

Henrique Valle Calle 662 7455 S AD PRO

PREPARACION DE UNA SOLUCION PROTEICA DE MUCINA PARA SER UTILIZADA EN PACIENTES CON XEROSTOMIA (VENEZUELA)

L. A. Escalona
M. Perrone
M. Soto-Luna
A. M. Acevedo

Instituto de Investigaciones Odontológicas "Raúl Vincentelli". Facultad de Odontología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es preparar una solución proteica lo más semejante a la saliva natural utilizando mucina extraída de glándulas submaxilar de bovino. El proceso de extracción se realizó de acuerdo a la técnica modificada de Draus & Leung (1960). Una vez extraída la glándula submaxilar de bovino (500 g aproximadamente) se cortó y se almacenó en agua destilada durante 12 horas a 4° C con el objeto de eliminar restos de tejido y sangre, luego el material fue homogeneizado y suspendido en solución amortiguadora buffer fosfato pH 7, durante 48 horas. Posteriormente esta solución fue centrifugada y el sobrenadante tratado para extraer la proteína presente. La solución resultante se dializó contra agua destilada con tres cambios y liofilizada. El producto liofilizado se diluyó con agua destilada (1 g/1) y se tomaron alícuotas para determinar la pureza de la proteína. La solución obtenida tiene una viscosidad y una composición proteica semejante a la de la saliva natural, la cual ofrece grandes ventajas para su utilización en pacientes con xerostomía severa.

INTRODUCCION

La xerostomía se refiere a una condición clínica subjetiva donde existe una disminución de la cantidad normal del flujo salival sin que exista un límite definido entre lo normal y lo anormal¹.

Esta es una condición muy traumática para los pacientes que la padecen y es responsable de numerosos efectos secundarios, incluyendo: mucosa bucal seca, lisa y brillante, lengua enrojecida con algunas fisuras o severas lobulaciones. En casos más avanzados todo el tejido bucal tiene una apariencia seca y pegosa, hay dificultad de movimiento para la lengua y labios, por lo tanto inconveniente para masticar, deglutir,

hablar y gran malestar e incomodidad nocturna y dolor.

El tratamiento para estos pacientes que padecen de xerostomía puede ser curativo o sintomático dependiendo del daño existente a nivel de las glándulas salivales o de la etiología.

Diversos métodos han sido utilizados para el tratamiento de este síndrome entre los cuales se encuentran: estimulantes del flujo salival tales como la pilocarpina², los cuales no fueron efectivos en el caso de radiación. Los enjuagues bucales han sido otro método utilizado en los casos en que el flujo salival no puede ser estimulado^{3,4,5,6}. En vista que estos enjuagues bucales no

han resultado un método del todo satisfactorio debido a su corta duración y sabor poco agradable, los últimos estudios han sido dirigidos hacia el desarrollo de sustitutos de la saliva que fueran lo más semejante a la saliva natural.

Entre estos estudios los más importantes han sido los de Matzker y Schreiber en 1972⁷ quienes desarrollaron un sustituto cuyo contenido básico es electrolitos y carboximetil-celulosa (CMC) que provee viscosidad a la solución artificial.

En 1974, S-Gravenmade y cols.⁸ prepararon un sustituto salival cuyo componente principal era la mucina extraída de la glándula submaxilar de bovino, en 1977 Shanon y cols., trabajaron con un sustituto salival que contenía CMC, electrolitos y flúor para promover la remineralización.

Estudios posteriores han demostrado que de todos estos sustitutos el que más alivio proporciona como tratamiento sintomático para el paciente es el producido en base a mucina extraída de glándula submaxilar de bovino o mucina gástrica de porcino.

En Venezuela hasta el momento no se ha producido ningún sustituto salival para el tratamiento sintomático de los pacientes que padecen de xerostomía, cuyo porcentaje es bastante alto, ya que son muchos los pacientes tratados con radiación en la zona de cabeza y cuello,

además de los pacientes que padecen de Síndrome de Sjogrens.

Esta situación nos motivó para la preparación de una solución artificial semejante a la saliva natural, utilizando mucina extraída de glándula submaxilar de bovino para ser utilizada en pacientes con xerostomía, así como evaluar clínicamente la efectividad de esta solución en pacientes con la condición antes mencionada.

MATERIALES Y METODOS

Selección de los pacientes

Se seleccionaron para este estudio piloto 5 pacientes al azar, que asistían a la Facultad de Odontología de la UCV, los cuales presentaban xerostomía. Tres de ellos por terapia de radiación en la zona de cabeza y cuello y dos por Síndrome de Sjogrens. Sus edades estaban en el rango de los 12 a los 65 años.

A cada paciente se le realizó examen clínico de la cavidad bucal para observar el grado de xerostomía, encontrando que los signos característicos de esta entidad estaban presentes en todos ellos: mucosa bucal enrojecida, reseca, lengua roja, agrietada, labios resecaos con fisuras. Además presentaban dificultad para hablar, deglutir, masticar, incluso el dormir era bastante incómodo debido a la sensación de ardor que era constante.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE SALIVA EXTRAIDA DE GLANDULA SUBMAXILAR DE BOVINO

Obtención de la glándula:

Las glándulas se obtuvieron en la Beneficiadora de Ganado Caracas, siguiendo el procedimiento descrito a continuación: una vez obtenida la cabeza del bovino se realizó la localización topográfica y anatómica de las glándulas submaxilares. Para su retiro se utilizó bisturí y tijeras de cirugía; ya obtenidas las glándulas fueron colocadas en una cava con hielo para evitar la desnaturalización de la proteína.

Extracción y purificación de la proteína:

Después de obtenida la glándula se procedió a su limpieza para descartar todos los restos de tejido conjuntivo, tejido graso y restos de sangre. Luego de esta limpieza la glándula fue cortada en

pequeños pedacitos y pesada. Por cada kilogramo de glándula se utilizó 1 litro de agua destilada donde fue suspendida durante 72 horas a 4°C. El agua fue cambiada cada 24 horas.

Transcurridas las 72 horas, el tejido glandular fue filtrado a través de un colador de nylon y luego homogeneizado con una solución buffer fosfato sorenson, 0.01M, pH 7 durante 1 hora en un homogeneizador tipo Oster. Por cada kilogramo de glándula se utilizaron 3 litros de la solución buffer.

El homogenato obtenido fue dejado durante 47 horas a 4°C en agitación lenta, para luego proceder a centrifugar a 3.000 r.p.m. en una ultracentrífuga tipo Sorval a 4°C durante 20 minutos. De esta centrifugación obtuvimos un precipitado y un sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en el buffer sorenson y vuelto a centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 20 minutos. Volvemos a obtener un precipitado y un sobrenadante, el precipitado es descartado y el sobrenadante mezclado con el anterior.

Al sobrenadante total se le agregó cloruro de sodio en una relación de 15 g. por cada litro de sobrenadante y un volumen igual de cloroformo. Se dejó en agitación lenta durante 18 horas a 4°C para luego ser llevados a frascos de separación durante 72 horas.

De esta preparación obtuvimos un precipitado, una fase acuosa y una fase clorofórmica. El precipitado fue lavado con pequeños volúmenes de agua destilada para luego descartar el precipitado, y la fase acuosa que se obtuvo de este lavado se unió a la fase acuosa anterior obtenida de la centrifugación. Esta extracción con cloroformo se repitió dos veces más. Después de la tercera extracción se procedió a la neutralización de la solución a un pH 7 adicionando (Na OH) hidróxido de Na al 20%. Luego se le agregó p-xilene-2 ácido sulfónico en una relación peso volumen de 1%. Esta solución se dejó en agitación lenta, durante 18 horas a 4°C, procediendo después a ajustar el pH a 4.0 con ácido acético diluido al 10%, seguido de una centrifugación a 20.000 r.p.m. durante 20 minutos. Obtuvimos de esta centrifugación un precipitado que se descartó y un sobrenadante al cual se le ajustó el pH a 1.0 con hidróxido de amonio diluido al 10%. Esta solución fue

después dializada durante 72 horas con agitación lenta a 4°C, para luego ser liofilizada en un liofilizador marca Edwards. El producto de este liofilizado fue un polvo blanco suave, liviano que es almacenado a 0°C.

Pruebas bioquímicas de la solución:

Determinación de proteínas (método de Lowry):

Las proteínas totales presentes en el liofilizado se determinaron utilizando el método de Lowry con ciertas modificaciones.

Análisis electroforético de la solución extraída de glándula submaxilar:

El liofilizado obtenido de la glándula submaxilar de bovino fue disuelto en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml. Similar procedimiento fue realizado para las muestras usadas como patrón: mucina de glándula submaxilar de bovino (sigma) y liofilizado de mucina extraída de bovino. Esta última fue cedida por el doctor Peter Shellis de la Universidad de Bristol, Inglaterra.

Para cada una de las muestras se hicieron tres diluciones con el fin de determinar, a cuál de ellas era posible evidenciar con mayor precisión el patrón electroforético. Las diluciones usadas fueron: 1: 10, 1: 50, 1: 100. La electroforesis se realizó a 150 voltios hasta que el colorante indicador llegó al borde inferior del gel. Una vez completada la corrida, el gel fue coloreado con nitrato de plata siguiendo el protocolo de Sammons y cols., (1981).

Administración de la solución a los pacientes:

La solución fue administrada a los pacientes en frascos con spray para evitar la contaminación. Esta solución final se preparó de la siguiente manera: 2 gramos del deshidratado se disuelven en 1 litro de agua destilada, esta solución fue dializada durante 48 horas en agua destilada con agitación lenta a 4°C. Luego se dispensó la solución en los frascos con spray donde fueron calentados en baño de María, durante 2 horas a 50°C. Estos frascos se mantienen en refrigeración. Su uso en los pacientes fue ad libitum.

RESULTADOS

Purificación de mucina de glándula submaxilar de bovino:

Para el proceso de aislamiento y purificación se utilizaron 10 glándulas. El producto obtenido después de la liofilización consistió en un polvo esponjoso, blanco, el cual fue fácilmente disuelto en agua a una concentración de 1 g/l. El mismo fue caracterizado mediante:

- a) Determinación de proteínas.
- b) Patrón electroforético en geles de poliacrilamida.

a) Determinación de proteínas:

A las preparaciones purificadas de la glándula submaxilar de bovino, les fue determinada la concentración de proteínas siguiendo el método de Lowry.

En la Tabla N° 3, se muestran los valores obtenidos para las proteínas totales. Estos valores están expresados en mg/ml para cada una de las diluciones empleadas en la técnica. Como puede observarse los valores se mantuvieron entre el 33,8 y 50% siendo el valor promedio 41,74%.

b) Patrón electroforético en geles de poliacrilamida:

La Fig. 5, muestra el patrón de migración de la mucina de glándula submaxilar de bovino procesada en esta investigación, comparada con la mucina comercial de Sigma y la mucina purificada por el doctor Peter Shellis de la Universidad de Bristol, Inglaterra.

De las seis muestras representadas en la Fig. 5; dos (B₁ - B₂) corresponden a nuestra proteína, dos (A₁ - A₂) a la proteína extraída por el doctor Peter She-

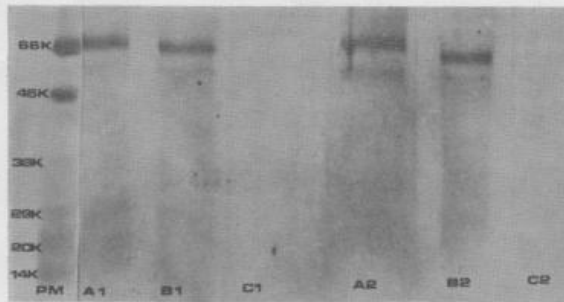


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de mucina de glándula submaxilar de bovino. Incluye patrón de P.M. Línea P.M.: Patrón de peso molecular kilodalton. Línea A1: Mucina purificada por el doctor P. Shellis empleada como referencia. Concentración 1:50. Línea B1: Mucina purificada en el presente trabajo. Concentración 1:50. Línea C1: Mucina comercial (Sigma) empleada como referencia. Concentración 1:50. Línea A2: Mucina purificada por el doctor P. Shellis empleada como referencia. Concentración 1:100. Línea B2: Mucina purificada en el presente trabajo. Concentración 1:100. Línea C2: Mucina comercial (Sigma) empleada como referencia. Concentración 1:100.

llis y dos (C₁ - C₂) a la mucina comercial (Sigma).

Diferentes concentraciones fueron usadas, a fin de determinar con precisión a cuál concentración era posible evaluar el patrón electroforético. Las mismas fueron: 1:50 y 1:100.

El patrón de migración fue similar para todas las proteínas. Sin embargo, en el caso de la mucina comercial (Sigma) no se pudo apreciar con precisión su patrón electroforético para ninguna de las diluciones empleadas, aunque las escasas bandas observadas (C) confirman su similitud con las otras dos proteínas analizadas.

Un patrón de peso molecular fue incluido en esta corrida electroforética, para por una parte determinar similitud o no de las proteínas analizadas, y por otra establecer el peso molecular. Los valores de peso molecular para cada una de las bandas están representadas en la Fig. 5, donde es posible observar que la mucina extraída de glándula submaxilar de bovino tiene un peso molecular aproximado de 66,000 dalton.

EVALUACION CLINICA DE LOS PACIENTES

Los cinco pacientes seleccionados para este estudio utilizaron la preparación durante dos años. La forma de administración fue en frascos spray y el número de aplicaciones ad libitum.

El efecto de esta solución en el alivio de los síntomas, tales como: la sensación de boca seca, ardor, dificultad para masticar, deglutir, hablar, dormir, fue medido a través de cuestionarios abiertos, por medio de los cuales se obtuvieron las impresiones de los pacientes. Ellos manifestaron gran alivio con el uso de esta preparación, sobre todo para hablar, ya que el movimiento de la lengua y los labios estaba disminuido por la resequeza de las mucosas.

TABLA N° 3

CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES EN MUCINA OBTENIDA DE GLANDULA SUBMAXILAR DE BOVINO

Diluciones	Conc. mg/ml	%	Valor promedio
1:10	0,500	50,0 %	41,75 %
1:20	0,450	45,0 %	
1:40	0,375	37,5 %	
1:80	0,338	33,8 %	

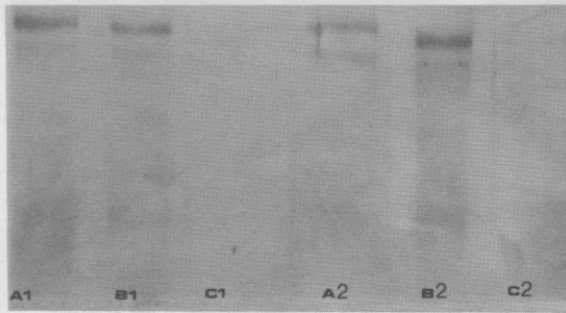


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida de mucina de glándula submaxilar de bovino. Línea A1: Mucina purificada por el doctor P. Shellis empleada como referencia. Concentración 1:50. Línea B1: Mucina purificada en el presente trabajo. Concentración 1:50. Línea C1: Mucina comercial (Sigma) empleada como referencia. Concentración 1:50. Línea A2: Mucina purificada por el doctor P. Shellis empleada como referencia. Concentración 1:100. Línea B2: Mucina purificada en el presente trabajo. Concentración 1:100. Línea C2: Mucina comercial (Sigma) empleada como referencia. Concentración 1:100.

Igualmente las funciones de masticación y deglución de los alimentos mejoró notablemente.

Ninguno de los pacientes ha paralizado el uso de la solución de mucina y cuando se les indicó otros sustitutos salivales como las soluciones salinas o agua con glicerina no sintieron ninguna mejoría y manifestaron su deseo de continuar el uso de la solución de mucina.

Debido a que el número de individuos analizados fue muy pequeño, se decidió estudiar individualmente a cada paciente como la mejor estimación para cada individuo, por lo tanto las conclusiones de este estudio no pueden ser extrapoladas hasta tanto no se realice una investigación incluyendo mayor número de pacientes.

Discusión

Basándonos en la demanda creciente de pacientes con xerostomía que necesitan de una preparación para el alivio de los síntomas que de esta condición se derivan, decidimos preparar una solución artificial, lo más semejante a la saliva natural; utilizando mucina extraída de glándula submaxilar de bovino y evaluar clínicamente la efectividad de esta solución en los pacientes que padecen este síndrome.

La razón por la cual se decidió emplear una solución sustituta proveniente de glándula submaxilar de bovino radica en el hecho de que su constituyente principal es la mucina, y está ampliamente documentado (S-Gravenmade y cols.⁸ 1974, Vissuk y cols.⁹ 1983¹⁰ 1984,¹¹ 1985,¹² 1986,¹³ Halton y cols. 1987,¹³ Mandel 1987⁴, que las preparaciones elaboradas en base a este componente brindan mayor alivio para los pacientes que sufren de xerostomía).

La técnica de purificación utilizada en el presente trabajo es una modificación de la técnica usada por R.P. Shellis (1978), la cual a su vez fue modificada de la técnica descrita por Draus y Leung (1960)¹⁶. El producto obtenido luego del proceso de purificación consistió en un polvo blanco, esponjoso, fácilmente disuelto en agua.

Los resultados obtenidos en la purificación de proteínas totales (33.8% a 50%) son similares a los reportados (Draus y Leung 1960,¹⁶ Katzman y Eylar 1966,¹⁷ Pigman y Tettamani 1968,¹⁸ Apostolopoulos 1964,¹⁹ y Rolla y Josen 1968²⁰).

Es importante destacar que preparaciones de mucina extraída de glándula submaxilar humana, muestran una concentración de proteínas similares a la detectada en el presente trabajo. Así,

Oemrawsingh y Ronkena (1974²¹), reportaron entre un 23,6 a 41,7% de proteínas totales para su preparación de mucina extraída de humanos. Estos resultados demuestran la similitud del contenido proteico de la mucina humana comparada con la mucina extraída de bovino, lo cual es sugerente, de la eficacia de nuestra preparación.

El análisis electroforético de la muestra reveló similitud del patrón electroforético de nuestra preparación con la obtenida por Shellis (1978) y la purificada por la casa Sigma. En esta última es importante señalar que la concentración de proteína es muy baja, ya que habiéndose utilizado las mismas diluciones para las tres preparaciones evaluadas, sólo tenues bandas pudieron observarse con el preparado comercial, a diferencia de las preparaciones restantes donde se aprecia nitidez en la aparición de las bandas.

Con respecto al patrón de peso molecular utilizado, cabe resaltar que las bandas correspondientes a nuestra proteína, al igual que a las otras dos muestras analizadas, se ubicaron en la banda de P.M. cercana a los 66.000 dalton.

La evaluación clínica de la preparación por un período de 2 años en pacientes con xerostomía resultó en una gran aceptación de la solución por parte de los pacientes, ya que se observó gran alivio de los síntomas, incluyendo disminución de la resequeidad de las mucosas de carrillos, labios y lengua, disminución de la sensación de ardor o quemazón, lo que influyó en una mayor alimentación, mejor aplicación de las técnicas de higiene bucal, mejor calidad de vida. Si bien es cierto que el número de pacientes es limitado, este estudio piloto de evaluación clínica de nuestra preparación nos permitirá, habiéndose comprobado su rendimiento en un mayor número de pacientes, crear la infraestructura necesaria, tanto de recursos humanos, como físicos para poder producir un mayor volumen de nuestra saliva artificial y tener mayor alcance y aplicabilidad.

Agradecimiento

A la señora Marlene Durán de Maldonado, por mecanografiar el artículo. Al C.D.C.H., por el financiamiento del proyecto.

SUMMARY

The purpose of this study was to prepare a protein solution to simulate natural saliva using mucin extracted from bovine submaxillary gland. The extraction process was done in keeping with Drans & Leung's (1980) modified technique. Once the bovine submaxillary gland was extracted (approximately 500g), it is cut and stored in distilled water for 12 hrs at 4°C in order to eliminate any tissue or blood remaining in the section. The tissue is then homogenized and suspended in a phosphate buffer solution with a pH of 7 for 48 hours. The solution is then centrifuged and the supernatant is treated to extract the protein present in the solution. The remaining solution is dialyzed with distilled water, changed three times and then lyophilized. The lyophilized product is diluted in distilled water (1 g/1) taking aliquots to determine the pureness of the proteins.

The solution obtained has a viscosity and protein composition which is very similar and offers great advantages for use in patients who suffer from severe xerostomy.

Bibliografia

- GLASS, BJ; VAN DIS, ML; LANGLAIS, RP & MILES, DA. 1984. Xerostomic: Diagnosis and treatment planning considerations. *Oral. Surg.* 58: 248-252.
- FOX, PC; VAN DER VEN, PF; BAUM, bj & MANDEL, ID. 1986. Pilocarpine for the treatment of xerostomic Associated with Salivary Gland Dysfunction. *Oral. Surg.* 61: 243-248.
- DYKERS, P; HARRIS, P & MARTSON, A. 1960. Treatment of dry mouth *lancet.* 2: 1353.
- ROBINSON, JE. 1964. Dental management of the oral effects of radiotherapy. *J. Pros. Dent.* 14: 582-587.
- HALPERN, IL & FREEDMAN, AL. 1975. Dental management of the irradiated patient. *Dent. Surgery.* 51: 18-23.
- COFFIN, F. 1973. The control of radiation caries. *Br. J. Radiol.* 46: 365-368.
- MATZKER, J & SCHREIBER, J. 1972. Synthetischer Speichel zur therapie der hiposialen, insbesondere bei der radiogenen Sialadenitis. *Z. Laryngol. Rhinol. Otol.* 51: 422-428.
- 'S-GRAVENMADE, EJ; ROUKEMA, PA & PANDERS, AK. 1974. The effect of mucin containing artificial saliva on sever xerostomic. *Int. J. Oral Sur.* 3: 435-439.
- VISSINK, A; 'S-GRAVENMADE, EJ; PANDERS, AK; VERMEY, A; PETERSEN, JK; VISCH, LL & SCHAUB, RMH. 1983. A clinical comparison between commercially available mucin and C.MC containing saliva substitutes. *Int. J. Oral. Surg.* 13: 231-238.
- VISSINK, A; WATERMAN, HA; 'S-GRAVENMADE, EJ; PANDERS, AK & VERMEY, A. 1984. Rheological properties of saliva substitutes containing mucin, carboxymethylcellulose or polyethyleneoxide. *J. Oral. Pathol.* 13: 22-28.
- VISSINK, A; 'S-GRAVENMADE, EJ; GELHAROL, TBFM; PANDERS, AK & FRANKEN, MH. 1985. Rehardening properties of mucin or CMC containing saliva substitutes on softened human enamel. Effects of Sorbitol, Xylitol and increasing viscosity. *Caries Res.* 19: 212-218.
- VISSINK, A; DE JONG, HP; BUSSCHER, HJ; ARENDS, J & 'S-GRAVENMADE, EJ. 1986. Wehing properties of human saliva and saliva substitutes *J. Dent. Res.* 65: 1121-1124.
- HATTON, MN; LEVINE, KJ; MARGARONE, JE & AGUIRRE, A. 1987. Lubrication and viscosity features of human saliva and commercially available saliva substitutes. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 45: 496-499.
- MANDEL, ID. 1987. The functions of saliva *J. Dent. Res.* 66: 623-627.
- SHELLIS, RP. 1978. A synthetic saliva for cultural studies of dental plaque. *Arch. Oral. Biol.* 23: 485-489.
- DRAUS, FJ & LEVING, SW. 1960. Characteristics and properties of a bovine submaxillary mucoid. *Arch. Oral. Biol.* 3: 35-40.
- KATZMAN, RL & EYLAR, FH. 1966. Physical and chemical studies on glycoproteins. Isolation and characterization of glycoproteins from porcine submaxillary gland. *Archs Biochem Biophys.* 117: 623-637.
- TETTAMANI, G & PIGMAN, W. 1968. Purification and characterization of bovine and ovine submaxillary mucins. *Archs Biochem. Biophys.* 124: 41-50.
- APOSTOLOPOULUS, AX. (1964). Studies on human salivary mucoproteins. P.H.D. Thesis, University of Rochester, Rochester N.Y.
- ROLLA, G & JONSON, J. 1968. A glycoprotein component from human sublingual-submaxillary saliva. *Caries. Res.* 2: 306-316.