



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA**

**“IDENTIFICACIÓN DE FORMAS MOLECULARES DE NGAL EN
CONDICIONES DESNATURALIZANTES/REDUCTORAS, EN SALIVA
PAROTÍDEA DE PACIENTES AFECTADOS POR PAROTIDITIS CRÓNICA
RECURRENTE INFANTIL”**

Lorena Francisca Surot Madrid

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Irene Morales Bozo

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Mirtha Landaeta Martínez

Prof. Dra. Blanca Urzúa Orellana

Adscrito a Proyecto FIOUCH 09-02

Santiago – Chile

2012

Dedico este trabajo a mi familia, a mis amigos, a mi amado esposo y a mi Emilita.

AGRADECIMIENTOS

Luego de haber finalizado este proyecto, siento la necesidad de agradecer a quienes fueron partícipes de este logro. A Dios en primer lugar.

Agradezco el esfuerzo de mis padres, Myrtha y Francisco que en alegre travesía me apoyaron en todo momento para sacar adelante esta carrera que estoy segura no hubiese sido posible sin su cariño y dedicación. Agradezco a mi hermano, por su templanza, a mi hermana y a Eduardo, que en la distancia siempre han estado conmigo. Doy gracias a mis abuelos adorados, que día a día me acogen en su hogar y que siempre me reciben con un cariño absoluto. A mis suegros queridos, a mi cuñada Alejandra y a Pancho, a mi tía Leti y a la Nina, todos personas que han sido muy importantes en este proceso.

También agradezco a mi esposo por ser mi compañero en esta vida y a mi hija que trajo a mi mundo un nuevo sol.

Por supuesto, quiero mencionar a mi estimada tutora, la Dra. Irene Morales Bozo, que con sus ideas claras y organización a toda prueba logró dirigir mis pasos, motivados por su jovialidad y cariño, ya que ni en los momentos más difíciles de elaboración de esta tesis, dejó de sonreír y disfrutar lo que hacía.

A quienes fueron parte de este proyecto como son Dra. Blanca Urzúa, Dra. Claudia Lefimil y Dra. Carla Lozano, quienes con su preparación académica y calidad humana, logran que realmente los alumnos y ayudantes en el laboratorio se sientan sinceramente valorados y acogidos, tanto así, que después cuesta mucho partir.

A mis amigos de laboratorio Andrea Cortés, Katerine Vera, Anita Plaza, Daniela Mansilla, Claudia Tobar, Nicolás Pacheco, y Pamela Tournelle. Además, no puedo dejar de dar las gracias a tesistas anteriores que por su legado pude construir este proyecto, a mi amiga Nadia Toloza, y a mi hermana Romina Surot.

ÍNDICE

RESUMEN.....	Página 1
INTRODUCCIÓN.....	Página 3
MARCO TEÓRICO.....	Página 6
HIPÓTESIS.....	Página 15
OBJETIVO GENERAL.....	Página 15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	Página 15
MATERIALES Y MÉTODO.....	Página 16
RESULTADOS.....	Página 19
DISCUSIÓN.....	Página 26
CONCLUSIONES.....	Página 29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Página 30
ANEXO.....	Página 36

RESUMEN

La Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI) es una inflamación recurrente y dolorosa, de etiología desconocida. Generalmente, se inicia alrededor de los 3 años de edad y se mantiene hasta la adolescencia. Estudios anteriores han demostrado, mediante zimografía, la presencia de metaloproteasas de matriz (MMPs) 2 y 9 en la saliva parotídea de pacientes con PCRI. Mediante la técnica de western-blot, se ha detectado con mayor frecuencia la presencia de formas moleculares de MMP-9 de 169 kDa y 139 kDa. Así mismo, mediante zimografía se detectó una metaloproteasa de 141 kDa. En ambos casos las bandas fueron más frecuentes en saliva proveniente de glándulas comprometidas clínicamente en relación a las no afectadas de pacientes con PCRI. En estudios posteriores se observó que en la saliva parotídea proveniente de glándulas afectadas clínicamente por PCRI, en relación a saliva proveniente de glándulas no afectadas clínicamente de los mismos pacientes, se presentó mayoritariamente el complejo molecular de MMP-9 de 141 kDa. Tanto la banda de 141 kDa como la de 139 kDa podrían corresponder a la unión MMP-9/NGAL (Lipocalina de Neutrófilo asociada a Gelatinasa B) ya que se encuentran cercanas al rango de 125-130 kDa con el que se ha descrito a ese complejo en diversos estudios.

En este estudio se propuso analizar, la presencia de bandas de NGAL en la saliva parotídea bilateral de pacientes con PCRI.

En 33 pacientes con PCRI unilateral o bilateral, de entre 6 a 14 años de edad, se recolectó saliva parotídea bilateral y se determinó la presencia de NGAL mediante la técnica de western-blot. Se registró el compromiso clínico de ambas glándulas parótidas como: glándulas clínicamente afectadas y no afectadas. Se determinó la frecuencia de NGAL salival, en relación al compromiso clínico de la glándula.

La saliva parotídea de pacientes con PCRI, analizada en condiciones no reductoras presentó 7 bandas correspondientes a NGAL, en tanto que, en condiciones reductoras se encontraron 5 bandas correspondientes a NGAL.

La saliva parotídea proveniente de glándulas clínicamente comprometidas y de glándulas sin compromiso clínico de pacientes con PCRI, analizada en condiciones no reductoras, no presentó diferencias en la frecuencia de las bandas encontradas en estas condiciones.

La saliva parotídea proveniente de glándulas clínicamente comprometidas de pacientes con PCRI, analizada en condiciones reductoras, presentó con mayor frecuencia las bandas correspondientes a NGAL de los tamaños moleculares: 75, 37 y 25 kDa, al compararla con la saliva parotídea proveniente de glándulas no comprometidas clínicamente.

Los resultados de este estudio, sugieren que NGAL podría estar involucrada en la etiopatogénesis de PCRI y pueden contribuir al esclarecimiento de este proceso patológico. Así mismo, la presencia de NGAL en la saliva parotídea de glándulas sin compromiso clínico de aumento de volumen, sugiere un cuadro glandular subclínico de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI) es una enfermedad cuya etiología es un enigma y se caracteriza por la inflamación recurrente de una o ambas glándulas parótidas, asociada generalmente a una sialectasia (ductos interlobulares dilatados) no obstructiva de la glándula. Esta enfermedad afecta por lo general a niños desde la infancia temprana hasta la adolescencia, donde sin causa aparente tiende a remitir. La recurrencia, puede presentarse de forma imprevista sin una frecuencia determinada, como un aumento de volumen doloroso de la glándula parótida que puede permanecer días, semanas o meses, usualmente acompañado de fiebre leve y malestar general, lo que compromete la calidad de vida del paciente.

El desconocimiento de los factores causales y de la fisiopatología de la PCRI, determina que su manejo terapéutico sea controversial y confuso, no existiendo un consenso para su tratamiento. Diversos especialistas son los encargados de tratar a estos pacientes durante toda su infancia y adolescencia, logrando disminuir la sintomatología, sin lograr sanarlos de la enfermedad. Los Hospitales Públicos se han transformado en los Centros de Referencia para los pacientes con PCRI, los que tienen que acudir sistemáticamente a lugares altamente solicitados y distantes de su hogar, para ser atendidos. A la vez, los centros de atención deben gastar recursos humanos y monetarios en maniobras que resultan poco eficaces.

El diagnóstico de PCRI se realiza mediante un examen clínico y es corroborado con una sialografía de la glándula parótida. La sialografía como examen complementario, a pesar de su carácter invasivo, es el método utilizado con mayor frecuencia. Este examen consiste en la inyección de un medio de contraste iodado a través del conducto de Stenon. Este procedimiento permite opacificar los conductos de la glándula y evidenciar las dilataciones ductales como una imagen radiográfica típica de “ciruelo en flor”. De acuerdo a las imágenes de llenado glandular, la sialectasia puede presentarse como punteada, globular, cavitaria, destructiva o combinaciones de ellas. Estas imágenes serían el reflejo

del estado inflamatorio en el que se encuentra el tejido glandular. La biopsia parotídea se encuentra restringida a casos extremos, dada la proximidad anatómica de la glándula con el nervio facial. La gran fibrosis perineural secundaria a la cirugía, con las consecuentes secuelas neurológicas que pudiese ocasionar, determina que no sea posible analizar directamente el tejido glandular. Además, existen otros métodos imagenológicos, como es el caso de la ultrasonografía, que aportan al diagnóstico y seguimiento, pero no se utiliza como un método de rutina debido a su alto costo.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el análisis molecular de la saliva parotídea adquiere relevancia, por la poca invasividad del método de obtención de las muestras. El uso de la saliva, como fluido diagnóstico de enfermedades bucales o sistémicas, es investigado activamente, ya que, la composición molecular salival de una determinada glándula, es un reflejo del estado de funcionamiento de esta misma. El estudio de las moléculas salivales asociadas a la evolución de la PCRI y la relación con el tipo de daño existente, permitiría dilucidar el mecanismo fisiopatológico de esta enfermedad, como también, postular estrategias terapéuticas alternativas más eficaces y eficientes que las actuales.

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se abordó el análisis molecular de la saliva parotídea de pacientes con PCRI. En este estudio se describió que la composición salival de estos pacientes se encontraba alterada en relación a sujetos controles sanos. Mediante zimografía, se analizó la frecuencia de individuos que presentaron actividad MMP-2 y MMP-9 en saliva parotídea. Los resultados señalaron que ambas enzimas se encontraban activadas con mayor frecuencia en la saliva proveniente de individuos con PCRI.

En un estudio posterior, se analizaron muestras de saliva parotídea de pacientes con PCRI, mediante la técnica de western-blot, en condiciones desnaturalizantes no reductoras, y utilizando anticuerpo anti MMP-9, se detectaron dos bandas de MMP-9 cuyos tamaños moleculares fueron de 169 kDa y 139 kDa. Así mismo, mediante zimografía, y en condiciones no desnaturalizantes, se detectó una banda con actividad gelatinasa de 141 kDa. Estas bandas se

observaron con mayor frecuencia en la saliva parotídea proveniente de glándulas afectadas clínicamente que en la de glándulas no afectadas de los mismos pacientes. En un ensayo más reciente, mediante la técnica de western-blot, utilizando anticuerpo anti MMP-9, se identificó una banda de 141 kDa susceptible de ser disociada en condiciones desnaturalizantes/reductoras que correspondería a un complejo molecular de MMP-9, el que se observó con mayor frecuencia en la saliva parotídea proveniente de glándulas afectadas clínicamente que en la de glándulas no afectadas clínicamente de pacientes con PCRI. Tanto la banda de 141 kDa como la de 139 kDa podrían corresponder a la unión MMP-9/NGAL (Lipocalina de Neutrófilo asociada a Gelatinasa B) ya que se encuentran cercanas al rango de 125-130 kDa con el que se ha descrito a ese complejo en diversos estudios. Una aproximación experimental para determinar si estas bandas corresponden a complejos moleculares de MMP-9 con lipocalina o a isoformas de MMP-9, sería analizar la saliva de estos pacientes en condiciones desnaturalizantes y desnaturalizantes/reductoras, enfoque que se propone realizar en este estudio.

NGAL es una proteína que une y transporta moléculas de bajo peso molecular. En humanos NGAL es una cadena de 178 aminoácidos que pesa 25 kDa, la cual predomina en su forma monomérica. Ésta es expresada por neutrófilos y otras células epiteliales. Aparentemente tiene una función uniendo sideróforos (pequeñas moléculas transportadoras de hierro) mostrando una alta afinidad por los de origen bacteriano. NGAL constituye un componente del sistema inmune innato frente a infecciones bacterianas en tejidos expuestos al medio ambiente externo (tracto respiratorio, gastrointestinal y urinario) y su expresión se eleva cuando estos tejidos se encuentran infectados o inflamados. Cuando NGAL se encuentra formando un complejo con MMP-9, tiende a estabilizar a ésta última impidiendo su degradación.

El presente trabajo propone identificar mediante la técnica de western-blot la presencia de NGAL en la saliva parotídea de pacientes con PCRI, con la finalidad de aportar al conocimiento sobre el mecanismo fisiopatológico de esta patología.

MARCO TEÓRICO

Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI)

PCRI es una enfermedad de etiología desconocida, definida como una inflamación parotídea asociada a sialectasia o dilataciones no obstructivas de los conductos glandulares. La PCRI se caracteriza por presentar episodios recurrentes de parotidomegalia inflamatoria dolorosa, que duran días, semanas o meses, acompañados usualmente por compromiso del estado general del paciente. Se alterna con intervalos de remisión, en los que la glándula se observa clínicamente asintomática ^(1; 2). El número de recurrencias es variable e impredecible en cada individuo, se inicia entre los 3 y 6 años de edad y se mantiene hasta la adolescencia, comprometiendo significativamente la calidad de vida del individuo. Sólo algunos casos requieren hospitalización por la magnitud del compromiso del estado general. La distribución por sexo de esta patología es similar para ambos, y su manifestación es preferentemente unilateral. Si se manifiesta bilateralmente, afectará predominantemente a una de las glándulas. El aumento de volumen glandular es marcadamente doloroso, pudiendo existir compromiso de la piel de la zona con enrojecimiento local. Después de la pubertad los síntomas se atenúan pudiendo desaparecer por completo sin causa aparente, aunque en algunos casos ésta persiste hasta la edad adulta ^(1; 2; 3).

La mayoría de los estudios sobre PCRI describen una disminución del flujo salival parotídeo acompañado de cambios en el aspecto macroscópico de la saliva, como aumento de la viscosidad salival o la presencia de un material particulado blanquecino en la secreción ⁽²⁾. Otros autores diferencian entre saliva mucosa, purulenta y globosa, señalando como más frecuente al primero de estos tipos ⁽⁴⁾ (Figura N° 1). También la han descrito como una secreción turbia o purulenta ⁽⁵⁾. En la mayoría de estos estudios se describe que a pesar de la fiebre y malestar general, la presencia de pus emanada por el conducto excretor parotídeo es poco frecuente, produciéndose por poco tiempo y en baja cantidad ^(1; 2; 6; 7).



Figura N° 1: Tapón mucoso en salida del conducto excretor parotídeo en un paciente con PCRI ⁽⁴⁾.

Etiología de la PCRI

La etiología concreta de la PCRI es desconocida, pero se han propuesto posibles factores causales como: malformaciones ductales, factores genéticos, inmunodeficiencias, procesos alérgicos, autoinmunes e infecciosos, entre otros ^(1; 2; 3; 4; 8; 9; 10; 11), sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha podido ser demostrada.

Se han realizado diversos estudios intentando determinar la causa de la PCRI, como por ejemplo, estudios microscópicos de tejido glandular, pero éstos son escasos ya que la biopsia de la glándula sólo se indica en casos en que el beneficio sea mayor que el costo, por la proximidad del nervio facial y el riesgo de dañarlo. Los estudios histopatológicos existentes indican que existe un infiltrado linfocitario que tiende a formar folículos linfoides alrededor de ductos interlobulARES dilatados.

También se han realizado estudios microbiológicos de la saliva parotídea en individuos con PCRI, excluyendo la presencia de los principales virus respiratorios y del virus parotidis, descartándolos de esta manera como posibles agentes causales ⁽⁸⁾. Estudios Bacteriológicos reportan la presencia de una flora mixta de cocos Gram positivos, así como otros en tanto, revelan el hallazgo de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus viridans* y/o *Moraxella catarrhalis* en el 80% de los casos estudiados ^(7; 12). Sin embargo, a la fecha no ha sido posible confirmar el origen infeccioso de esta enfermedad e incluso se reporta un número de casos en los que cultivos bacterianos arrojan resultados negativos.

Diagnóstico de PCRI

El diagnóstico de PCRI se basa en la historia clínica y se confirma con sialografía, examen que permitiría seguir la evolución del estado glandular ^(1; 13). La sialografía es considerada en la actualidad como el método más importante y confiable para el diagnóstico de PCRI ⁽¹⁴⁾. Este examen consiste en la inyección de un medio de contraste iodado a través del conducto de Stenon, lo que permite opacificar los conductos de la glándula y evidenciar las dilataciones ductales como una imagen radiográfica típica de “ciruelo en flor” ^(1; 16). Estas imágenes serían el reflejo del estado inflamatorio en el que se encuentra el tejido glandular (Figuras N° 2 y N° 3). Cuando la enfermedad se atenúa, los cambios sialográficos tenderían a disminuir pudiendo llegar a desaparecer cuando la enfermedad se hace inactiva ⁽¹⁾. Existiría una relación entre el tipo de sialectasia observada en el sialograma y el compromiso glandular ^(1; 2; 15; 16; 17). Después de múltiples recurrencias, se produciría un efecto destructivo permanente de la glándula observable en la sialografía. En estos pacientes existiría una tendencia a hacer cuadros más prolongados y más frecuentes que en los individuos con menor daño glandular acumulado ⁽²⁾. También se ha descrito que la sialografía tiene efectos benéficos, en términos de mejorar los síntomas y reducir la frecuencia de las recurrencias ^(6; 14).



Figura N° 2: Sialografía de una glándula parótida sana, se observan ductos principales y secundarios, lo que se conoce como “árbol seco sin hojas” ⁽³⁸⁾.



Figura N° 3: Sialografía de una glándula parótida con PCRI. Se observa sialectasia punteada, lo que se conoce como “ciruelo en flor” ⁽³⁸⁾.

Tratamiento de la PCRI

Actualmente, no existe consenso sobre el manejo terapéutico de PCRI. Distintos especialistas indican variadas terapias para una misma entidad patológica. En algunos casos se han usado maniobras físicas como calor local, masajes glandulares, ⁽⁹⁾ etc. En otros, se indican antiinflamatorios no esteroidales, ^(9; 18) mientras que en otros se utilizan combinaciones de antihistamínicos, lisozima y antibióticos ⁽¹²⁾. Sustentados en los resultados obtenidos con el uso de mucolíticos en patologías como el Síndrome de Sjögren y Xeroftalmia, en el Servicio de Cirugía del Hospital Roberto del Río se plantea el uso de bromhexina en dosis de 4 mg cada 8 horas para tratar las recurrencias de esta enfermedad ⁽¹⁸⁾. Basados en la observación de que en un número importante de pacientes se produce la desaparición de los síntomas de la fase aguda con la sialografía ^(1; 12) y con la hipótesis de que el medio de contraste tendría un efecto antiséptico, el Servicio Máxilo-Facial Infantil del Hospital San Juan de Dios propone un esquema terapéutico consistente en lavados intraglandulares periódicos con un antiséptico yodado ⁽⁴⁾. (Figura N° 4). En casos con daño glandular severo e irreversible como resultado de episodios agudos de larga duración, se busca la atrofia glandular mediante la ligazón del conducto excretor ⁽²⁾.



Figura N° 4: Lavado intraglandular vía conducto de Stenon con antiséptico yodado ⁽³⁸⁾.

Como último recurso y sólo en casos severos, en los que las demás medidas terapéuticas son inútiles, se realiza la parotidectomía parcial o total ^(2; 19). A pesar de la ausencia de evidencia del origen infeccioso de PCRI, en la mayoría de los reportes se indica que los esquemas terapéuticos se combinan con

antibióterapia sistémica, ^(1; 4; 5; 6; 12; 20) con el subsecuente riesgo de generar resistencia microbiana, por el uso recurrente de estos fármacos para tratar una enfermedad en la que no se tienen evidencias claras acerca de su origen bacteriano. La mayoría de los estudios reporta un porcentaje de éxito terapéutico variable, pero ninguno de los tratamientos propuestos ha podido evitar o prevenir totalmente las recurrencias. La tendencia general es enfocar el tratamiento al alivio de los síntomas, la disminución del período de actividad y prolongación del período de quiescencia, la prevención del compromiso grave del estado general y a evitar, de la mejor manera posible, el daño del parénquima glandular producido por la inflamación recurrente ^(1; 2; 5; 6; 18).

Evidencia de alteración en la composición salival en pacientes con PCRI

La contraindicación de biopsia glandular en esta enfermedad, ha dificultado la obtención de información acerca del estado del tejido afectado por PCRI. Desde esta perspectiva, el análisis molecular del producto de secreción glandular ha llegado a establecerse como mecanismo no invasivo, alternativo al estudio histológico de la glándula, en una serie de alteraciones inflamatorias que afectan a las glándulas salivales. La mayoría de los estudios sobre PCRI concuerdan en describir alteraciones de la calidad de la saliva parotídea en esta patología ^(1; 2; 4; 5), sin embargo, los estudios que analizan su composición química son escasos, consideran un número reducido de individuos y analizan la presencia de algunas proteínas particulares. En ellos se reporta que la saliva parotídea de pacientes con PCRI, presenta mayores concentraciones de albúmina, lactoferrina, calicreína e IgA, en relación a sujetos controles ^(21; 22).

Además de estas proteínas, en una serie de patologías inflamatorias que afectan a glándulas salivales, se ha podido detectar en la composición de la saliva la presencia de macromoléculas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular, como son las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), permitiendo obtener información en relación al proceso patológico de la glándula afectada ^(23; 24; 25).

Las metaloproteasas de la matriz o MMPs conforman una familia de 26 endopeptidasas dependientes de calcio y zinc encargadas de la remodelación de

la matriz extracelular en condiciones normales y patológicas ⁽²⁶⁾. Su expresión es regulada por factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y componentes de la matriz extracelular ⁽²⁷⁾. Estas enzimas son sintetizadas inicialmente como zimógenos (proMMP o forma latente) y requieren de la hidrólisis proteolítica de un propéptido en el espacio extracelular, para exponer su sitio catalítico (MMP o forma activada) ⁽²⁸⁾. Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 han sido involucradas en una amplia variedad de condiciones patológicas del adulto como el Síndrome de Sjögren, diabetes mellitus, periodontitis, entre otras ^(25; 29; 30). Adicionalmente, también han sido estudiadas en patologías inflamatorias propias de la infancia como en la otitis crónica media con efusión y en niños con enfermedades crónicas del pulmón ^(31; 32).

En un estudio reciente realizado en el laboratorio de Biología y Bioquímica Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en el que se aborda el análisis molecular de la saliva parotídea de pacientes con PCRI (n = 33) Morales y cols., ⁽³³⁾ describe alteraciones en la composición salival en relación a sujetos controles sanos (n = 33). Se describe que la saliva de los sujetos enfermos presenta alteraciones en la concentración de proteínas, en los modos de difusión de sus proteínas salivales sobre membranas de nitrocelulosa y en los perfiles proteicos observados mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida-SDS, al contrastarla con la saliva del grupo control. Además al analizar la frecuencia de individuos que presentan actividad MMP-2 y MMP-9 en su saliva parotídea, se pudo observar que sólo 2 sujetos controles presentaron estas enzimas en su saliva y en contraste, 18 pacientes con PCRI presentaron actividad MMP-9 y 13 pacientes presentaron actividad MMP-2. Este constituye el primer informe sobre la presencia de metaloproteasas en saliva de pacientes con PCRI ^(33; 34; 35; 36).

Otro estudio reportado por los mismos investigadores indica que existe una asociación entre la presencia de MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea de pacientes con PCRI y el grado de compromiso sialográfico de la glándula parótida afectada ⁽³⁷⁾.

Posteriormente en otro estudio donde se analiza la saliva parotídea de pacientes con PCRI, en condiciones no desnaturalizantes, mediante zimografía se

pudo determinar que la saliva parotídea de las glándulas clínicamente afectadas por PCRI, presentaban mayor actividad enzimática de un complejo gelatinasa de 141 kDa, que la saliva de glándulas no afectadas de los mismos pacientes ⁽³⁸⁾. Por su tamaño molecular, esta banda podría corresponder a un homodímero de MMP-2 o a un heterodímero de MMP-2 o MMP-9. Paralelamente, mediante la técnica de western-blot en condiciones desnaturizantes no reductoras y utilizando anticuerpo anti MMP-9, se identificaron complejos moleculares de MMP-9 de 169 kDa y 139 kDa, los que también se presentaron con mayor frecuencia en la saliva parotídea de las glándulas clínicamente afectadas versus las no afectadas clínicamente de pacientes con PCRI ⁽³⁸⁾.

En un ensayo más reciente, donde también se analiza la saliva parotídea de pacientes con PCRI, mediante la técnica de western-blot y utilizando anticuerpo anti MMP-9, se identificó una banda de 141 kDa susceptible de ser dissociada en condiciones desnaturizantes/reductoras que correspondería a un complejo molecular de MMP-9, el que se observó con mayor frecuencia en la saliva parotídea proveniente de glándulas afectadas clínicamente, que en las no afectadas de los mismos pacientes. ⁽³⁹⁾.

Las bandas observadas en estos estudios, podrían corresponder a complejos heterodímeros de MMP-9, siendo probable que las que tenían un tamaño molecular de 139 kDa y 141 kDa pudiesen corresponder a la unión MMP-9/NGAL, ya que se encuentran cercanas al rango de 125-130 kDa descrito para este complejo en otros estudios ^(40; 41; 42). Esto despierta interés en el estudio de la PCRI puesto que existe la descripción de heterodímeros de MMP-9/NGAL cercanos a este peso molecular en variados procesos patológicos como aterosclerosis ⁽⁴³⁾, invasión tumoral ⁽⁴⁴⁾, osteoartritis ⁽⁴⁵⁾ y polineuropatía amiloidea ⁽⁴⁶⁾.

Tanto MMP-2 como MMP-9 son secretadas por las células como monómeros y en formas diméricas. Además, MMP-9 puede formar homodímeros y heterodímeros. Los distintos complejos de MMP-9 tienen propiedades bioquímicas y enzimáticas diferentes ⁽⁴⁷⁾. Es así como se han descrito: el homodímero MMP-9/MMP-9, la unión MMP-9/TIMP, heterodímeros MMP-9/MMP1, MMP-9/NGAL y la unión de MMP-9 con variados proteoglicanos y glicoproteínas. Especial atención

sugiere la unión de MMP-9/NGAL la cual produce cambios biológicos significativos. En neutrófilos humanos se produce este complejo dimérico covalente, sensible a la reducción, de aproximadamente 125-130 kDa. El heterodímero proMMP-9/NGAL se puede unir al inhibidor TIMP-1, mejora la activación de la enzima por la calicreína plasmática y además protege a MMP-9 de la degradación, rompiendo así el equilibrio entre su síntesis y su degradación. En resumen, la actividad de MMP-9 se ve estabilizada por la presencia de NGAL ^(40; 41; 42; 47).

NGAL está compuesta por 8 cadenas β que forman un barril con láminas β que contiene un bolsillo el cual une y transporta moléculas de bajo peso molecular ⁽⁴⁸⁾. En humanos NGAL es una cadena de 178 aminoácidos que pesa 25 kDa la cual predomina en su forma monomérica. Ésta es expresada por neutrófilos y otras células epiteliales incluyendo aquellas del túbulo colector proximal del riñón ⁽⁴⁹⁾. Aparentemente tiene una función uniendo sideróforos (pequeñas moléculas transportadoras de hierro) ⁽⁵⁰⁾ mostrando una alta afinidad por los de origen bacteriano. NGAL constituye un componente del sistema inmune innato frente a infecciones bacterianas en tejidos expuestos al medio ambiente externo (tracto respiratorio, gastrointestinal y urinario) y su expresión se eleva cuando estos tejidos se encuentran infectados o inflamados ⁽⁵¹⁾.

Estudios realizados en ratones, muestran que cuando ocurre reperfusión renal isquémica, se produce un aumento en la producción de NGAL en un estado temprano, siendo detectada en la orina dentro de 2 horas luego de producida la isquemia ⁽⁵²⁾. Se ha visto también, que en animales la NGAL es un marcador de nefrotoxicidad ⁽⁵³⁾. En este sentido el papel fisiológico de la NGAL puede ser el de disminuir el daño, tanto por reducción de la apoptosis como por incremento de la proliferación normal de las células del túbulo renal. Otro mecanismo de protección de las células de túbulo renal que genera esta lipocalina, es a través del incremento de la liberación de hierro y sobreexpresión de la hemo oxigenasa-1 ^(51; 54; 55; 56; 57).

Otros estudios muestran que en placas ateroscleróticas la NGAL promovería una actividad proteolítica prolongada y aumentada, provocando una desestabilización de la malla colágena haciendo más susceptibles las placas a la

erosión y ruptura con una subsecuente trombosis e infarto ⁽⁴³⁾. También se ha visto una relación entre la actividad del complejo MMP-9/NGAL y la profundidad de la invasión tumoral ⁽⁴⁴⁾. La NGAL se ha encontrado, por otro lado, en fluido sinovial de pacientes con osteoartritis ⁽⁴⁵⁾.

Un estudio realizado en glándula submandibular de 10 pacientes con sialoadenitis crónica, indica que la NGAL se sobreexpresa en el infiltrado inflamatorio y en las células ductales de la glándula en relación al tejido glandular de individuos controles ⁽⁵⁸⁾. Otro estudio realizado en glándula salival labial de individuos con polineuropatía amiloidea, establece que existe una sobreexpresión de los mRNA de NGAL y una sobreexpresión de MMP-9 de 130 kDa en relación a individuos controles ⁽⁴⁶⁾.

A la fecha, no existen estudios sobre la presencia de NGAL en glándula parótida o en la saliva producida por ella, en condiciones de normalidad o patológica.

La presencia de complejos moleculares de MMP-9 de 130 kDa en la saliva parotídea proveniente de glándulas afectadas por PCRI sugiere que podría tratarse de una asociación molecular de esta metaloproteasa con NGAL.

Basado en estos antecedentes en este trabajo se propone analizar la saliva parotídea de pacientes con PCRI mediante la técnica de western-blot con anticuerpo anti-NGAL en condiciones desnaturizantes y desnaturizantes/reductoras, con la finalidad de identificar complejos moleculares de NGAL.

HIPÓTESIS

La saliva parotídea producida por glándulas clínicamente afectadas en pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil, presenta una mayor frecuencia de bandas de distintos tamaños moleculares correspondientes a la NGAL, que la saliva producida por glándulas no afectadas de los mismos pacientes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de bandas de distintos tamaños moleculares correspondientes a NGAL, en la saliva parotídea de pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil y relacionarla con el compromiso clínico de la glándula parótida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar mediante la técnica de western-blot y según tamaño molecular, las bandas correspondientes a NGAL, en muestras de saliva producida por glándulas parótidas afectadas y no afectadas clínicamente por PCRI, separadas electroforéticamente en condiciones desnaturizantes y en condiciones desnaturizantes/reductoras.
- b) Determinar la frecuencia de bandas de NGAL que se presenten en las muestras de saliva parotídea proveniente de glándulas afectadas y no afectadas clínicamente, en pacientes con PCRI.
- c) Comparar la frecuencia de cada una de las bandas correspondientes a NGAL identificadas en saliva parotídea proveniente de glándulas afectadas, con las de saliva parotídea de glándulas no afectadas clínicamente, en pacientes con PCRI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos:

Se conformó 1 grupo compuesto por 33 pacientes de entre 6 y 14 años de edad, de ambos sexos, con diagnóstico de PCRI y que se encontraban en tratamiento en el Servicio Máxilo-facial Infantil del Hospital San Juan de Dios. Los criterios de inclusión fueron:

- a) Historia de al menos dos episodios inflamatorios agudos parotídeos en la misma glándula.
- b) Imagen sialográfica parotídea compatible con diagnóstico de PCRI.
- c) Ausencia de enfermedades sistémicas.

El presente trabajo de Investigación para optar al Título de Cirujano Dentista, se realizó adscrito al Proyecto FIOUCH 09-02, que ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. (Anexo)

Recolección de saliva:

La recolección fue realizada por un único operador calibrado para esta maniobra. La saliva se recolectó bajo estimulación lingual con ácido cítrico al 2%. En período de ausencia de compromiso clínico glandular, de todos los individuos incluidos en el estudio, se recolectó 1 ml de saliva parotídea, derecha e izquierda, según procedimientos descritos por Morales y cols.⁽³⁵⁾ Brevemente, un dispositivo termo-formado fue adosado a la cara interna de la mejilla, frente a la salida del conducto excretor parotídeo, el que se mantuvo fijo por presión negativa hasta completar la recolección de la muestra. (Figura N° 5). Las muestras de saliva fueron mantenidas en recipientes inmersos en hielo y trasladadas al laboratorio para su almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su procesamiento.

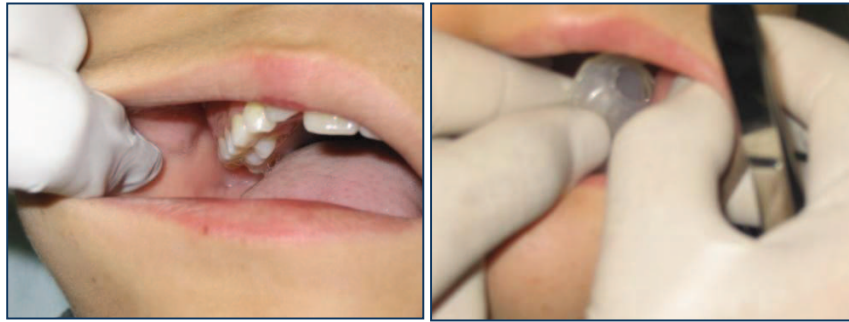


Figura N° 5: Inspección y Recolección de muestra vía conducto parotídeo ⁽³⁸⁾.

Western-blot:

Las muestras de saliva, fueron mezcladas con buffer de muestra en condiciones desnaturizantes y en condiciones desnaturizantes/reductoras con β -mercaptoetanol. Luego fueron separadas electroforéticamente a un voltaje constante de 100 V por 10 minutos y 200 V por 50 minutos, en un gel de poliacrilamida-SDS (10%) de acuerdo al procedimiento estandarizado de Laemmli ⁽⁵⁹⁾. Las proteínas así separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PIERCE, 0,45 μ m). Con el fin de bloquear sitios inespecíficos de unión a anticuerpo, cada membrana fue sumergida por una hora en 50 ml de albúmina al 3%. Posteriormente fueron lavadas con TBS-T al 0,1% y luego incubadas con un anticuerpo primario anti-human Lipocalin-2/NGAL (Monoclonal Rat IgG2A Clone# 220310 MAB-1757 R&D SYSTEMS) a una dilución 1:250 en TBS-T durante 17 horas. Este anticuerpo detecta Lipocalin-2/NGAL humana y no presenta reacción cruzada con Lipocalina-1 recombinante humana o Lipocalina-2 recombinante de ratón. También reconoce complejos Lipocalina-2/MMP-9 analizados bajo la técnica de western-blot en condiciones no reductoras. Luego, cada membrana fue lavada nuevamente con TBS-T y después incubada por una hora con un anticuerpo secundario Anti-RAT IgG (H&L GOAT Anticuerpo Conjugado con Peroxidasa ROCKLAND) a una dilución de 1:10000 en TBS-T. Tras sucesivos lavados con TBS-T, se identificó la reacción positiva utilizando el método de quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) para lo cual las membranas tratadas según el procedimiento descrito anteriormente, se expusieron a películas radiográficas (Kodak) las que se revelaron utilizando líquidos para revelar y fijar la imagen. Como control positivo se utilizó proteína NGAL

recombinante (RECOMBINANT HUMAN LIPOCALIN-2/NGAL R&D SYSTEMS 1757-LC-050) la que se procesó del mismo modo que las muestras de saliva en condiciones desnaturizantes/no reductoras. (Figura N° 7). Se comparó el tamaño molecular de las bandas con proteínas de tamaño conocido (precisión plus protein standards, BIO RAD).

Determinación de la frecuencia de bandas de NGAL de distintos tamaños moleculares:

Una vez reveladas las películas radiográficas, se contrastó la migración relativa de las bandas del estándar de peso molecular con respecto a la migración relativa de las bandas correspondientes a NGAL. Una vez obtenido el tamaño molecular de todas las bandas de la NGAL, se calculó la frecuencia de éstas en todas las muestras analizadas, con el fin de relacionarlas a glándulas parótidas afectadas y no afectadas clínicamente por PCRI, en condiciones desnaturizantes y desnaturizantes/reductoras. Para esto se tomaron fotos de cada película radiográfica y se detectó visualmente la presencia o ausencia de cada una de las bandas de distintos tamaños moleculares.

Análisis estadístico:

Se determinó el número de bandas de NGAL de distinto tamaño molecular presente en las muestras analizadas. La frecuencia de cada una de las bandas correspondientes a NGAL salival, que presentaron las muestras de saliva parotídea de pacientes con PCRI, se analizaron aplicando el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher según fuera el caso. La significación estadística fue fijada en $p < 0,05$. Se utilizó el programa estadístico STATA® 9.1.

RESULTADOS

La Tabla N° 1 resume la edad, sexo y el compromiso clínico según lateralidad, del total de pacientes con PCRI incluidos en este estudio. De ellos, 17 presentaban un cuadro bilateral y 16 un cuadro unilateral, de esta manera según el diagnóstico clínico-sialográfico y por lo tanto, según el compromiso clínico de la glándula parótida, se encontraron 16 glándulas parótidas no afectadas clínicamente (grupo control) y 50 glándulas afectadas clínicamente (grupo experimental). De las glándulas afectadas clínicamente, 21 resultaron ser parótidas del lado derecho y 29 del lado izquierdo; y de las glándulas no afectadas clínicamente, 11 fueron derechas y 5 izquierdas. El análisis estadístico indica que la lateralidad de la glándula no influye en su compromiso clínico (Test exacto de Fisher $p < 0,05$) (Tabla N° 2).

Tabla N° 1. Distribución por edad, sexo y lateralidad del compromiso clínico en pacientes con PCRI.					
Variable	Sexo		Edad en años	Lateralidad	
	F	M		Unilateral	Bilateral
Pacientes con PCRI (n=33)			$\bar{x} \pm D. E.$ (rango)		
	11	22	$10 \pm 3,6$ (6 – 14)	16	17

F = Femenino.

M = Masculino.

\bar{x} = Promedio.

D. E. = Desviación Estándar.

n = Número de pacientes.

Tabla N° 2. Estado clínico de la Glándula Parótida según localización anatómica.

Lado glándula	GP Derecha	GP Izquierda	Total
Afectada clínicamente	21	29	50
No afectada clínicamente	11	5	16
Total	32	34	66

*Test exacto de Fisher $p = 0,057$

GP = Glándula Parótida.

Identificación de bandas de distinto tamaño molecular correspondientes a NGAL, en el total de muestras de saliva parotídea de pacientes con PCRI.

Al realizar un análisis exploratorio de los datos en relación a las bandas de distinto tamaño molecular correspondientes a NGAL, observadas en condiciones desnaturalizantes no reductoras, se pudo identificar un total de 7 bandas de los siguientes tamaños moleculares: > 250, 55, 50, 47, 37, 30 y 25 kDa (Figura N° 6). En tanto que, en condiciones desnaturalizantes/reductoras las bandas identificadas fueron 5 y presentaban los siguientes tamaños moleculares: 75, 58, 55, 37 y 25 kDa (Figura N° 7).

Las mismas bandas se observaron al analizar por separado la saliva de glándulas afectadas y no afectadas clínicamente por PCRI; con excepción de la banda de 47 kDa, que se presentó sólo en saliva de glándulas afectadas clínicamente. La gran mayoría de las bandas observadas se expresaron en ambas condiciones clínicas.

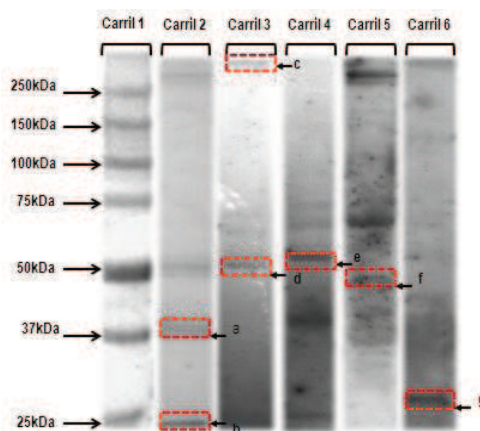


Figura N° 6: Western-blot de muestras representativas de saliva parotídea de distintos pacientes con PCRI, analizadas en condiciones desnaturalizantes/no reductoras. Se indica, Carril 1: Estándar de tamaño molecular. Carriles 2 - 6: las 7 bandas más representativas de NGAL de distinto tamaño molecular observadas en el conjunto de muestras de saliva analizadas (a - g): a) 37 kDa; b) 25 kDa; c) >250 kDa; d) 50 kDa; e) 55 kDa; f) 47 kDa y g) 30 kDa.

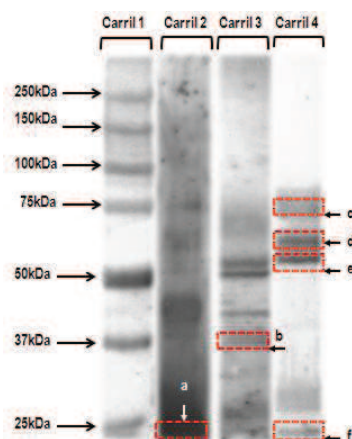


Figura N° 7: Western-blot de muestras representativas de saliva parotídea de distintos pacientes con PCRI, analizadas en condiciones desnaturalizantes/reductoras. Se indica: Carril 1: Estándar de tamaño molecular. Carril 2: a) Proteína NGAL Recombinante. Carriles 3 y 4: las 5 bandas más representativas de NGAL de distinto tamaño molecular observadas en el conjunto de muestras de saliva analizadas (b - f): b) 37 kDa; c) 75 kDa; d) 58 kDa; e) 55 kDa y f) 25 kDa.

Determinación de la frecuencia de bandas de NGAL, presentes en el total de las muestras de saliva provenientes de glándulas parótidas de pacientes con PCRI, en condiciones desnaturalizantes/no reductoras.

En la Tabla N° 3, se observan los resultados obtenidos respecto a la frecuencia en que se repiten las bandas de distinto tamaño molecular de NGAL en diferentes muestras, observando en forma conjunta la saliva proveniente de glándulas parótidas clínicamente afectadas (grupo experimental) y la de no afectadas clínicamente (grupo control) en condiciones desnaturalizantes no reductoras. Las bandas presentes con mayor frecuencia, en orden decreciente, correspondieron a las de >250, 25 y 50 kDa. Las bandas que se observaron con menor frecuencia, en orden ascendente, correspondieron a las de 47, 30, 55 y 37 kDa.

Tabla N° 3. Frecuencia de bandas de NGAL en muestras de saliva parotídea de glándulas afectadas y no afectadas clínicamente de pacientes con PCRI, en condiciones desnaturalizantes/no reductoras.

Banda	>250 kDa		55 kDa		50 kDa		47 kDa		37 kDa		30 kDa		25 kDa	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Presente	56	84,8	9	13,6	33	50	3	4,5	19	28,8	7	10,6	34	51,5
Ausente	10	15,2	57	86,4	33	50	63	95,5	47	71,2	59	89,4	32	48,5

n = Número de bandas de NGAL en el total de muestras de saliva parotídea.

% = Porcentaje de bandas de NGAL respecto al total de muestras de saliva parotídea.

Determinación de la frecuencia de bandas de NGAL, presentes en el total de las muestras de saliva provenientes de glándulas parótidas de pacientes con PCRI, en condiciones desnaturalizantes/reductoras.

La Tabla N° 4 resume los resultados obtenidos respecto a la frecuencia en que se repiten las bandas de distinto tamaño molecular de NGAL en diferentes muestras, analizando en forma conjunta tanto la saliva proveniente de glándulas parótidas clínicamente afectadas (grupo experimental) como la de no afectadas clínicamente (grupo control) en condiciones desnaturalizantes/reductoras. Las bandas presentes con mayor frecuencia, en orden decreciente, correspondieron a las de 58, 25, 75 y 55 kDa. La banda que se observó con menor frecuencia, corresponde a la de 37 kDa.

Tabla N° 4. Frecuencia de bandas de NGAL en muestras de saliva parotídea de glándulas afectadas y no afectadas clínicamente de pacientes con PCRI en condiciones desnaturalizantes/reductoras.

Banda	75 kDa		58 kDa		55 kDa		37 kDa		25 kDa	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Presente	44	66,7	56	84,8	43	65,2	10	15,2	46	69,7
Ausente	22	33,3	10	15,2	23	34,8	56	84,8	20	30,3

n = Número de bandas de NGAL en el total de muestras de saliva parotídea.

% = Porcentaje de bandas de NGAL respecto al total de muestras de saliva parotídea.

Determinación de la frecuencia de bandas de NGAL, en muestras de saliva parotídea según compromiso clínico glandular en pacientes con PCRI, en condiciones desnaturalizantes/no reductoras.

Para relacionar la frecuencia de cada una de las bandas correspondientes a NGAL identificadas en saliva parotídea en condiciones desnaturalizantes no reductoras con el compromiso clínico de la glándula parótida, se procedió a comparar la frecuencia de bandas de NGAL en la saliva proveniente de glándulas parótidas afectadas versus las identificadas en saliva parotídea de glándulas no afectadas clínicamente por PCRI. En general se observó que todas las bandas se presentaron con una frecuencia similar en ambas situaciones clínicas. (Tabla N° 5).

Tabla N° 5. Frecuencia de bandas de NGAL en muestras de saliva parotídea de pacientes con PCRI, según compromiso clínico de las glándulas parótidas, en condiciones desnaturalizantes/no reductoras.

Banda \ Estado Glandular	>250 kDa		55 kDa		50 kDa		47 kDa		37 kDa		30 kDa		25 kDa	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Afectada (N = 50)	43	86	8	16	25	50	3	6	17	34	6	12	29	58
No afectada (N = 16)	13	81,3	1	6,3	8	50	0	0	2	12,5	1	6,3	5	31,3
*Test exacto de Fisher p=	0,456		0,300		0,613		0,428		0,087		0,455		0,057	

N = Número total de muestras de saliva de las glándulas parótidas, según compromiso clínico glandular.

n = Número de bandas de NGAL, presentes en cada categoría clínica glandular.

% = Porcentaje de bandas de NGAL, respecto del total (N) de muestras de saliva.

Determinación de la frecuencia de bandas de NGAL, en muestras de saliva parotídea según compromiso clínico glandular en pacientes con PCRI, en condiciones desnaturalizantes/reductoras.

Para relacionar la frecuencia de cada una de las bandas correspondientes a NGAL identificadas en saliva parotídea en condiciones desnaturalizantes/reductoras con el compromiso clínico de la glándula parótida, se procedió a comparar la frecuencia de bandas de NGAL en la saliva proveniente de glándulas parótidas afectadas versus las encontradas en saliva de glándulas parótidas no afectadas clínicamente por PCRI. Se observó que las bandas de 75, 37 y 25 kDa se presentaron con mayor frecuencia en glándulas clínicamente afectadas por la enfermedad. Las bandas de 55 y 58 kDa presentaron una frecuencia similar en ambas situaciones clínicas (Tabla N° 6).

Tabla N° 6. Frecuencia de bandas de NGAL en muestras de saliva parotídea de pacientes con PCRI, según compromiso clínico de las glándulas parótidas, en condiciones desnaturalizantes/reductoras.

Banda \ Estado Glandular	75 kDa		58 kDa		55 kDa		37 kDa		25 kDa	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Afectada (N = 50)	37	74	45	90	32	64	10	20	40	80
No afectada (N = 16)	7	43,8	11	68,8	11	68,8	0	0	6	37,5
*Test exacto de Fisher p=	0,029		0,054		0,488		0,049		0,002	

N = Número total de muestras de saliva de las glándulas parótidas, según compromiso clínico glandular.

n = Número de bandas de NGAL, presentes en cada categoría clínica glandular.

% = Porcentaje de bandas de NGAL, respecto del total (N) de muestras de saliva.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, han permitido describir por primera vez la presencia de NGAL en saliva parotídea de pacientes con PCRI, sugiriendo su participación en la etiopatogénesis de esta enfermedad.

La técnica de western-blot con anticuerpo anti-NGAL en condiciones no reductoras, permitió reconocer las bandas de tamaños moleculares de >250, 50, 47 y 30 kDa (Tabla N° 3) que no se observaron al hacer el análisis en presencia del agente reductor, lo que sugiere que corresponderían a complejos moleculares de esta lipocalina. La banda de 50 kDa podría corresponder a una forma dimérica de NGAL, en cambio, las otras bandas corresponderían a asociaciones heterotípicas de NGAL con moléculas no identificadas en el presente estudio. Se ha descrito la presencia de un complejo molecular de alrededor de 130 kDa, correspondiente a la unión de NGAL con MMP-9^(40; 41; 42), sin embargo, en nuestro estudio no encontramos complejos de estos tamaños moleculares. Como se mencionó anteriormente, en estudios previos, se describió la presencia de MMP-9 en saliva parotídea de pacientes con PCRI, de los tamaños moleculares: > 250, 250, 141, 100, 75, 60, 50, 47, 37, 29, 25 kDa⁽³⁹⁾. Es probable que algunas de las formas truncadas de MMP-9 descritas en ese estudio, formen complejos de tamaños inferiores al descrito para MMP-9/NGAL. En condiciones no reductoras, las bandas de 55 y 25 kDa se observaron en un 13,6% y un 51,5%, de las muestras de saliva parotídea respectivamente (Tabla N° 3). Al analizar la saliva en condiciones reductoras, estas formas de NGAL aumentaron su frecuencia a un 65,2% y un 69,7%, respectivamente (Tabla N° 4) lo que podría ser explicado por la disociación de los complejos moleculares que desaparecieron en presencia del agente reductor.

Al hacer el análisis en condiciones reductoras se observaron las bandas de 75, 58, 55, 37 y 25 kDa (Tabla N° 4). La banda de 25 kDa correspondería a la forma monomérica de NGAL, que nosotros esperábamos encontrar en estas condiciones de análisis. Sin embargo, también fue posible encontrar bandas de mayor tamaño molecular a la forma monomérica de NGAL, que podrían

corresponder a asociaciones de NGAL con otras moléculas, glicosilaciones u otras modificaciones postraduccionales de la proteína. Las bandas de 75 y 55 kDa podrían representar formas triméricas y diméricas de NGAL respectivamente. Las bandas de 58 y 37 kDa, podrían corresponder a asociaciones de NGAL con otras moléculas salivales. Estas formas moleculares podrían no ser susceptibles a la disociación por medio de las condiciones de reducción con β -mercaptoetanol, realizadas en este estudio. Análisis adicionales en condiciones distintas de disociación, serían necesarios para determinar si es posible disociar estos complejos de NGAL.

En este ensayo analizamos la presencia de NGAL en saliva parotídea derecha e izquierda de pacientes con PCRI unilateral o bilateral. Las glándulas que nunca habían presentado aumento de volumen clínico, fueron consideradas como glándulas sanas, para los fines de este estudio. Las distintas formas moleculares de NGAL no se observaron en todas las glándulas enfermas y además, fue posible observarlas en algunas glándulas sanas.

Las bandas de: >250, 55, 50, 47, 37, 30 y 25 kDa observadas en condiciones no reductoras (Tabla N° 5), y las bandas de: 55 y 58 kDa encontradas en condiciones reductoras (Tabla N° 6), se presentaron indistintamente en la saliva de glándulas sanas o enfermas de pacientes con PCRI. Sin embargo, las bandas de 75, 37 y 25 kDa observadas en condiciones reductoras, se presentaron con significativa mayor frecuencia en glándulas clínicamente afectadas por PCRI (Tabla N° 6); resultado que sugiere la participación de estas moléculas en el proceso de aumento de volumen clínico de la glándula parótida en esta patología. La presencia de NGAL en la saliva parotídea de glándulas sin compromiso clínico de aumento de volumen, sugiere un cuadro glandular subclínico. Esta situación ha sido sugerida por otros autores, al describir el compromiso del parénquima glandular en análisis imagenológicos, como sialografía o ultrasonografía, en glándulas parótidas de pacientes con PCRI que nunca han presentado cuadros de aumento de volumen parotídeo ^(1; 3; 17; 37).

Los escasos estudios histopatológicos del tejido glandular en cuadros de PCRI, indican que el proceso inflamatorio de la glándula parótida en esta entidad patológica, se caracteriza por un infiltrado linfocitario alrededor de ductos

glandulares dilatados ^(13; 60). Debido a la dificultad de biopsiar el tejido parotídeo, no ha sido posible obtener mayor información sobre las características de este fenómeno. Sin embargo, la presencia de NGAL en la saliva proveniente de glándulas de pacientes con PCRI, sugiere la participación de neutrófilos en el proceso inflamatorio ⁽⁴⁹⁾. El origen de múltiples formas moleculares de NGAL urinaria ha sido estudiado y se ha determinado que la forma monomérica de NGAL, que es utilizada para el diagnóstico de patología renal y cardíaca, es sintetizada y secretada por la célula tubular renal. En cambio, la forma dimérica sería secretada por neutrófilos activados en presencia de bacterias ⁽⁶¹⁾. Recientemente se ha descrito que el origen de ambas formas de NGAL puede ser identificado mediante inmuno ensayo ⁽⁶²⁾, de tal manera, mediante esta técnica sería posible dilucidar la probable participación de neutrófilos en PCRI, aporte que se pretendió realizar mediante el presente trabajo.

El conjunto de los resultados del presente estudio, sugieren que NGAL se encuentra involucrado en la etiopatogénesis de PCRI y pueden contribuir al esclarecimiento de este proceso patológico. Adicionalmente, esta molécula pudiese ser utilizada como un biomarcador de recurrencia glandular en la progresión de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

La saliva parotídea de pacientes con PCRI, analizada en condiciones no reductoras presenta 7 bandas correspondientes a NGAL de los tamaños moleculares: >250, 55, 50, 47, 37, 30 y 25 kDa.

La saliva parotídea de pacientes con PCRI, analizada en condiciones reductoras presenta 5 bandas correspondientes a NGAL de los tamaños moleculares: 75, 58, 55, 37 y 25 kDa.

La saliva parotídea proveniente de glándulas clínicamente comprometidas y de glándulas sin compromiso clínico de pacientes con PCRI, analizada en condiciones desnaturalizantes/no reductoras, presenta igual frecuencia de las bandas correspondientes a NGAL de los tamaños moleculares: >250, 55, 50, 47, 37, 30 y 25 kDa.

La saliva parotídea proveniente de glándulas clínicamente comprometidas de pacientes con PCRI, analizada en condiciones desnaturalizantes/reductoras, presenta con mayor frecuencia las bandas correspondientes a NGAL de los tamaños moleculares: 75, 37 y 25 kDa, al compararla con la saliva parotídea proveniente de glándulas no comprometidas clínicamente de los mismos pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chitre VV, Premchandra DJ (1997). Recurrent parotitis. *Arch Dis Child*. 77(4):359-63.
2. Baurmash HD (2004). Chronic recurrent parotitis: a closer look at its origin, diagnosis, and management. *J Oral Maxillofac Surg*. 62(8):1010-8.
3. Ericson S, Zetterlund B, Ohman J (1991). Recurrent parotitis and sialectasis in childhood. Clinical, radiologic, immunologic, bacteriologic, and histologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngo*. 100(7):527-35.
4. Landaeta M, Giglio MS, Ulloa MT, Martínez MJ, Pinto ME (2003). Clinical, microbiological aetiology and therapeutic aspects in infantil chronic recurrent parotitis (PCRI). *Rev chil pediatr*. 74(3):269-276.
5. Nazar M, Iñiguez FO, Der MC, Méndez C, García C, Arce J, Díazalesnik E (2001). Parotiditis aguda recurrente en el niño. *Rev chil pediatr*. 72(5):437-442.
6. Nahlieli O, Shacham R, Shlesinger M, Eliav E (2004). Juvenile recurrent parotitis: a new method of diagnosis and treatment. *Pediatrics*. 114(1):9-12.
7. Giglio MS, Landaeta M, Pinto ME (1997). Microbiology of recurrent parotiditis. *Pediatr Infect Dis J*. 16(4):386-90.
8. Vinagre C, Martínez MJ, Avendaño LF, Landaeta M, Pinto ME (2003). Virology of infantile chronic recurrent parotitis in Santiago de Chile. *J Med Virol*. 70(3):459-62.
9. Shkalim V, Monselise Y, Mosseri R, Finkelstein Y, Garty BZ (2004). Recurrent parotitis in selective IgA deficiency. *Pediatr Allergy Immunol*. 15(3):281-3.
10. Fazekas T, Wiesbauer P, Schroth B, Potschger U, Gardner H, Heitger A (2005). Selective IgA deficiency in children with recurrent parotitis of childhood. *Pediatr Infect Dis J*. 24(5):461-2.
11. Kolho KL, Saarinen R, Paju A, Stenman J, Stenman UH, Pitkaranta A (2005). New insights into juvenile parotitis. *Acta Paediatr*. 94(11):1566-70.
12. Concheiro G, Bellver C, Garrido R, García T (2000). Chronic recurrent parotitis in childhood. *An Esp Pediatr*. 53(5):418-21.
13. Shimizu M, Ussmuller J, Donath K, Yoshiura K, Ban S, Kanda S, y cols. (1998). Sonographic analysis of recurrent parotitis in children: a comparative study with

- sialographic findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 86(5):606-15.
14. Galili D, Marmary Y (1986). Juvenile recurrent parotiditis: clinicoradiologic Foyo-up study and the beneficial effect of sialography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 61(6):550-6.
 15. Mandel L, Bijoor R (2006). Imaging (computed tomography, magnetic resonance imaging, ultrasound, sialography) in a case of recurrent parotitis in children. *J Oral Maxillofac Surg.* 64(6):984-8.
 16. Ramírez J, Urrutia H, Aravena A (1996). Correlación entre la duración de la enfermedad y las imágenes sialográficas en casos con parotiditis recurrente unilateral. *Archivos de Odontoestomatología.* 12(9): 517-21.
 17. Geterud A, Lindvall AM, Nylén O (1988). Follow up study of recurrent parotidits in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 97(4 Pt 1):341-6.
 18. Rosti3n CG, Giuliano C, Acosta S (2004). Parotiditis cr3nica recurrente en el ni3o. *Rev chil pediatr.* 75(1):43-47.
 19. Moody AB, Avery CM, Walsh S, Sneddon K, Langdon JD (2000). Surgical management of chronic parotid disease. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38(6):620-622.
 20. Isaacs D (2002). Recurrent parotitis. *J Paediatr Child Health.* 38(1):92-4
 21. Ericson S, Sj3b3ck I (1996). Salivary factors in children with recurrent parotitis. Part 2: Protein, albumin, amylase, IgA, lactoferrin lysozyme and kallikrein concentrations. *Swed Dent J.* 20(5):199-207
 22. Tabak L, Mandel ID, Herrera M, Baumash H (1978). Changes in lactoferrin and other proteins in a case of chronic recurrent parotitis. *J Oral Pathol.* 7(2):91-9.
 23. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C, Apinhasmit W, Chen ZJ, Birkedal-Hansen H, y cols. (1997). Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol.* 171(2):117-24.
 24. Hanemaaijer R, Visser H, Konttinen YT, Koolwijk P, Verheijen JH (1998). A novel and simple immunocapture assay for determination of gelatinase-B (MMP-9) activities in biological fluids: saliva from patients with Sj3gren's syndrome contain increased latent and active gelatinase-B levels. *Matrix Biol.* 17(8-9):657-65.
 25. Asatsuma M, Ito S, Watanabe M, Takeishi H, Nomura S, Wada Y, y cols. (2004). Increase in the ratio of matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of

- metalloproteinase-1 in saliva from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Chim Acta*. 345(1-2):99-104.
26. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S (2006). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*. 85(1):22-32.
27. Sternlicht MD, Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17:463-516.
28. Nagase H, Woessner JF Jr (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 274(31):21491-4.
29. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldívar M, Puente J, Martínez B, y cols. (2005). Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res*. 40(3):199-207.
30. Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Rönkä H, y cols. (2000). Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res*. 35(5):259-65.
31. Jang CH, Shin SH, Cho HH, Moon SJ, Cho YB (2006). Expression of matrix metalloproteinase-9 and -2 in pediatric chronic otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 70(7):1155-8.
32. Ekekezie II, Thibeault DW, Simon SD, Norberg M, Merrill JD, Ballard RA, y cols. (2004). Low levels of tissue inhibitors of metalloproteinases with a high matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio are present in tracheal aspirate fluids of infants who develop chronic lung disease. *Pediatrics*. 113(6):1709-14.
33. Morales I, Urzúa B, Landaeta M, Montalbán R, Torres J, Pinochet A, y cols. (2007). Molecular alterations of parotid saliva in infantile chronic recurrent parotitis. *Pediatr Res*. 61(2):203-8.
34. Morales I, Urzúa B, Domínguez P, Aguilera S, López R (2006). Patterns and variability in electrophoretic polypeptide profiles of human saliva in a healthy population. *J Physiol Biochem*. 62(3):179-88.
35. Morales I, Domínguez P, López RO (1998). Devices for saliva collection from the major salivary glands. Results in normal subjects. *Rev Med Chil*. 126(5):538-47.

36. López RO, Morales I, Aguilera S (1998). Protein diffusion patterns in human saliva. *Rev Med Chil.* 126(9):1065-72.
37. Morales I, Landaeta M, Urzúa B, Retamales P (2008). Association between the occurrence of matrix metalloproteinases 2 and 9 in parotid saliva with the degree of parotid gland damage in juvenile recurrent parotitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 106(3):377-83.
38. Valverde G (2010). Identificación de formas moleculares de MMP-9 en saliva parotídea de pacientes afectados por parotiditis crónica recurrente infantil. *Trabajo de investigación para optar al título Cirujano-Dentista. Facultad de Odontología Universidad de Chile.*
39. Toloza N (2011). Identificación de formas moleculares de MMP-9 en condiciones desnaturalizantes/reductoras, en saliva parotídea de pacientes afectados por parotiditis crónica recurrente infantil. *Trabajo de investigación para optar al título Cirujano-Dentista. Facultad de Odontología Universidad de Chile.*
40. Tschesche H, Zölzer V, Triebel S, Bartsch S (2001). The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 268(7):1918-28.
41. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA (2001). The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem.* 276(40):37258-65.
42. Devarajan P (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Ther.* 5(B):463-470.
43. Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, y cols. (2006). Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(1):136-42.
44. Zhang H, Xu L, Xiao D, Xie J, Zeng H, Wang Z, y cols. (2007). Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. *J Clin Pathol.* 60(5):555-61.

45. Gupta K, Shukla M, Cowland JB, Malemud CJ, Haqqi TM (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is expressed in osteoarthritis and forms a complex with matrix metalloproteinase 9. *Arthritis Rheum.* 56(10):3326-35.
46. Sousa MM, do Amaral JB, Guimarães A, Saraiva MJ (2005). Up-regulation of the extracellular matrix remodeling genes, biglycan, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, and matrix metalloproteinase-9 in familial amyloid polyneuropathy. *FASEB J.* 19(1):124-6.
47. Malla N, Sjøli S, Winberg JO, Hadler-Olsen E, Uhlin-Hansen L (2008). Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes. *Connect Tissue Res.* 49(3):180-4.
48. Flower DR, North AC, Sansom CE (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta.* 1482(1-2):9-24.
49. Uttenthal LO (2005). NGAL: a marker molecule for the distressed kidney?. *Clin Lab Int.* 29:39-41.
50. Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, Li JY, Paragas N, Nicholas T, y cols. (2006). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 15(4):442-9.
51. Xu S, Venge P (2000). Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim Biophys Acta.* 1482(1-2):298-307.
52. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, y cols. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 14(10):2534-43.
53. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P (2004). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol.* 24(3):307-15.
54. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, y cols. (2005). Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 115(3):610-21.
55. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, y cols. (2004). Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 15(12):3073-82.

56. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N (1993). Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 268(14):10425-32.
57. Herget S (2005). One step forward in the early detection of acute renal failure. *Lancet.* 365(9466):1205-6.
58. Woo JS, Kim KM, Kang JS, Zodpe P, Chae SW, Hwang SJ, y cols. (2007). Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in human salivary glands. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 116(8):599-603.
59. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
60. Ussmüller J, Donath K (1999). Clinical, histopathologic and immunohistochemical studies of chronic sialectatic parotitis in childhood and adolescence. *Klin Padiatr.* 211(3):165-71.
61. Cai L, Rubin J, Han W, Venge P, Xu S (2010). The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol.* 5(12):2229-35.
62. Mårtensson J, Xu S, Bell M, Martling CR, Venge P (2012). Immunoassays distinguishing between HNL/NGAL released in urine from kidney epithelial cells and neutrophils. *Clin Chim Acta.* 413(19-20):1661-7.

ANEXO



ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN.

ACTA N°: 2010/02

En Santiago, el 15/03/2010, el H. Consejo del Comité Ético de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, con asistencia de sus miembros permanentes:

Prof. Dra. María Angélica Torres V. (DDS).

Presidente CEC, Vicedecano Facultad de Odontología, U de Chile

Prof. Juan Cortés A. (DDS)

Secretario del CEC; Director del Departamento de Cirugía y Traumatología Bucal y Maxilofacial, Fac. de Odontología, U de Chile

Prof. Jorge Gamonal A. (DDS, PhD)

Miembro permanente del CEC; Director del Departamento de Odontología Conservadora, Fac. Odontología, U de Chile

Han revisado y aprobado el siguiente protocolo:

1. **Título completo del proyecto Clínico N° 2009/16: PCR1 Caracterización de complejos moleculares de metaloproteasa-9 salival y su asociación con el grado de compromiso glandular.**
2. **Investigador responsable:** Prof. Irene Morales Bozo
3. **Institución:** Área de Bioquímica, Departamento de Ciencias Físicas y Químicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
4. **Documentación Revisada:**
 - Proyecto Original
 - Consentimiento Informado (CI) y Asentimiento
 - Currículo del investigador responsable
 - Nómina y CV de los coinvestigadores y colaboradores directos de la investigación.
 - Carta de aceptación de la autoridad o autoridades administrativas de los establecimientos donde se realizará el estudio.

5.- Carácter de la población:

Se trata de una investigación observacional, descriptivo clínico, imagenológico, y genético en Niños entre 4 y 14 años con diagnóstico de Parotiditis crónica recurrente infantil (PCRI)

6.- Fundamentación de la aprobación

Este comité ha considerado que los antecedentes curriculares de la Dra. Irene Morales y de su equipo colaborador garantizan la ejecución del Estudio dentro de los marcos éticamente aceptables.

Este proyecto forma parte de un proyecto mayor que fue presentado y no retenido en el concurso Fondecyt, sin embargo el desarrollo de los objetivos de esta parte puede dar resultados que los investigadores puedan presentar como antecedente a un nuevo concurso Fondecyt.

El Comité Ético de la Facultad de Odontología manifiesta que este proyecto cumple con los principios de respeto a los derechos de las personas participantes según los criterios de evaluación basados en las pautas CIOMS, y Buenas Practicas Clínicas, aplicadas a nuestro País.

El formulario de consentimiento informado presentado para esta investigación, cumple con los requisitos exigidos.

La razón beneficio fue estimada aceptable para los participantes, los procedimientos de toma de muestra son no invasivos, no implican mayores riesgo para ellos y todos serán sin costo alguno, además el investigador se ha comprometido a resguardar la confidencialidad de los datos.

El Comité de Evaluación Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile podrá monitorear el cumplimiento del protocolo y protección de los participantes.



DRA MARIA ANGELICA TORRES V..
Presidente Comité Ético Científico Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Santiago, 15 de Marzo 2010
C.E # 04/2009
Acta N°: 16/2009