptídica de 53 residuos aminoácidos que contiene 3 puentes disulfuro intermoleculares y resulta idéntica a la β -urogastrona que es un inhibidor de la secreción de ácido gástrico.²² Posteriormente se descubrió que el EGF provoca una serie de respuestas biológicas que son mediadas por su unión específica a un receptor tirosina-cinasa de EGF, localizado en la superficie celular. Las tirosinas cinasas proteicas, juegan un papel importante en la transducción de señales que llevan a la proliferación celular.^{23, 24} El EGF induce proliferación celular en tejidos de origen endodérmico, mesodérmico y ectodérmico, regula la diferenciación tisular, modula la organogénesis, promueve la angiogénesis y acelera la cicatrización de las heridas; actúa como un inhibidor de la secreción de ácido gástrico, estimula la proliferación de células embrionarias y aumenta la liberación de calcio del hueso. También promueve la reabsorción ósea y es un fuerte agente quimiotáctico para fibroblastos y células epiteliales.^{23, 24}

Es parte de una familia de factores de crecimiento relacionados con EGF, que incluye: transforming growth factor α (TGF α), heparin binding EGF-like growth

factor (HB-EGF), epiregulina, amfiregulina (AR), betracelulina (BTC), neuregulina 1, neuregulina 2 y neuregulina 3. El EGF se sintetiza inicialmente como una proteína precursora de 160-170 kDa. La forma madura y soluble de EGF es una proteína de 6.4 kDa que es detectable en muchos tejidos y prácticamente todos los fluidos humanos, en algunos de los cuales se presenta en grandes concentraciones, por ejemplo: orina (80 ng/mL), jugos gástricos (0.3 ng/mL), fluidos seminales (25 ng/mL), sudor axilar (1 ng/mL), líquido amniótico de tercer trimestre de embarazo (3 ng/mL) y leche materna (50 ng/mL).^{23,25}

La síntesis del EGF presente en la saliva se lleva a cabo en las células de los conductos excretores de las glándulas salivales mayores, principalmente en la parótida.^{26,27} En la saliva se encuentran dos formas de EGF, α y β que forman un dímero potencial, pero predomina la forma biológicamente activa β de bajo peso molecular (6.4 kDa). La forma de alto peso molecular, consiste en una porción del precursor de la molécula y lleva dentro de su estructura la forma activa de bajo peso molecular.²⁸ Los niveles de EGF en saliva son más elevados por la mañana y en ayunas y las comidas disminuyen drásticamente su concentración entre un 54 a un 70%, quizá debido a dilución salival por una mayor secreción debida a los estímulos del alimento. Los niveles de EGF se recuperan 3 ó 4 horas después de las comidas. Algunos estudios suponen que los niveles de EGF aumentan con la edad según el desarrollo de las glándulas hasta alcanzar la madurez.²⁰

Hay una serie de factores que afectan la concentración de EGF en saliva: en sujetos con estomatitis aftosa o abscesos amigdalinos, los niveles de EGF son menores; así como en pacientes con úlcera gástrica. En pacientes con carcinoma de células escamosas también se han encontrado niveles bajos de EGF.²¹ Se ha

observado un incremento en la cantidad de EGF liberado a la saliva después de la cirugía de remoción de molares impactados.²⁶ Varios estudios resultan contradictorios a la hora de establecer la concentración de EGF en saliva relacionados con el tabaquismo. Jones y cols., en 1992, encontraron una marcada disminución en la concentración de EGF en STH en pacientes fumadores. Manccini y Veit en 1990, no encontraron diferencias en muestras de SHT. Wang y cols., en 1992 encontraron una reducción a la mitad en la concentración de EGF en STH de pacientes fumadores en comparación a los no fumadores. Trudgill y cols., en 1997, no encontraron diferencias en las concentraciones de EGF en saliva de fumadores y no fumadores.^{29, 20}

En la saliva, el EGF estimula el incremento en el grosor de la mucosa, haciéndola más resistente a la penetración de los iones H^+ y también funciona como un péptido de vigilancia ubicando y promoviendo la reparación de las zonas de mucosa dañada.²⁹ El EGF dispara una cascada de señalización intracelular a través de su unión al receptor de EGF, también conocido como ErbB1, produciendo cambios dentro de las células diana. El receptor de EGF, estimulado por el EGF, provoca la fosforilación de su residuo de tirosina distintivo y fosforila a la proteína adaptadora SHC, subsecuentemente, el complejo activa el camino cinasa de MAP. Esta cascada une el estímulo del EGF con la transcripción genética.^{23, 24}

La diferenciación fenotípica de cualquier célula en los tejidos humanos se regula mediante un complejo patrón de señales extracelulares que se reciben a través de receptores específicos. La interacción de moléculas señalizadoras con sus receptores induce la activación de los receptores y la iniciación de una cascada de

transducción de señales mediada por segundos mensajeros y proteínas cinasas receptoras activadas. En los tejidos neoplásicos, muchos de estos caminos se alteran, resultando en una proliferación autónoma de los tejidos y otros cambios fenotípicos. La expresión de un factor de crecimiento por células que expresan receptores para el mismo factor puede crear un recodo de crecimiento autócrino, lo que resultará en un crecimiento autónomo auto sustentable. Algunos recodos autócrinos son específicos de un tipo celular y otros pueden ser más generales. Los tumores humanos en ocasiones muestran una expresión aberrante o alteraciones genéticas de los factores de crecimiento y sus receptores, lo que puede conferirles autonomía de crecimiento o interferir con la apoptosis por medio de mecanismos autócrinos, parácrinos y juxtácrinos. Los factores de crecimiento median, al menos en parte, la compleja interacción entre células neoplásicas y del estroma que influyen la neovascularización y el potencial metastático del tumor. EGF, TGF α y el receptor de EGF están ampliamente expresados en células del cáncer y estos factores pueden actuar como señales autócrinas promotoras de tumor.¹³

La saliva para su análisis se puede recolectar en estados pasivo o estimulado. Los cambios en el flujo están mediados por cambios en la actividad autónoma, con cambios significativos en el flujo en seres humanos cuando están bajo el influjo del sistema parasimpático.³⁰

Ya que a nosotros nos interesa determinar el pH salival de fumadores, ex fumadores y no fumadores es importante conocer que entre más grande es la concentración e iones hidrógeno, más bajo es el pH de una solución. Los iones de

hidrógeno se encuentran también en soluciones alcalinas, pero en concentraciones más bajas. El producto de estos iones en todas las soluciones, es una constante igual a 1×10^{-14} . Para medir la acidez o alcalinidad de una solución es necesario medir solamente la concentración de iones hidrógeno, lo que puede haceremos con un medidor de pH. En la determinación electroquímica del pH se utiliza la diferencia de un potencial eléctrico entre dos soluciones de diferente pH, separadas por una membrana de un vidrio especial. Un sistema completo para la medición del pH, está integrado por un electrodo de vidrio, un electrodo de referencia, un medidor de pH y una solución de muestreo.³¹

Para la cuantificación de proteínas totales nosotros emplearemos la técnica de Bradford, descrita por primera vez en un ensayo publicado por Bradford en 1976, que se basa en la unión de una molécula de azul de Coomassie G250 a una proteína, de esta manera al evaluar por medio de un espectrofotómetro la absorbancia a 595 nm estaremos determinando la cantidad de colorante y por lo tanto, de manera indirecta, la cantidad de proteína en la muestra analizada. Este procedimiento es relativamente libre de interferencia por la mayoría de los reactivos biológicos utilizados, aún así, los detergentes pueden afectar de manera significativa la absorbancia o la respuesta de las proteínas al colorante, por lo que estos deben ser retirados de la muestra por medio de la filtración en gel o la diálisis. De manera alternativa, deben ser incluidos el blanco y los estándares de calibración en las mismas concentraciones que se encontraron en la muestra.³²

La cuantificación de EGF se hará con la técnica de ELISA empleando un kit comercial para la cuantificación de EGF humano (ELISA Kit KHG0061 biosource). Esta técnica así llamada por sus siglas en Inglés Enzyme Linked-Immuno-Sorbent

Assay, consiste en un sándwich de fase sólida que se logra de la siguiente forma: Un anticuerpo policlonal específico para EGF humano (hEGF), se coloca cubriendo los pozos de una placa. A continuación, las muestras incluyendo estándares de con una concentración conocida de EGF, controles y muestras desconocidas, se pipetea en cada pozo. Durante la primer incubación el antígeno de hEGF se une al anticuerpo inmovilizado en un sitio. Después se lava y se añade un anticuerpo monoclonal biotilnado, específico para hEGF. Durante la segunda incubación, este anticuerpo se une al hEGF que fue capturado durante la primera incubación. Después de remover el exceso del segundo anticuerpo, se añade una enzima que se une al anticuerpo biotilnado para completar un sándwich de cuatro capas. Después de una tercera incubación y de lavar, para remover los restos de enzima que no se unieron, se añade una solución de sustrato, que va por encima de la enzima unida para producir una coloración. La intensidad de dicha tinción será directamente proporcional a la concentración de hEGF presente en la muestra original.³³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿ El tabaquismo influye en la concentración de proteínas totales, EGF y pH en la saliva?

JUSTIFICACIÓN

Siendo el EGF una hormona que propicia la reparación y proliferación de una gran cantidad de tejidos, incluyendo los epitelios bucales y estando íntimamente ligada al desarrollo de neoplasias, se consideró estudiar si el tabaquismo altera de manera significativa su presencia en la saliva, lo que ocasionaría alteraciones a nivel del epitelio bucal.

Es necesario hacer una cuantificación previa de la concentración de proteínas en todas las muestras para poder evaluar si verdaderamente el humo de tabaco altera específicamente la concentración de EGF y no a todas las proteínas de manera general.

Considerando que el pH salival se ve afectado por los niveles de CO₂ en sangre y saliva, el tabaquismo crónico podría alterarlo, siendo un factor de riesgo para el desarrollo de caries y enfermedad periodontal.

HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación

Los niveles de EGF y la concentración de proteínas totales se encontrarán en menor cantidad y el pH ácido en el grupo de fumadores.

Hipótesis nula

Los niveles de EGF y la concentración de proteínas totales se encontraran en mayor cantidad y el pH básico en el grupo de fumadores.

Hipótesis alterna

No se encontrarán cambios en los niveles de EGF, ni en la concentración de proteínas totales, ni en el pH en el grupo de fumadores.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto del tabaquismo crónico en la concentración salival de EGF, proteínas totales y pH.

Específicos

1. Estudiar los efectos del tabaquismo en la concentración de proteínas totales en STH y STHe en fumadores crónicos y ex fumadores.
2. Analizar los efectos del tabaquismo en la concentración de proteínas totales en STH y STHe en no fumadores.
3. Cuantificar los efectos del tabaquismo sobre la concentración de EGF en STH y STHe en fumadores crónicos y ex fumadores.
4. Evaluar la concentración de EGF en STH y STHe de sujetos no fumadores.
5. Determinar el tipo de pH en STH y STHe en fumadores crónicos y ex fumadores.
6. Evaluar los efectos del humo de tabaco en el pH de STH y STHe de sujetos no fumadores.
7. Relacionar los resultados obtenidos del muestreo.

TIPO DE ESTUDIO

Estudio comparativo, observacional y transversal.

UNIVERSO DE ESTUDIO

Grupo 1 (fumadores) - Criterios de inclusión

Edad: 20 a 60 años

Sexo: Masculino

Historia de tabaquismo: 5 años continuos, previos. Mínimo 6 cigarros diarios.

No padecer enfermedades psiquiátricas.

No padecer trastornos psicológicos crónicos.

No realizar actividad deportiva de alto rendimiento (más de 6 hrs. a la semana).

No padecer enfermedades sistémicas ni de la cavidad bucal al momento de la toma de la muestra ni haberlas tenido en el último mes.

Aceptar voluntariamente su participación en el estudio.

No estar bajo tratamiento hormonal.

No haber sido objeto de intervenciones quirúrgicas en los dos meses previos.

Grupo 2 (no fumadores) - Criterios de inclusión

Edad: 20 a 60 años

Sexo: Masculino

No fumadores.

No padecer enfermedades psiquiátricas.

No padecer trastornos psicológicos crónicos.

No realizar actividad deportiva de alto rendimiento (más de 6 hrs. a la semana).

No padecer enfermedades sistémicas ni de la cavidad bucal al momento de la toma de la muestra ni haberlas tenido en el último mes.

Aceptar voluntariamente su participación en el estudio.

No estar bajo tratamientos hormonales.

No haber sido objeto de intervenciones quirúrgicas en los dos meses previos.

Grupo 3 (ex fumadores) - Criterios de inclusión

Edad: 20 a 60 años

Sexo: Masculino

Historia de tabaquismo: Haber fumado mínimo 6 cigarros diarios por cinco años continuos y no haber fumado en los últimos 6 meses.

No padecer enfermedades psiquiátricas.

No padecer trastornos psicológicos crónicos.

No realizar actividad deportiva de alto rendimiento.

No padecer enfermedades sistémicas ni de la cavidad bucal al momento de la toma de la muestra ni haberlas tenido en el último mes.

Aceptar voluntariamente su participación en el estudio.

No estar bajo tratamiento hormonal.

No haber sido objeto de intervenciones quirúrgicas en los dos meses previos.

Criterios de exclusión

Se eliminaron a todos los sujetos que no cumplían con todos los requisitos anteriores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Tubos Costar desechables de polipropileno, con tapa roscable de 15 mL

Tubo de plástico suave de 0.5 cm. de diámetro

Gradillas

Etiquetas

Vasos de precipitados

Tubos de microcentrífuga tipo Eppendorff

Cubetas de polipropileno para espectrofotómetro de 1.5 mL

Puntas para micropipeta de 2, 20 y 100 μ L

Piseta

Kit de Elisa de la casa Biosource KHG0061

Reactivos

Agua destilada

Agua desionizada

Soluciones buffer pH 7.0, 10.0 y 4.0

Solución de seroalbúmina bovina 0.5 mg/mL

Reactivo de Bradford

Etanol

Estándares de hEGF

Buffer para dilución de las muestras (15mM sodium azide)

Conjugado de Biotina hEGF

Peroxidasa – Estreptavidina

Cromógeno estabilizado (Tetramethylbenzidina)

Placas de ELISA cubiertas de anticuerpo para hEGF

Buffer de lavado

Equipo

Congelador (-20 y -70° C)

Potenciómetro

Espectrofotómetro

Lector de placas de ELISA

Computadora

METODOLOGÍA

1. Selección de pacientes

Se solicitó la cooperación para el estudio a un todos los pacientes hombres entre 20 y 60 años, que acudieron a consulta a la clínica de admisión de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

A los 49 pacientes que aceptaron por escrito su participación en el estudio, se les realizó una encuesta y revisión clínica, para conocer sus antecedentes de tabaquismo, edad, antecedentes médicos, antecedentes odontológicos y estado de salud bucal. Posteriormente se citaron para la toma de la muestra de saliva explicándoles que debían abstenerse de comer, fumar y lavarse los dientes dos

horas antes. A todos los pacientes se les citó para la toma de muestra entre las 8:30 y las 11:30 de la mañana.

22 pacientes acudieron a su cita, lo que determinó la muestra final: 10 no fumadores, 9 fumadores y 3 ex – fumadores.

2. Recolección de saliva

Procedimiento:

Saliva no estimulada (STH)

1. Se le solicitó al paciente que se enjuagara la boca con agua.
2. Se le indicó al paciente que colectara la saliva dentro de la boca, con los labios cerrados durante un minuto tras el cual la vertiera en el tubo colector.
3. Se repitió la operación dos veces más y se descansó un minuto.
4. Nuevamente se colectó saliva por tres minutos.
5. Se descansó un minuto y se repitió la operación una última vez.

Saliva estimulada (STHe)

1. Se le solicitó al paciente que se enjuagara la boca con agua nuevamente.
2. Se le dio al paciente una porción de 10 mm de tubo de plástico suave como estímulo masticatorio.
3. Se le indicó al sujeto realizar 20 movimientos de masticación por minuto. Al cabo de cada minuto, el sujeto colocó la saliva producida en el tubo colector y repitió la operación.
4. 1 min. de descanso.

5. Se repitió la operación 2 veces más.

Consideraciones

1. Las muestras se tomaron entre las 8:30 y 11:30 de la mañana, en una sola sesión por sujeto.
2. Los sujetos tenían dos horas de ayuno tanto de líquidos como de sólidos y no habían fumado ni realizado su higiene bucal dos horas antes.
3. Antes de iniciar la toma de la muestra se le dieron al individuo las siguientes indicaciones: mantener las manos al frente, los ojos abiertos y hacer la menor cantidad de movimientos posibles, incluyendo el deglutir.
4. Se explicaron previamente a los sujetos el procedimiento en su totalidad, para disminuir posibles efectos de xerostomia debidos ansiedad.
5. En los casos en que no se obtuvo un mínimo de 1.5 mL de saliva con el procedimiento anterior se realizaron ciclos complementarios de recolección con descansos de 2 minutos entre ciclo y ciclo, hasta obtener mínimo 1.5 mL de saliva.
6. Las muestras se colectaron en un tubo de propileno desechable estéril, con tapa roscable de 15mL, marca Costar. Un tubo por sujeto para STH y otro para STHe.
7. Las muestras se etiquetaron y congelaron a -70° C para su almacenamiento durante la fase de recolección.
8. Para el análisis de las muestras se pasaron a 5° C durante 24 horas y posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente por 2 horas.³⁰

3. Determinación de pH

Procedimiento:

Calibración del potenciómetro:

1. Instalar el electrodo y el sensor de temperatura en sus respectivos conectores.
2. Para calibrar y medir el pH se quitar el capuchón de humectación de la parte inferior del electrodo.
3. Oprimir la tecla marcada pH.
4. Sumergir el electrodo de pH y el sensor de temperatura en la solución buffer de pH 7.00. permitir que se estabiliza la lectura. Girar el control "slope" al 100%.
5. Ajustar el control "calibrate" hasta que el display indique la lectura 7.00 de la solución patrón.
6. Retirar el electrodo y el sensor de temperatura de la solución y enjuagar con agua destilada.
7. Sumergir el electrodo y el sensor en la segunda solución buffer de pH 4.01 o 10.00 (debe tener la misma temperatura que la primera).
8. Ajustar el control "slope" hasta que el display indique el valor de la segunda solución patrón.
9. Retirar el electrodo y el sensor de temperatura, enjuagar con agua destilada y proceder a efectuar las mediciones de las soluciones desconocidas.

10. Para cada medición se sumerge el electrodo en cada tubo de muestra, cada uno de los cuales se coloca previamente en el vórtex por 10 segundos.

Cada lectura se realizó por triplicado y se promediaron los tres datos para obtener el valor final.

Consideraciones

1. Usar el medidor de pH modelo 120 de Conductronic, con una indicación digital con una resolución de 0.001 pH y 1 mV en rangos de 0.00 a 14.00 unidades de pH y de 0 a +/- 1999 mV.
2. Usar una solución buffer (patrón) fresca cada vez que se calibre.
3. Los electrodos, las soluciones patrón y las muestras deben mantenerse a la misma constante de temperatura.
4. Diversos ciclos de temperatura de las soluciones patrón o muestras provocan variaciones que pueden afectar la lectura.
5. El segundo punto de calibración no debe estar más alejado que 3 +/- unidades de pH de la solución problema a analizar.³¹

4. Cuantificación de proteínas totales (técnica de Bradford)

Procedimiento:

Con seroalbúmina bovina (BSA) realizar una curva estándar con diferentes concentraciones (0, 1, 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg) a la cual se le extrapolan las absorbancias obtenidas en cada muestra para determinar su concentración de proteínas totales.

1. Pipetear 2, 5, 10, 20, 30 y 40 μL de solución de BSA 0.5mg/mL, equivalentes a 1, 2.5, 5, 10, 15 y 20 μg de BSA en seis cubetas diferentes.
2. Llevar el volumen total de cada cubeta a 1 mL con reactivo de Bradford y aparte colocar 1 mL de reactivo en una séptima cubeta que funcionará como blanco.
3. Medir la absorbancia a 595 nm (A_{595}) de los estándares contra el blanco entre 2 minutos y una hora posteriores a la mezcla.
4. Tomar 800 μL de cada tubo de muestra que se colocaron en tubos de microcentrífuga (previamente etiquetados) y se centrifugaron a 6000 \times g por 10 minutos.
5. Para cada muestra pipetear 10 μL de sobrenadante de cada tubo de microcentrífuga en una cubeta y llevar el volumen total a 1 mL con reactivo de Bradford y leer la absorbancia a 595 nm.

Cada ensayo se hizo por triplicado y se promediaron las tres lecturas obtenidas en cada caso para obtener el valor final.

Consideraciones:

1. Es preferible usar una semi-micro cubeta desechable, nueva, de poliestireno, que se reemplaza tras una serie de análisis de absorbancia.
2. Las cubetas se enjuagan con etanol después de usarse. Colocar en cero el espectrofotómetro con el blanco del reactivo sin retirar posteriormente la cubeta del aparato.
3. Las muestras se cambian de la cubeta con una pipeta de polietileno desechable.

4. La curva estándar no es lineal y la absorbancia precisa varía dependiendo del tiempo que el reactivo tenga almacenado. En consecuencia, es esencial, construir una curva de calibración nueva para cada serie de análisis. El hecho de que la curva estándar no sea lineal con altos niveles de proteínas se debe a que la cantidad de colorante libre se agota, si esto ocurre, el ensayo, se puede alinear promediando el rango de absorbancias a 595 y a 465 nm.³²

5. Cuantificación de EGF

Procedimiento

1. Añadir 100 μ L de estándares, controles y muestras a los pozos designados.
2. Tapar la placa e incubar por dos horas a temperatura ambiente.
3. Aspirar y lavar cuatro veces con 0.4mL/pozo con solución para lavar.
4. Añadir 100 μ L del conjugado de biotina específico para el antígeno a cada pozo.
5. Tapar la placa e incubar por una hora a temperatura ambiente.
6. Aspirar y lavar cuatro veces con 0.4 mL/pozo con solución para lavar.
7. Añadir 100 μ L de Streptavidina- HRP a cada pozo excepto al blanco.
8. Tapar la platina e incubar por treinta minutos a temperatura ambiente.
9. Aspirar y lavar cuatro veces con 0.4 mL/pozo con solución para lavar.
10. Añadir 100 μ L de cromógeno estabilizado a cada pozo.
11. Incubar treinta minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
12. Añadir 100 μ L de solución de alto a cada pozo.
13. Leer la absorbancia a 450 nm.

Consideraciones:

1. Las muestras, ya centrifugadas, se descongelan a temperatura ambiente y se agitan antes de usarlas.
2. Leer la absorbancia en las dos horas siguientes al término del análisis.
3. Evitar la exposición prolongada a la luz del cromógeno ya que es fotosensible; así como su contacto con sus superficies metálicas.
4. Al lavar manualmente no tocar el fondo ni las paredes del pozo, dejar actuar a la solución para lavado de 15 a 30 segundos, aspirar la solución e invertir la platina sobre papel absorbente.
5. Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura de la habitación y agitarlos antes de iniciar el análisis.
6. Correr una curva control en cada análisis.³³

6. Análisis estadístico

1. Promedios
2. Desviaciones estándar
3. U de Mann-Whitney

RESULTADOS

El total de pacientes muestreados fue de 22: 10 no fumadores, 9 fumadores y 3 ex fumadores. A cada paciente se le tomaron dos muestras, una de STH y una de STHe. Todas las mediciones de pH se hicieron por triplicado, promediando esos tres valores para obtener el resultado final. Para determinar la concentración total de proteínas también se hicieron las lecturas por triplicado y se sacó el promedio de las tres para el resultado final que se reporta en las tablas.

Tabla 1

Resultados grupo 1 (pacientes no fumadores)

número	edad	PT STH mg/mL	PT STHe mg/mL	EGF STH ng/mL	EGF STHe ng/mL	pH STH	pH STHe
1	21	0.21	0.48	13.99	1.81	7.59	7.7
2	22	2.19	1.72	22.39	19.57	7.29	7.24
3	25	0.82	0.59	10.46	6.71	7.73	7.68
4	27	1.99	1.50	14.54	12.18	7.86	7.93
5	30	0.88	0.49	22.45	2.93	7.07	7.77
6	33	0.58	0.68	7.77	9.91	7.34	8.04
7	42	0.85	0.72	9.36	1.95	7.59	7.98
8	49	1.00	1.30	12.26	6.78	7.18	7.66
9	51	0.78	0.60	12.09	4.51	7.78	8.43
10	54	2.03	1.31	22.28	11.46	7.28	7.6

En la tabla 1 se agrupan los resultados de la concentración de proteínas totales, EGF y pH en STH y STHe y las edades de los sujetos del grupo 1 (no fumadores). Podemos observar que la concentración de proteínas totales es menor en la mayoría de los casos en STHe excepto en los sujetos 6 y 8. En el caso de la concentración de EGF resultó ser menor en STHe que en STH excepto en el

sujeto 6. El pH se encontró más alcalino en STH que en STHe en los sujetos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 y más ácido en los sujetos 2 y 3. Los valores de proteínas totales en STH variaron de 0.21 a 2.19 mg/mL y en STHe de 0.48 a 1.72 mg/mL. Los valores de EGF en STH variaron de 7.77 a 22.39 ng/mL y en STHe de 1.81 a 19.57 ng/mL. Los valores de pH en STH variaron de 7.07 a 7.86 y en STHe de 7.24 a 8.43; siempre ligeramente alcalinos.

Tabla 2

Resultados grupo 2 (pacientes fumadores)

número	edad	PT STH mg/mL	PT STHe mg/mL	EGF STH ng/mL	EGF STHe ng/mL	pH STH	pH STHe
11	22	1.18	0.86	15.13	8.53	7.28	7.9
12	23	0.77	0.80	5.03	2.55	7.85	7.77
13	23	1.35	0.71	14.8	3.88	7.3	8.44
14	29	0.58	0.61	7.97	11.67	7.36	7.22
15	33	0.49	0.24	7.96	22.84	7.39	7.64
16	35	1.02	0.55	18.04	5.94	7.57	7.44
17	42	0.77	0.51	19.22	11.22	6.93	6.95
18	49	1.13	0.84	9.8	2.49	6.5	8.09
19	60	0.58	0.84	5.04	13.2	6.76	7.19

En la tabla 2 se agrupan los resultados de la concentración de proteínas totales, EGF y pH en STH y STHe y las edades de los sujetos del grupo 2 (fumadores). Observamos que la concentración de proteínas totales es menor en STHe que en STH en 7 de los 9 casos, siendo las excepciones los sujetos 12 y 14. En el caso de la concentración de EGF, esta resultó ser menor en STHe que en STH también en 7 casos, pero las excepciones (los sujetos 14 y 15), mostraron niveles mucho más altos en STHe. El pH se encontró más alcalino en STHe en 6 de los nueve casos y ligeramente más ácido en los sujetos 12, 14 y 16. Los valores de

proteínas totales en STH variaron de 0.49 a 1.18 mg/mL y en STHe de 0.24 a 0.86 mg/mL. Los valores de EGF en STH variaron de 5.03 a 19.22 ng/mL y en STHe de 2.49 a 22.84 ng/mL. Los valores de pH en STH variaron de 6.5 a 7.85 y en STHe de 7.24 a 8.44; apareciendo en ambos grupos valores ligeramente ácidos y ligeramente alcalinos.

Tabla 3

Resultados grupo 3 (pacientes ex – fumadores)

número	edad	PT STH mg/mL	PT STHe mg/mL	EGF STH ng/mL	EGF STHe ng/mL	pH STH	pH STHe
20	20	1.25	1.01	14.79	15.51	7.55	7.62
21	47	1.79	1.04	12.62	4.32	6.43	7.4
22	52	0.65	0.53	3.51	17.23	7.34	7.58

En la tabla 3 se agrupan los resultados de la concentración de proteínas totales, EGF y pH en STH y STHe y las edades de los sujetos del grupo 3 (ex fumadores). En este grupo la concentración total de proteínas siempre fue menor en STH que en STHe. En el sujeto 20 la concentración de EGF fue ligeramente mayor en STHe, en el sujeto 21 fue la concentración fue mucho menor en STHe y en el sujeto 22 la cantidad de EGF resultó casi cinco veces mayor en STHe. En todos los casos el pH fue más alcalino en STHe. Los valores de proteínas totales en STH variaron de 0.65 a 1.79 mg/mL y en STHe de 0.53 a 1.04 mg/mL. Los valores de EGF en STH variaron de 3.51 a 14.79 ng/mL y en STHe de 4.32 a 17.23 ng/mL. Los valores de pH en STH variaron de 6.43 a 7.55 y en STHe de 7.4 a 7.62; apareciendo en sólo un valor ácido en STH.

Es importante señalar que en los grupos 2 y 3 (fumadores y ex fumadores) si se encontraron valores de pH ácidos al contrario que en el grupo 1 que variaron de casi neutros a ligeramente alcalinos.

El rango mayor entre concentraciones en el mismo tipo de muestra se observó en la concentración de EGF tanto en STH como en STHe.

Tabla 4

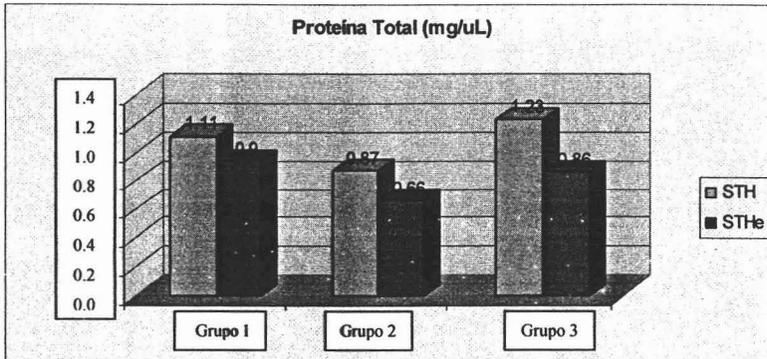
Promedios y desviaciones estándar

Promedios	PT STH mg/mL	PT STHe mg/mL	EGF STH ng/mL	EGF STHe ng/mL	pH STH	pH STHe
Grupo 1	1.11 ± 0.71	0.94 ± 0.47	14.8 ± 5.62	7.8 ± 5.60	7.5 ± 0.27	7.8 ± 0.32
Grupo 2	0.87 ± 0.31	0.66 ± 0.21	11.4 ± 5.45	9.1 ± 6.53	7.2 ± 0.42	7.6 ± 0.48
Grupo 3	1.23 ± 0.57	0.86 ± 0.29	10.3 ± 5.99	12.4 ± 7.01	7.1 ± 0.58	7.5 ± 0.12

En la tabla 4 apreciamos que en promedio hubo una menor concentración de proteínas totales en STHe que en STH en los tres grupos. Tanto en el grupo 1 como el grupo 2 la concentración de EGF fue menor en STHe que en STH, al contrario que en el grupo 3. En cuanto al pH, en todos los grupos se encontró en promedio más alcalino en STHe que en STH.

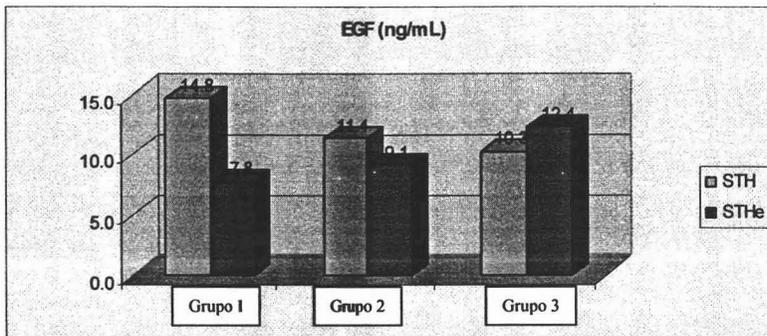
Después de analizar los datos con la U de Mann Whitney se encontró que la cantidad de EGF en STH de pacientes fumadores fue significativamente menor a la encontrada en STH de pacientes no fumadores, a un 90% de confiabilidad. El pH de STH fue significativamente mayor al de STHe en todos los grupos (no fumadores, fumadores y ex-fumadores) al 95% de confiabilidad.

Gráfica 1



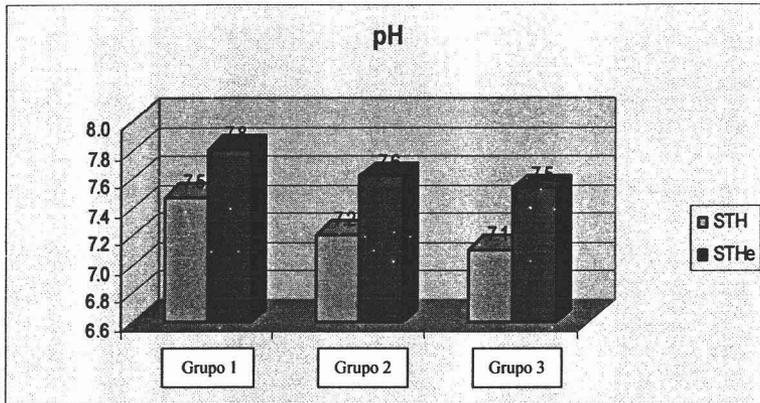
La gráfica 1 muestra los valores promedio de proteínas totales obtenidos en cada grupo tanto para STH como para STHe. Encontramos que la concentración de proteínas en todos los grupos fue mayor en STH, especialmente en el grupo 3.

Gráfica 2



La gráfica 2 compara los valores promedio de EGF en los tres grupos. En los grupos 1 y 2 se encontró una mayor cantidad de proteína en STH que en STHe, al contrario que en el grupo 3.

Gráfica 3



En la gráfica 3 se comparan los valores promedio de pH entre los tres grupos tanto en STH como en STHe y podemos observar claramente que la STHe fue más alcalina que la STH y en promedio todos los grupos tuvieron valores casi neutros y ligeramente alcalinos.

DISCUSIÓN

Grigoriev, y cols., en 2003, dijeron que la composición proteica de la saliva humana depende del estado psico emocional de cada individuo. En su estudio incluyeron tres grupos, el primero de pacientes neutrales (emocionalmente), el segundo de investigadores en condiciones de actividad creativa y el tercero de pacientes de clínicas psiquiátricas. Cada grupo formado por 40 individuos. Encontraron que los estados depresivos iban acompañados de una disminución en la cantidad de proteínas en los rangos de 20 a 200 kD y en cambio, estados positivos de ánimo provocaban el efecto contrario.¹⁴ Este estudio nos ayudó a establecer los criterios de exclusión ya que determinó de manera clara el efecto de los diferentes estados emocionales en la composición y flujo salival. Pudimos comprobar esto en el caso de uno de los pacientes que se muestrearon ya que fue necesario prolongar el tiempo de recolección de saliva puesto que el sujeto se mostró muy nervioso y ansioso ante la tarea de depositar la saliva en el tubo de muestra a pesar de que el procedimiento se le había explicado previamente y había dado su consentimiento. Este nerviosismo disminuyó considerablemente su flujo salival en comparación al obtenido con los otros pacientes del estudio. Ningún otro sujeto dio muestras ni refirió algún tipo de estrés al momento de la toma de la muestra.

En 1999 Hernández, y cols., dijeron que la cantidad de proteínas totales, era uno de los factores salivales, propios del huésped que predisponen a la caries. Ellos midieron el flujo salival, el pH y la concentración de proteínas totales en una población de niños de 6 a 12 años de edad en la escuela primaria Hermanos

Serdán en la ciudad de Puebla. A pesar de esto sólo encontraron una relación estadísticamente significativa en el grupo de 7 – 8 años en los que la concentración de proteínas era mayor en los niños con alto índice de caries.³⁴

Nosotros nos enfocamos únicamente en determinar si el tabaco fumado afectaba a la concentración total de proteínas en saliva sin considerar grupos de edad, a pesar de que se analizaron sólo pacientes adultos. La concentración total de proteínas no mostró cambios en ninguno de los grupos aunque sí encontramos una menor cantidad de proteínas totales en STHe que en STH.

Una amplia cantidad de autores han realizado estudios con el objeto de establecer efectos salivales relacionados con el consumo del tabaco y las proteínas salivales. Nagler, R. y cols., en el 2000, investigaron los efectos e interacciones de la fase gaseosa del humo de cigarro en contacto con la cavidad bucal. Recolectaron muestras de saliva de hombres y mujeres sanos no fumadores. Ellos expusieron las muestras de saliva a humo de cigarros mediante una cámara de vacío y determinaron carbonilos proteicos, análisis enzimáticos y detección de isoenzimas LDH. Encontraron que el humo del cigarro produce un aumento inmediato en la expresión de los carbonilos proteicos debido a la reacción de los aldehidos del humo del cigarro con los grupos sulfidrilo de las proteínas. Aparte, el humo del cigarro indujo pérdida de propiedades enzimáticas salivales.³⁵ Estos datos son interesantes al mostrar una relación entre la cantidad y función de determinados tipos proteicos y el consumo del tabaco.

Otros estudios reportan diferentes cantidades de EGF en saliva de pacientes sanos no fumadores. Thesleff y cols., en 1988, midieron la concentración de EGF en STH y en saliva de glándula parótida y combinada de las glándulas sublingual y submandibular. Encontraron que la concentración normal de EGF en STH era de 0.864 ng/mL, en saliva de glándula parótida 2.704 ng/mL y en saliva de glándulas sublingual y submandibular 0.357 ng/mL. No encontraron diferencia por género en ninguno de los grupos.²⁷ Más adelante Motoko, I. y cols., en 1993, midieron los niveles de EGF en saliva, orina y suero por radioinmunoensayo y expresión inmunohistoquímica de EGF en glándulas salivales normales para conocer las diferencias en el número de células secretoras de EGF en glándula submandibular, parótida, sublingual y glándulas menores. Entre otros datos encontraron que la concentración de EGF variaba dependiendo de la edad: de 0 a 9 años 3.06 ± 0.32 ng/mL y en personas mayores de 10 años era de 4.7 ± 3.5 ng/mL. Los niveles de EGF fueron de 5.7 ± 4.03 ng/mL en hombres ($n = 24$) y 4.36 ± 3.00 en mujeres ($n = 46$) pero sin diferencia significativa en ambos grupos; ellos concluyeron que el aumento de EGF con la edad es ligado al desarrollo de las glándulas salivales y se detiene al alcanzar la madurez. Los niveles de EGF mostraron ritmos circadianos relacionados con las comidas, y fueron más altos durante en ayuno, en las mañanas, disminuían durante las comidas y se recuperaban conforme aumentaba el tiempo de ayuno. Las proporciones relativas de EGF en saliva de glándula submandibular, parótida y STH fueron 1:6:4.²² Ambos autores coinciden en que la glándula parótida es la principal secretora de EGF, pero en cuanto a los valores que encontraron en ambos casos resultaron mucho menores a los que nosotros encontramos, de 14.8 ng/mL en STH de

pacientes sanos no fumadores. Tomando en cuenta los datos de Motoko, realizamos la recolección de muestras entre las 8:30 y las 11:30 de la mañana, en pacientes en ayunas para evitar la influencia de los ritmos circadianos.

En estudios que analizan la cantidad de EGF en pacientes fumadores resultó haber mucha discrepancia: Hobsley y cols., en 1995 midieron la cantidad de EGF en saliva y jugo gástrico en condiciones basales y después de la estimulación con histamina en 60 pacientes, 20 voluntarios sanos, 20 pacientes con úlcera duodenal y 20 pacientes con dispepsia sin úlceras. No encontraron diferencias significativas entre los pacientes de los tres grupos diferentes, tampoco encontraron diferencias en la concentración de EGF entre pacientes de diferente género o fumadores y no fumadores. Los valores en saliva de EGF fueron 3.62, 4.59 y 2.68 ng/mL para pacientes normales, con úlcera y dispepsia respectivamente. Encontraron un aumento en la concentración en los tres grupos tras la estimulación con histamina pero concluyeron que se debía más a un efecto de sialo-concentración que a una mayor secreción de EGF.³⁶ De igual manera, Trudgill, N. y cols, 1996, encontraron que a pesar de que el tabaquismo está asociado con una menor concentración salival de bicarbonato y menor flujo salival no había diferencias en los niveles de EGF entre fumadores y no fumadores.³⁷ Manccini y cols., en 1990 no encontraron diferencias significativas en los niveles de EGF en STH entre fumadores y no fumadores al estudiar saliva y jugo gástrico de pacientes con enfermedad péptica.³⁸

McGurk, M. y cols., en 1990, analizaron con un radioinmunoensayo los niveles de EGF en STH y STHe de voluntarios sanos y concluyeron que están relacionados

con el flujo salival, pero con un coeficiente de correlación bajo ($r = 0.47$). Encontraron ambas formas del EGF (de alto y bajo peso molecular) pero predominaba la de bajo peso. Tras la estimulación durante tres minutos, el EGF de alto peso molecular incrementaba de 18 a 38%. Los ritmos circadianos que afectan principalmente a STH.²⁸

En contraste, Konturek, J. y cols., en 1989 encontraron niveles de EGF salivales significativamente menores en fumadores que en no fumadores³⁹, al igual que Ma, L. y cols., que en el 2000, encontraron que hay menores cantidades de EGF a causa del tabaquismo lo cual retarda la cicatrización de heridas como consecuencia de una reducción en la angiogénesis, proliferación celular y secreción mucosa debido a una depresión en la biosíntesis de EGF y la expresión de su mRNA en glándulas salivales y mucosa gástrica.⁴⁰ Jones, y cols., en 1992 reportaron niveles significativamente menores de EGF en STH.³⁶ Wang, y cols., en 1992 encontraron que hay menores niveles de EGF en STH de fumadores crónicos pero únicamente en personas que consumían más de 15 cigarros diarios.¹⁸

Nosotros encontramos menor concentración de EGF en fumadores 11.4 ng/mL que en no fumadores 14.8 ng/mL en STH, muestreando pacientes que consumieran mínimo 6 cigarros diarios según parámetros de tabaquismo de la OMS.

CONCLUSIONES

Los pacientes fumadores tuvieron menor concentración de EGF en STH en comparación con pacientes no fumadores y ex fumadores.

El pH de STHe es más alcalino que STH en cada grupo. Se encontraron algunos valores ácidos en el grupo de fumadores pero sin significancia estadística.

La concentración de proteínas totales no se vio afectada significativamente en los pacientes fumadores.

BIBLIOGRAFÍA

1. http://www.conadic.gob.mx/redir.asp?link=doctos/observatorio_2002/obs_index
2. BELASSO, Guido. "El programa de acción contra el tabaquismo", Salud pública, Vol. 44, suppl. 1, pp. s5-s6. ISSN 0036-3634, Méx., 2002.
3. Secretaría de Salud, Dirección Nacional de Epidemiología, Encuesta Nacional de Adicciones 1998 (ENA-98), México, 1999.
4. http://www.oralcancerfoundation.org/facts/facts_español.htm
5. www.tabaquismo.freehosting.net Actualizado Agosto 2003
6. Programa de acción contra el tabaquismo, Secretaría de salud, México 2000.
7. K. Andre, S. Shraub, y cols., "Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case control study in the doubs region of France", Oral Oncol, Eur J Cancer, Vol. 31B, No. 5, pp. 301-309, 1995.
8. Sapp, P., "Patología oral y maxilofacial contemporánea", Ed. Harcourt, España, 1998.
9. Zappacosta, Persichilli y cols., "Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers", Archives of oral biology, 44, pp. 485-488, 1999.
10. Sue P. Humphry, MEd, and Russell T. Williamson, DMD^b, "A review of saliva: normal composition, flow and function", J. Prosthet Dent; 85, pp. 162-9, 2001.
11. Banderas, J. A y González M., "Saliva y cavidad bucal: parte II, Proteínas salivales: funciones biológicas en el mantenimiento de la homeostasis bucal", Práctica Odontológica, 15 (7), pp.13-20, 1994.

12. Chicharro, Lucía, y cols., "Saliva composition and exercise", *Sport medicine*, 01121642, Vol 26-1, Jul, 1998.
13. "Mechanisms of Neoplastic Cell Growth", editado por L. Pusztai, C. E. Lewis y E. Yad, Ed. Oxford Medical Publications, New York, 1996.
14. Grigoriev y cols., "Protein content of human saliva in various psycho-emotional states", *Biochemistry Moscow*, Vol. 68, 4, pp. 405-6, 2003.
15. Hok, Brand y cols., "Toothbrushing affects the protein composition of whole saliva", *Eur J Oral Sci*; 110, pp. 480-481, 2002.
16. C. Dawes y B. Y Ong "Circadian rhythms in the flow rate and proportional contribution of parotid to whole saliva volume in man" *Archs oral Biol*, Vol. 18, pp. 1145-1153, 1973.
17. Bardow, Nyvad y cols., "Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ", *Archives of oral biology*, 46, pp. 413-423, 2001.
18. Mandel y cols., "The Functions of Saliva", *J. Dent. Res.*, Vol 66 (Spec Iss), pp. 623 – 627, Febrero, 1987.
19. Latarjet, "Anatomía Humana", 3° ed., Ed. Médica Panamericana, Argentina, 1995.
20. Takashi Joh, Makoto Itoh et al, " Physiological concentrations of human epidermal growth factor in biological fluids: use of a sensitive enzyme inmunoassay", *Clinica Chimica Acta*, 158 (1), Julio, pp. 81-90, 1986.
21. Bardow, Nyvad y cols., "Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ", *Archives of oral biology*, 46, pp. 413-423, 2001.

22. Motoko ilno, Koichi Ushiro y cols.," Kinetics of epidermal growth factor in saliva" Acta Otolaryngol (Stockh), Suppl 500, pp. 126-130, 1993.
23. Johannes Boonstra, Philip Rijken, Bruno Humbel y cols, " The Epidermal Growth factor", Cell Biology International, Vol. 19, No5, 1995.
24. Carpenter, G y Cohen, S. "Epidermal growth factor", J. Biol. Chem., 265 (14), pp. 7709-7712, 1990.
25. Pesonen, Viinikka, y cols., "Size heterogeneity of epidermal growth factor in human body fluids", Life sciences, Vol 40, pp. 2489-2494, 1987.
26. T. Zelles, K.R. Purushotham, y cols., "Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all", J. Dent Res, 74 (12), pp. 1826-1832, 1995.
27. Thesleff, y cols., "The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor", Life Sciences, Vol. 43 pp. 13-18, 1988.
28. M. McGurk, L Hanford, S. Justice y R. A. Metcalfe "The secretory characteristics of epidermal growth factor in human saliva" Archs oral Biol, 35 (8), pp. 653-659,1990.
29. N.J. Trudgill, L. F Smith, " Impact of smoking cessation on salivary function in health volunteers", Scandinavian journal of gastroenterology, 33(6), pp. 568-571, 1998.
30. M. Navazesh y C.M. Chirtensen "A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures",. J Dent Res 61 (10); pp. 1158-1162. Oct 1982.
31. Medidor de modelo pH modelo 120, Manual de operaciones de Condutronic, S.A.

32. Kruger, J Nicholas "The Bradford method for protein quantification" en " The protein protocols handbook" Edited by . Walder M, John., Ed. Humana Press, Unites Status, pp. 15-20, 1996.
33. <http://www.biosecure.com/content/catalogContent/tds3/morenito/KHG0062.pdf>
34. Hernández., "Cuantificación de proteínas totales salivales", http://www.comunicación.buap.mx/gaceta/gct43/pag_19.htm
35. Nagler, y cols., "Effect of cigarette smoke on salivary proteins enzyme activities", Archives of biochemistry and biophysics, Vol 379, 2 julio 15, pp. 229-36, 2000.
36. Hobsley, y cols., "Epidermal growth factor in saliva and gastric juice: response to histamine", Gut., Vol. 37, 3, sept, pp. 335-39, 1995.
37. Trudgill, y cols., "Impact of smoking cessation on salivary function in healthy volunteers", Scandinavian journal of gastroenterology, Vol 33, 6.
38. Manccini DM y cols., "Salivary epidermal growth factor in paients with and without peptic disease", Am J Gastroenterol, Sep; 85 (9): pp.1102-4, 1990.
39. Konturek, y cols., "Release and action of EGF on gastric secretion in humans", Scand J Gastroenterol, Mayo 24 (4), pp. 485-92, 1989.
40. Ma., et. al., "Reduccion of EGF is associated with the delay of ulcer healing by cigarette smoking", Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol., vol 278, pp. G10 – G17, 2000.