

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ESCUELA DE GRADUADOS  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
MENCIÓN PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL**

**Alfa-2 macroglobulina en saliva y su potencial como biomarcador  
del control metabólico en diabetes mellitus tipo 2**

Tesis adscrita a proyecto FIOUCH 13-002

**JUAN PABLO AITKEN SAAVEDRA**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Alejandro Escobar Álvarez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Gonzalo Rojas Alcayaga  
Irene Morales Bozo**

**Santiago - Chile**

## INDICE

1.	RESUMEN.....	3
2.	ABSTRACT.....	4
3.	INTRODUCCIÓN.....	5
	3.1 Diabetes Mellitus.....	5
	3.2 Control de la diabetes.....	6
	3.3 Saliva.....	10
	3.4 Biomarcadores y diagnóstico en saliva.....	10
	3.5 Aplicación potencial de la saliva humana en DM2.....	11
	3.6 Alfa 2 Macroglobulina.....	12
	3.7 Estructura de A2MG.....	13
	3.8 Funciones de A2MG.....	13
	3.9 Diabetes y A2MG.....	18
	3.10 Consideraciones finales.....	20
4.	HIPOTESIS.....	21
5.	OBJETIVO GENERAL.....	22
6.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	22
7.	MATERIAL Y METODOS.....	23
	7.1 Diseño del estudio.....	23
	7.2 Muestra.....	23
	7.3 Criterios de inclusión.....	24
	7.4 Criterios de exclusión.....	24
	7.5 Procedimientos.....	24
	7.5.1 Examen clínico y toma de muestras de saliva.....	24
	7.5.2 Determinación de HbA1c.....	25
	7.5.3 Determinación de A2MG.....	26
	7.5.4 Determinación de la velocidad de flujo salival.....	27
	7.5.5 Concentración de proteínas en saliva.....	27
	7.5.6 Determinación del pH de la saliva.....	28
	7.5.7 Recolección de saliva de parótida.....	28
	7.5.8 Recolección de saliva sublingual.....	29
	7.6 Análisis Estadístico.....	29
8.	RESULTADOS.....	30
	8.1 Características de los sujetos.....	31
	8.2 Detección de A2MG.....	32
	8.3 Asociación entre A2MG y HbA1c en sujetos con DM2.....	36
	8.4 Asociación entre A2MG y concentración de proteínas.....	39
	8.5 Asociación entre A2MG y pH en sujetos con DM2.....	42
	8.6 Asociación entre A2MG y VFS en sujetos con DM2.....	44
9.	DISCUSIÓN.....	46
10.	CONCLUSIONES.....	55
11.	REFERENCIAS.....	56

## 1. RESUMEN

La diabetes tipo 2 (DM2) es la enfermedad metabólica más frecuente del mundo. Si no es rigurosamente controlada por parte del sujeto afectado, puede comprometerse la integridad de sistemas y órganos y consecuentemente, derivar en el desarrollo de alteraciones renales, cardiovasculares, neurológicas, orales aumentar la predisposición a infecciones oportunistas. La medición continua de los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), es fundamental para prevenir las complicaciones derivadas de la progresión de la enfermedad ya que mide en sangre, el porcentaje de hemoglobina unida a la glucosa en un lapso de 90 días. Este valor en definitiva, representa el grado de control metabólico de la enfermedad. El objetivo de un adecuado control de la DM2, es mantener una HbA1c por debajo de 7% y de esta forma, evitar las complicaciones asociadas.

Actualmente los biomarcadores en saliva, son utilizados como método de diagnóstico e indicativos del grado de progresión y control, de diferentes enfermedades tanto orales como sistémicas. Un estudio reciente demostró que los niveles de la proteína  $\alpha$ -2-macroglobulina (A2MG) detectados en saliva presentan un incremento significativo en sujetos con DM2 en comparación con aquellos sujetos en estados pre diabético. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación que existe entre A2MG detectada en saliva en sujetos con DM2 y los valores de HbA1.

Se reclutaron 120 sujetos con diagnóstico de DM2 a los cuales se les tomó una muestra de saliva para determinar la concentración de A2MG a través de la técnica de ELISA. Posteriormente se correlacionó esta variable con los valores de HbA1 obtenidos en sangre en cada individuo. Además, se asociaron los niveles de A2MG con otras variables, como la velocidad de flujo salival (VFS), pH y concentración de proteínas.

El análisis de los resultados muestra una correlación positiva entre A2MG y HbA1. También observamos una correlación positiva entre las variables A2MG y concentración de proteínas en saliva y una correlación negativa entre A2MG y pH salival. Estos resultados sugieren que la determinación de A2MG en saliva es una alternativa de evaluación de control metabólico de la diabetes que eventualmente podría complementar o reemplazar a la HbA1, ya que es un procedimiento más sencillo, no invasivo y de bajo costo que podría favorecer una mayor adherencia a los mecanismos de control de la enfermedad por parte de los sujetos enfermos y mejorar su calidad de vida.

**Palabras claves:** Alfa-2-macroglobulina, hemoglobina glicosilada, saliva, diabetes mellitus

## 2. ABSTRACT

Type 2 diabetes (DM2) is the most common metabolic disease in the world. If not carefully controlled by the individual affected, may compromise the integrity and organ systems, and consequently lead to the development of renal, cardiovascular, neurological, oral increase susceptibility to opportunistic infections alterations. Continuous measurement of glycated hemoglobin ( HbA1c) , is essential to prevent complications of disease progression as measured in blood, the percentage of hemoglobin bound to glucose within 90 days. This value ultimately represents the metabolic control of the disease. The purpose of proper control of DM2 is to maintain HbA1c below 7 % and thus avoid the associated complications.

Currently the biomarkers in saliva are used as a diagnostic and indicative of the degree of progression and control of various oral diseases such as systemic both. A recent study showed that the levels of  $\alpha$  -2 - macroglobulin (A2MG) detected in the saliva protein exhibiting a significant increase in subjects with T2DM compared to those subjects in pre diabetic state. The aim of this study was to evaluate the association between A2MG detected in saliva in subjects with T2DM and HbA1c values .

120 subjects diagnosed with DM2 to which they took a saliva sample to determine the concentration of A2MG by ELISA were recruited. Later this variable was correlated with HbA1c values obtained in blood in each individual. Furthermore, A2MG levels were associated with other variables such as the rate of salivary flow (VFS), pH and total protein concentration.

The analysis of the results shows a positive correlation between A2MG and HbA1. We also observed a positive correlation between the variables and A2MG free protein concentration in saliva and a negative correlation between salivary pH and A2MG. These results suggest that the determination of A2MG Saliva is an alternative assessment of metabolic control of diabetes that could eventually supplement or replace the HbA1, since it is a simpler procedure, non-invasive and inexpensive that could result in increased adherence to the control mechanisms of the disease by the diseased subjects and improve their quality of life

Keywords: Alpha-2-macroglobulin, glycosylated hemoglobin, saliva, diabetes mellitus

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica del metabolismo de los carbohidratos. Se manifiesta en su expresión total con hiperglicemia, glucosuria, catabolismo proteico, cetosis y acidosis (1). Está provocada por una disminución o ausencia de secreción de insulina y/o de su actividad biológica y se asocia con lesiones secundarias específicas en la micro circulación, así como con trastornos neuropáticos y predisposición a desarrollar arteriosclerosis (2). Con el tiempo compromete la integridad de sistemas y órganos, produciendo enfermedades renales, arteriosclerosis, ceguera, neuropatía, predispone a infecciones como candidiasis y puede complicar el embarazo (3).

La diabetes tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune que ocasiona la destrucción de células  $\beta$ . Habitualmente se presenta en la infancia, representa el 5% -10% de todas las diabetes, y está asociado con la presencia anticuerpos en los islotes celulares del páncreas. Los pacientes necesitan insulina inyectable en forma permanente y de por vida. Sin embargo, el mayor porcentaje de sujetos afectados por la diabetes, presenta el tipo 2 (DM2). La DM2 está influida por factores como estilo de vida, edad, el embarazo y obesidad, además de tener un fuerte componente de carga genética (4). El 14 de septiembre de 2011, la Federación Internacional de Diabetes anunció que 336 millones de personas en el

mundo tienen DM2 y que la enfermedad es responsable de 4,6 millones de muertes cada año, promediando una muerte cada siete segundos (5). Los estudios permiten afirmar que la DM2, representa una gran carga económica sobre los individuos y la sociedad en todos los países de Latinoamérica, incluido Chile (6).

La DM2, necesita de un riguroso control por parte del enfermo que la padece. Cuando esto no se logra, pueden existir complicaciones asociadas a la progresión de la enfermedad que se clasifican en agudas, que ocurren en el curso de días a semanas conduciendo casi siempre a la hospitalización del paciente y las crónicas, que se desarrollan a lo largo de varios meses o años de enfermedad. Estas últimas determinan no solo el pronóstico del paciente, sino también su calidad de vida (1, 3).

### **3.2. Control de la diabetes.**

El mantenimiento de niveles adecuados de glucosa en sangre (glicemia), es uno de los principales objetivos de la medicina preventiva, ya que cuando éste no se mantiene en los márgenes considerados normales, los sujetos con DM2, pueden presentar importantes consecuencias sistémicas (5,6). La evidencia científica relaciona un pobre control de la glicemia con patologías renales, neurológicas y sobre todo, cardiovasculares. Las complicaciones macrovasculares (cardiopatía isquémica, accidente cerebro vascular y enfermedad vascular periférica)

constituyen las principales causas de morbilidad y mortalidad en sujetos con diabetes tipo 2 (7). La prevalencia de la hipertensión arterial (HTA), afecta a un porcentaje entre un 40 y 50% de los sujetos con diagnóstico de DM2 (8).

Si bien, la glicemia instantánea es el método de control más utilizado por los pacientes con DM2, es el examen de la hemoglobina Glicosilada (HbA1c) el que proporciona datos más certeros respecto del real control metabólico de la enfermedad, ya que mide el porcentaje de hemoglobina unida a la glucosa en un lapso de 60 a 90 días. Además, la medición de HbA1c, en comparación con la de la glicemia instantánea, ofrece un mejor índice de exposición a altos niveles de glucosa en sangre e indica con mayor certeza, el riesgo de padecer complicaciones sistémicas asociadas a la DM2 en el largo plazo (9). Presenta además, una menor variabilidad biológica, así como menor inestabilidad pre analítica. La toma de muestra no guarda relación con el ayuno y sus resultados se afectan discretamente en los procesos agudos que habitualmente alteran las cifras de glicemia (4). Este examen también es utilizado para diagnosticar la enfermedad. Valores de HbA1c  $\geq 6,5$  % es indicativo del padecimiento de diabetes en tanto que niveles de entre un 6 y 6,5 %, sugiere estados prediabéticos (4).

Si bien el test de HbA1c es ampliamente utilizado, tiene el inconveniente de requerir de una muestra sanguínea para su determinación. El objetivo de un adecuado control de la diabetes, una vez diagnosticada, es mantener una HbA1c por debajo de un 7%, correspondiente al parámetro metabólico de control

aceptable (3). Las variaciones encontradas con respecto a grupos raciales o étnicos son relativamente pequeñas ( $\leq 0,4$  % HbA1c) y no son clínicamente significativas. El incremento de HbA1c con la edad, es alrededor de 0,03 % por año en individuos no diabéticos y algunos autores concluyen que este incremento es mínimo y que no se necesitan modificaciones en cuanto a las metas esperadas en el tratamiento de la DM2 según rango etareo de los sujetos afectados (10).

La determinación de HbA1c es un método validado y preciso en la detección de la hiperglicemia crónica y se correlaciona con el riesgo de aparición de las complicaciones de la DM2. El reporte del Comité de expertos por ejemplo, señala que la prevalencia de retinopatía en sujetos con DM2, se incrementa sustancialmente cuando los valores de HbA1c se encuentran por sobre el 7%. (11). Lamentablemente, el 44% de los sujetos con DM2 controlados farmacológicamente y sólo el 29,8% de la población diabética que no consume fármacos, presenta una HbA1c menor a 7%. La evidencia científica, como se ha señalado, ha demostrado de manera categórica la relación directa entre valores de control metabólico aceptable de la HbA1, en la reducción de las complicaciones micro y macrovasculares de la DM2 (7). Por lo mismo, la detección de la enfermedad en estadios precoces conforme los valores que presenten de HbA1c, podría evitar, mediante la intervención oportuna, patologías asociadas a la progresión de la enfermedad (4).



### 3.3. Saliva

La saliva es una secreción mucoserosa exocrina, clara y levemente ácida. Está compuesta por una variedad de electrolitos, pequeñas sustancias orgánicas, proteínas, péptidos y polinucleótidos. Tiene propiedades físicas, químicas, bioquímicas y biológicas que ofrecen protección a los tejidos de la cavidad bucal, por medio de su actividad antibacterial, antiviral y capacidad de lubricación y reparación de la mucosa oral (12).

La secreción diaria oscila entre 500 y 700 mL, con un volumen medio en la boca de 1,1 mL. Su producción está controlada por el sistema nervioso autónomo en el núcleo salival superior del puente encefálico y es estimulada por impresiones olfatorias, gustativas y mecánicas (13). Algunas enfermedades sistémicas como la DM2 y la hipertensión arterial, así como el uso de ciertos fármacos, pueden repercutir en un menor flujo salival (14).

La concentración proteica de la saliva es bastante estable, (entre 0,5 a 3 mg/mL), siendo más significativa en la secreción parotídea. Sin embargo, en presencia de infecciones bucales, en enfermedades sistémicas como la DM2 o en sujetos que han sido sometidos a irradiación post tratamiento por cáncer, la concentración total de proteínas puede ser mayor (15,16). Además de mantener la osmolaridad y capacidad tampón, las proteínas salivales también participan en diversas

funciones específicas. El número aproximado de las distintas proteínas salivales es de 100 a 140 (16), donde aproximadamente el 30-40% son sintetizadas por las glándulas salivales, mientras que otras proteínas se originan a partir del trasudado del suero (17,18).

### **3.4. Biomarcadores y diagnóstico en saliva**

Hasta el momento, los métodos de diagnóstico convencionales para la detección de enfermedades sistémicas, han sido de gran utilidad. Sin embargo, la ciencia médica se ha focalizado en buscar métodos alternativos para diagnosticar y pronosticar enfermedades de una manera menos invasiva, menos dolorosa y que además, permitan tomar varias muestras durante el día. En este sentido, y así lo demuestran estudios recientes, la saliva puede ser de gran utilidad. Este fluido, además de ofrecer protección a los tejidos de la cavidad bucal y participar en la facilitación de procesos fisiológicos orales (19), representa una posibilidad de medio auxiliar de diagnóstico, dado el bajo costo económico, la facilidad de evaluación y la baja complejidad de obtención de biomarcadores, cuya presencia y/o nivel en la sangre, orina, saliva o en algunas células o tejidos, indica la existencia de un proceso patológico, el riesgo de desarrollarlo o la respuesta a una terapia concreta. Actualmente, se han identificado biomarcadores en saliva y conforme la concentración detectada, se ha descrito la progresión de enfermedades entre las que incluyen el cáncer oral, síndrome de Sjögren, el

cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico y el Alzheimer, en cuyo caso por ejemplo, se ha determinado que la detección de los niveles de la  $\alpha\beta$  1-42 amiloide en saliva, es indicativo de progresión de la enfermedad y se avecina su utilización para la intervención terapéutica en estados iniciales (20). En otro ejemplo, diferencias estadísticamente significativas han sido establecidas entre sujetos con carcinoma espino celular (OSCC) y sujetos sanos dada la mayor concentración de interleuquina (IL)-8, SAT 1 y S100P detectada en la saliva de individuos con OSCC (21).

Si bien la saliva hace un par de décadas, era utilizada solamente para monitorear riesgo cariogénico (22) y progresión de enfermedad periodontal (23,24), actualmente la combinación de biotecnologías emergentes ha ampliado el conocimiento de biomarcadores en su composición, pudiendo constituir una fuente permanente para la supervisión y detección oportuna de algunas enfermedades o de su progresión.

### **3.5 Aplicación potencial de la saliva humana en DM2.**

Si bien los sujetos que padecen de DM2 pueden presentar una disminución del flujo de saliva (25) y cambios desde el punto de vista cualitativo, se ha podido determinar una serie de metabolitos o marcadores biomoleculares, indicativos de la presencia y progresión de estados prediabéticos al de la enfermedad

propriadamente tal. Recientemente se ha evaluado la saliva en un gran número de biomarcadores para DM. Rao *et al*, caracterizó el proteoma salival en DM2, obteniendo como resultados que la mayoría de las proteínas salivales presentes en pacientes con DM2 se relacionaban con procesos metabólicos (42%) e inmunológicos (11%) (26). Posteriormente, se realizaron estudios de validación de los potenciales biomarcadores identificados a través de inmunodetección dando como resultado que los niveles de alfa-1-antitripsina (A1AT), cistatina C (cys C),  $\alpha$ -2 macroglobulina (A2MG) y transtiretina (TTR) cuya detección por Western Blot demostró que estaban elevados en DM2. Sin embargo, un importante hallazgo de este estudio fue que del subgrupo de biomarcadores para DM2 establecida, la A2MG estaba diferencialmente incrementada en la saliva de los pacientes con la enfermedad y en aquellos con progresión de un estado pre-diabético a diabético (26).

### **3.6. Alfa 2 macroglobulina**

A2MG es una glicoproteína de alto peso molecular que está presente en fluidos corporales tanto de vertebrados como de invertebrados. Tiene muchas funciones diversas y complejas, pero su acción más conocida es su capacidad para inhibir un amplio espectro de proteasas sin bloquear directamente el sitio activo de las mismas. Se ha descrito también su implicancia en la regulación y transporte de un sinnúmero de moléculas entre las que podría considerarse la glucosa (27). Además, regula la unión de la transferrina a su receptor de superficie, se une a

proteínas de la mielina, y defensina y a varias citoquinas, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos básico ( $\beta$ FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), IL-1 $\beta$  e IL-6. También se une y regula la actividad de un gran número de hormonas y actualmente se le otorga un rol protector contra diversas infecciones, y por lo tanto, se podría utilizar como un biomarcador para el diagnóstico y el pronóstico de un número de enfermedades (27).

La A2MG se considera parte del sistema inmune innato, por lo que se estima ser proteínas evolutivamente conservadas (28). La A2MG ha sido aislada a partir la hemolinfa de invertebrados, de plasma de vertebrados y de la clara de huevo de las aves y los reptiles (29). La familia de las alfa macroglobulinas, la componen también las proteínas C3, C4 y C5 del complemento por lo que se considera estar relacionados evolutivamente, ya que poseen secuencias proteínicas muy similares (28).

### **3.7 Estructura de A2MG**

A2MG es una de las principales antiproteinasas presente en el plasma de los vertebrados. Tiene la capacidad de inhibir prácticamente cualquier proteasa, independientemente de su especificidad y mecanismo catalítico. Es una gran glicoproteína tetramérica (Mr 725.000) que se compone de subunidades idénticas (Mr 179.000) (30). Cada subunidad (humana) contiene 1451 aminoácidos unidos

a residuos de asparinas y 11 puentes disulfuro. Posee un sitio reactivo que se forma por esterificación de un grupo tiol b-SH de Cys-949 y un grupo g-carbonilo de GLX-952, que es susceptible a la desnaturalización por casi todas las endopeptidasas (32). Este cambio conformacional en estructura de A2MG permitiría no solo el atrapamiento de la proteínas sobre la cual ejerce su acción inhibitoria, sino también permitiría transporte de A2MG desde el plasma hacia otros fluidos como la saliva. En el caso del rol inhibitorio, A2MG forma un complejo con la proteína a inhibir que posteriormente es eliminado por células con capacidad fagocítica. (33)

### **3.8 Funciones de A2MG**

Si bien el principal rol de A2MG es la inhibición de proteasas, también protege el cuerpo contra los patógenos invasores, ya que puede inhibir proteinasas de origen no humano. A2MG también inhibe a las quimasas, proteínas producidas por los mastocitos y que son secretadas durante los procesos inflamatorios y que entre otras funciones, degradan la membrana basal, inactivan al receptor de la trombina y estimulan la secreción mucosa. A2MG inhibe a las quinasas, regulando su actividad (34). La acción de la transferrina (principal proteína de transporte de hierro en la sangre humana, también estaría regulado en gran parte por A2MG. Se ha sugerido que la fisiopatología de la anemia durante la respuesta de fase aguda de infecciones y enfermedades malignas puede ser explicada por el rol inhibitorio de potencial de A2MG (35).

A2MG es una proteína chaperona extracelular que inhibe la agregación de proteínas amorfas y fibrilares en la formación amiloide. (36). A2MG también se une a las defensinas, péptidos altamente abundantes y que poseen propiedades antimicrobianas, citotóxicas, y quimioatrayentes, además de preparar a los fagocitos en procesos defensivos e inflamatorios. Se sugiere que la A2MG puede funcionar como un eliminador de defensinas y otros mediadores peptídicos en tejidos inflamados y puede constituir un mecanismo importante en la regulación y la contención de la inflamación (37).

Por otro lado, después de lesiones traumáticas en el sistema nervioso central, la porción activa de la mielina (altamente inmunogénica) se libera en la circulación y se uniría rápidamente a A2MG, protegiéndose de la degradación por proteasas tales como la tripsina y la quimotripsina). (38)

La concentración de A2MG en el suero también depende de la dieta. Se encontró que la concentración en el suero A2MG fue mayor en los vegetarianos que en los omnívoros. (39). La dieta y la concentración de glucosa en plasma por ejemplo, podría incidir en las diferencias encontradas en sujetos con diabetes en comparación con sujetos no diabéticos.

Hochepped *et al.* (2002) (40) observaron que ratones deficientes de A2MG en suero, son más resistentes a una infección letal gram negativo, pero son más susceptibles a la acción de endotoxinas. Sugirieron entonces que A2MG juega un

doble rol durante una respuesta de fase aguda. Por un lado, favorece el establecimiento de una infección por gran negativos letal pero por otro, protegen al organismo de un choque endotóxico.

En otras enfermedades como el cáncer prostático y la influenza A1H1, se ha relacionado inversamente, un mayor grado de progresión de dichas enfermedades y la concentración de A2MG detectada en suero, atribuyéndole en estos estudios a esta proteína, un rol protector. Es en la influenza A1H1, una de las pocas enfermedades en que la A2MG también ha sido detectada en saliva, además del suero. A2MG podría ser un inhibidor natural de la inmunidad innata ante la infección por el virus de la influenza H1N1. El autor sugiere incluso, su utilización como vacuna recombinante para combatir el virus para lo cual, indica la necesidad de estudiar más profundamente, la estructura y función de la proteína. (41)

En la esclerosis múltiple, se describe que A2MG disminuye significativamente su concentración en plasma en sujetos que son tratados con Propil Oligopeptidasa (PREP), por lo que se sugiere utilizar esta proteína como marcador de la progresión de la enfermedad y/o de su tratamiento (42)

Se ha observado que pacientes que padecen de cáncer de próstata, presentan una disminución en la concentración sérica de de A2MG en la medida que la enfermedad progresa y presenta metástasis. Los autores indican la posible



utilización de esta proteína en la determinación de la progresión de esta enfermedad y sugieren el posible rol protector que podría ejercer en el desarrollo del cáncer (43).

A2MG tendría también un rol en el mecanismo de acción de proteínas plasmáticas, como son los factores de crecimiento insulínico (IGF), que forman parte de un sistema complejo que las células usan para comunicarse con su entorno fisiológico. Este sistema está formado por dos receptores de superficiales (IGF1R y IGF2R), dos ligandos (IGF-1 y IGF-2), y una familia de seis proteínas fijadoras (IGFBP 1-6) de alta afinidad. Desarrollan un papel activo en los procesos metabólicos y catabólicos. Se ha descrito que la IGF2R, asociados con A2MG, actúa como un inhibidor de proteasas. La formación de complejos IGF2R /A2MG podría contribuir a la regulación de la proteólisis y por lo tanto, la actividad metabólica de los IGFs. (44).

Otro estudio indica que los niveles de proteína C reactiva, proteína C3 del complemento, IL-6 y A2MG, difieren significativamente entre los pacientes con periodontitis crónica y agresiva siendo mayor en estos últimos (45).

En resumen, A2MG es una de las principales antiproteinasas presente en el plasma de los vertebrados. Tiene la capacidad de inhibir prácticamente toda proteínasa, independientemente de su especificidad y mecanismo catalítico. Respecto de esta función, impide el acceso de los sustratos al sitio activo de las distintas proteínas sobre las que ejerce su acción. Inhibe las proteinasas

liberados por los neutrófilos en el sitio de la inflamación o por fuentes exógenas tales como los patógenos. A2MG actúa también como una unión y proteína portadora para un gran número de citoquinas incluyendo el TNF, PDGF, NGF, IL-6, entre otros.

### **3.9 Diabetes y A2MG**

Recientemente, Takada *et al*, (46), correlacionó positivamente A2MG detectada en sangre y HbA1c, en 43 pacientes diabéticos. En este mismo estudio, se estableció que sujetos con complicaciones derivadas de la DM2 se correlacionaron positivamente con una mayor concentración de A2MG detectada en sangre. Veintiocho pacientes diabéticos con retinopatía mostraron mayor concentración de A2MG en comparación con 26 no diabéticos controles y 43 pacientes con DM2 pero sin retinopatía (46) Estas complicaciones de la DM2, generalmente se asocian a estados de mayor descompensación metabólica de la enfermedad, es decir, con valores de HbA1c >7.

Border M *et al* (47), establece que en sujetos con DM2 en comparación con sujetos sanos edéntulos presentan mayor concentración de biomarcadores en suero relacionados con procesos inflamatorios entre los que se encuentran A2MG. Otros estudios indican que indican que los niveles de A2MG en suero se incrementan en la sangre de sujetos con DM1 y DM2 con complicaciones

diabéticas en comparación con quienes no presentan estas complicaciones (48,-51).

Respecto a la asociación de la DM2 con otras enfermedades que pueden presentarse en forma concomitante como son las alteraciones cardiovasculares, Sowmya *et al* (52), inyectó A2MG en suero en ratas diabéticas observándose hipertrofia cardíaca lo que sería beneficioso para contrarrestar el daño del miocardio asociado a la diabetes. Este rol protector de la A2MG sería relevante considerando la estrecha relación entre DM2 y aumento del riesgo cardiovascular.

Actualmente la A2MG es una proteína utilizada como biomarcador de enfermedades sistémicas entre las que se encuentra la DM2. Sin embargo, hasta ahora no existen estudios que utilicen este biomarcador en saliva con el fin de determinar control metabólico y la progresión de la enfermedad la enfermedad. Además, aun no existe información respecto de las eventuales interacciones que pudiesen tener la concentración de proteínas en saliva, el pH, capacidad buffer y velocidad de flujo salival (VFS) con este biomarcador.

### **3.10 Consideraciones finales.**

En los sujetos que padecen de DM2, resulta fundamental la periodicidad en el control de la enfermedad y la detección su progresión. Hasta el momento, la hemoglobina glicosilada, constituye el único mecanismo de evaluación del control de la enfermedad. La selección de biomarcadores salivales para el diagnostico,

pronóstico y control metabólico de las enfermedades, tiene un amplio potencial, que beneficiará no solo el tratamiento y evaluación del estado de progresión de las enfermedades crónicas, sino que también, repercutirá en la calidad de vida de los sujetos que padecen de estas enfermedades. Dado que el método de recolección es poco invasivo y de eventual menor costo económico en su evaluación, podría significar una mayor adherencia al tratamiento y control de la enfermedad por parte del enfermo y podría asociarse al desarrollo de políticas públicas de prevención, control y tratamiento de la enfermedad.

#### **4. HIPÓTESIS**

Existe una relación positiva entre las concentraciones de alfa 2 macroglobulina en saliva y el mal control metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar asociación entre los valores de HbA1 en sangre y Alfa-2 macroglobulina en saliva de sujetos con diabetes tipo 2.

## **6. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

6.1 Determinar concentración de HbA1 en sangre y  $\alpha$ -2 macroglobulina en saliva en sujetos con diabetes tipo 2.

6.2 Determinar concentración de  $\alpha$ -2 macroglobulina en ausencia y presencia de saliva de sujetos sanos y diabéticos

6.3 Determinar concentración de  $\alpha$ -2 macroglobulina en saliva parotídea, saliva sublingual y saliva total.

6.4 Correlacionar valores de HbA1 en sangre con  $\alpha$ -2 macroglobulina en saliva en sujetos con diabetes tipo 2.

6.5 Correlacionar valores de  $\alpha$ -2 macroglobulina en saliva y concentración de proteínas, pH, y VFS en sujetos con diabetes tipo 2

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio de corte transversal con reclutamiento prospectivo, que comparó el test a utilizar (A2MG) y un gold estándar (HbA1)

### **7.2 MUESTRA**

Se estimó una muestra de 120 sujetos en base a los siguientes parámetros; un nivel de significancia de 0,05 y una potencia de 0,9, estimando una sensibilidad de un 90% y un mínimo aceptable para el límite inferior de confianza de 0,75. Los datos fueron registrados en una planilla Excel.

La totalidad de los sujetos reclutados pertenecían a la asociación de diabetes de Chile (ADICH), institución privada, pero sin fines de lucro que recibe a pacientes tanto de consulta espontánea como de derivación tanto pública como privada. Los sujetos que aceptaron participar, firmaron un consentimiento informado que cumple con las recomendaciones de la declaración de Helsinki (54). El trabajo de investigación fue aceptado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 1).

### **7.3 Criterios de inclusión**

Sujetos de ambos sexos con diagnóstico de DM2 confirmada en la ADICH conforme el criterio establecido por el Ministerio de Salud (MINSAL) (53). Se consideraron diabéticos tipo 2 aquellos individuos con una glicemia en cualquier momento del día y sin relación con el tiempo transcurrido desde la última comida mayor o igual a 200 mg/dl, test de glicemia en ayunas con valor mayor o igual a 126 mg/dl y/o prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) con glicemia 2 horas post carga  $\geq$  200 mg/dl.

### **7.4 Criterios exclusión**

Sujetos que presenten enfermedades reumatológicas, irradiados en zona de cabeza y cuello, embarazadas, enfermedades terminales, daño neurológicos y procesos inflamatorios agudos en boca.

### **7.5 Procedimientos**

#### **7.5.1 Examen clínico y toma de muestras de saliva.**

A todos los pacientes voluntarios, se les solicitó los resultados de Hemoglobina glicosilada (HbA1c) tomada con un máximo de 2 días previos a la toma de muestra salival.



Un único operador, previamente entrenado, tomó muestras de saliva no estimulada en un tubo de centrifugación Falcon 50 mL (BD Falcon, USA), previamente pesado y rotulado conforme el protocolo descrito por Navazesh (55). Los voluntarios no fumaron, no se cepillaron los dientes y no consumieron alimentos durante una hora previa a la toma de muestra. Luego de un enjuague con agua destilada y de 5 minutos de un estado de relajación previa, se solicitó a los participantes asumir la posición de cochero descrita por Shultz y utilizada por Navazesh (56) y depositar saliva durante 5 minutos. Una vez recogida la muestra de saliva en el tubo, se mantuvo en un recipiente a 5°C hasta su transporte al laboratorio de Biología celular y molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

#### **7.5.2 Determinación de HbA1c.**

HbA1c en sangre fue utilizado como el gold standard. Este examen se realiza en forma rutinaria en la ADICH para establecer control metabólico de la enfermedad utilizando el equipo Variant II de la marca Bio Rad, certificado ante el Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina de los Estados Unidos (57). El porcentaje que describe la metodología, se obtiene mediante cromatografía por afinidad que calcula la hemoglobina A total e indirectamente la HbA1c mediante una ecuación de regresión lineal y el inmunoanálisis, que determina

específicamente el porcentaje de HbA1c mediante la reacción de anticuerpos monoclonales (58). Se consideró conforme con el protocolo descrito por el comité de diagnóstico y clasificación de diabetes mellitus (57), un porcentaje de HbA1c mayor a 7%, descompensación metabólica, mientras que valores menores a este porcentaje, se consideró compensación metabólicamente.

### **7.5.3 Determinación de A2MG**

De la muestra de saliva se extrajeron 500  $\mu$ L para la determinación  $\alpha$ 2-macroglobulina humana utilizando un ensayo de Inmuno enzimo análisis (ELISA) cuantitativo para alfa 2 macroglobulina (GenWayBiotech, Inc.CA, USA). Para aquello, placas de ELISA (Falcon BectonDickinson, Hershey, USA) fueron sensibilizadas con IgY de pollo contra  $\alpha$ 2-Macroglobulina Humana (dilución1:450) en un volumen de100  $\mu$ l/pocillo en buffer bicarbonato 0.05 M (pH 9.6) durante 5 horas (h). Después de la incubación, la placa se lavó y posteriormente se bloqueó con 200  $\mu$ l/pocillo de buffer fosfato salino/albumina sérica bovina (PBS/BSA) al 1% por 2 h. a 37°C. Posteriormente se agregó 100  $\mu$ l/pocillo de  $\alpha$ 2-Macroglobulina Humana recombinante en diluciones seriadas (2000ng/mL-2,7ng/mL) y las muestras de saliva diluidas (1/10) y se incubaron por 1h a 37°C. Después de la incubación, la placa se lavó y posteriormente se agregó IgY de pollo contra  $\alpha$ 2-macroglobulina Humana conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) (dilución 1:500) en un volumen de100  $\mu$ l/pocillo en buffer bicarbonato 0.05 M (pH 9.6), incubando durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se reveló con solución de

sustrato TMB y la reacción fue detenida con TMB 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Las placas fueron leídas a 450 nm usando un lector de placas de ELISA (BD, Falcon. USA).

#### **7.5.4 Determinación de Velocidad de flujo salival (VFS)**

La saliva fue pesada por gravimetría asignando un peso específico de 1,005 g/mL al fluido y el volumen total determinado. Los resultados se expresaron en mililitros/ minutos (mL/min) conforme el protocolo descrito por Navazesh (56). Se consideró hiposialia, valores obtenidos menores a 0,2 mL/min y sialorrea con valores mayores a 1 mL/min.

#### **7.5.5 Concentración de proteínas en saliva**

Se utilizó el kit de ensayo colorimétrico de proteínas BioRad (BRL SD 500-0002, Richmond CA, USA). Se utilizaron estándares de albúmina bovina (BSA, Sigma). Las muestras de saliva a analizar se procesaron en duplicado, en diluciones sucesivas de 1:100 a 1:200 y se determinó la absorbancia a 595 nm. Con los datos obtenidos, se trazó una curva de calibración y se estimó la concentración de proteínas total en mg/mL.

### **7.5.6 Determinación del pH de la saliva**

Para la medición del valor del pH de las muestras salivales se empleó un pH-metro digital (Modelo PL-600 EZDO-OMEGA que cumple la norma ISO-9001), que de forma automatizada ofreció el valor del pH de forma digital con 2 decimales. Todas las mediciones se realizaron por el mismo operador y con la misma metodología: a) calibración del pH-metro; b) inmersión del electrodo en el tubo colector de saliva; c) lectura del valor del pH de la muestra 5 seg Luego de estabilizada ésta; d) lavado del electrodo con agua destilada, y e) conservación del electrodo en una solución tampón (60).

### **7.5.7 Recolección de saliva parotídea**

La saliva parotídea fue recolectada mediante un dispositivo desechable, de plástico termolaminado, el que se adosó por vacío a la cara interna de la mejilla en frente a la salida del conducto de Stenon, por el tiempo necesario para permitir que se acumulara el fluido en su interior (61)

### **7.5.8 Recolección de saliva Submandibular/sublingual**

La saliva Submandibular/sublingual fue recolectada aislando el vestíbulo bucal superior e inferior con algodón hidrófilo para absorber la saliva proveniente de otras glándulas y permitir que la saliva del complejo submandibular/sublingual se acumulara en el piso de boca, desde donde se aspiró con una pipeta plástica (61).

### **7.6 Análisis Estadístico**

Los datos referidos a los valores de las variables HbA1 y A2MG fueron expresados como promedios y desviación estándar. Se utilizó el test no paramétrico de correlación Spearman para la asociación entre las variables HbA1 y A2MG y para la asociación entre los valores A2MG en saliva y la concentración de proteínas, VFS y pH salival en sujetos con diabetes tipo 2. Para comparar los promedios obtenidos de A2MG y concentración de proteínas en saliva entre sujetos con valores de HbA1 mayores y menores a 7% se utilizó la prueba t Student. Las diferencias fueron consideradas significativas con un  $p < 0.05$ . El análisis se realizó con el software Stata 11.0 y GraphPad Prism 5.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Características de los sujetos

La tabla 1 muestra las características de sujetos incluidos (n=120) en este estudio. De la totalidad de la muestra, 45 sujetos, correspondiente al 37,5% mostraron valores de HbA1c menores a 7%, y fueron considerados compensados metabólicamente, mientras que 75 sujetos, correspondiente al 62,5% mostraron valores de HbA1c por sobre 7%, y fueron considerados descompensados metabólicamente. 81 sujetos (67,5%) fueron mujeres y 39 (32,5%) hombres. La edad promedio para la muestra fue de 61,6 (DS 10,1). El índice de masa corporal promedio (IMC) fue de 28,9 (DS 4,4).

El número de sujetos que además de tener DM2, era hipertenso (HTA) fue de 74 (61,6%). De la totalidad de los sujetos, 58 (48,3%) manifestaron sentir boca seca (Xerostomía) (Tabla I).

**Tabla I. Características de los sujetos \*.**

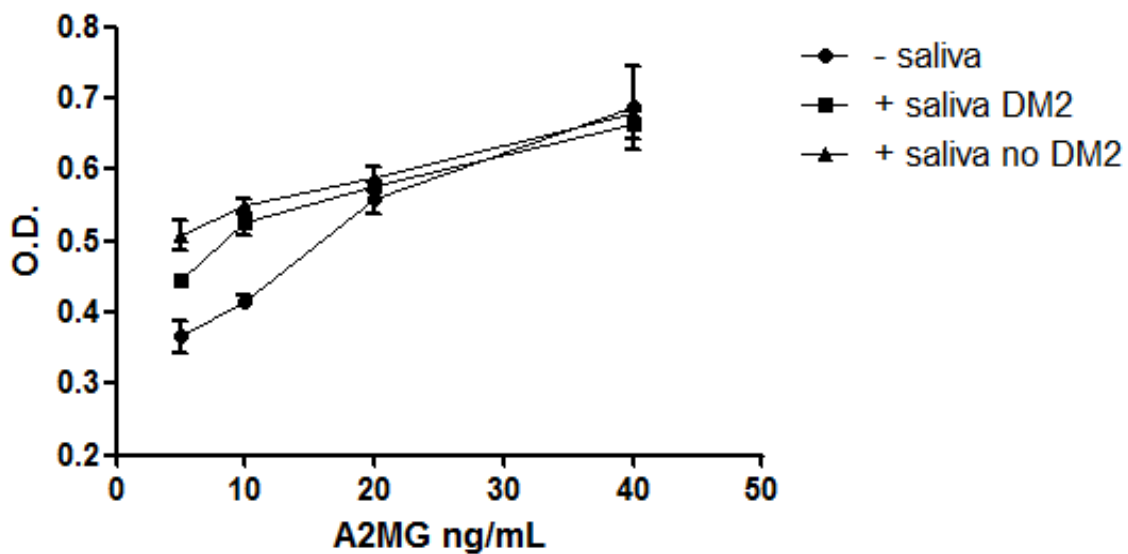
	HbA1c <7 % n=45 (37,5 %)	HbA1c>7% (n=75/ 62,5%)	Total (n=120/ 100%)
Sexo (n/% h)	12 ( 26,6)	27 (36%)	39 (32,5)
Edad (prom,DS)	60,2 (10,2)	62,4 (10,1)	61,6 (10,1)
IMC (prom, DS)	29,0 (4,2)	28,8 (4,5)	28,9 (4,4)
HTA (n / %)	29 (64)	45 (60)	74 ( 61,6)
Xerostomía (n / %)	22 ( 48,8)	36 (48)	58 (48,3)

\*Caracterización de datos epidemiológicos de la muestra, individualizada según grado de control metabólico de la enfermedad. Para ninguna de las variables especificadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. (h: nombres, DS: desviación estándar).

## 8.2 Detección de A2MG

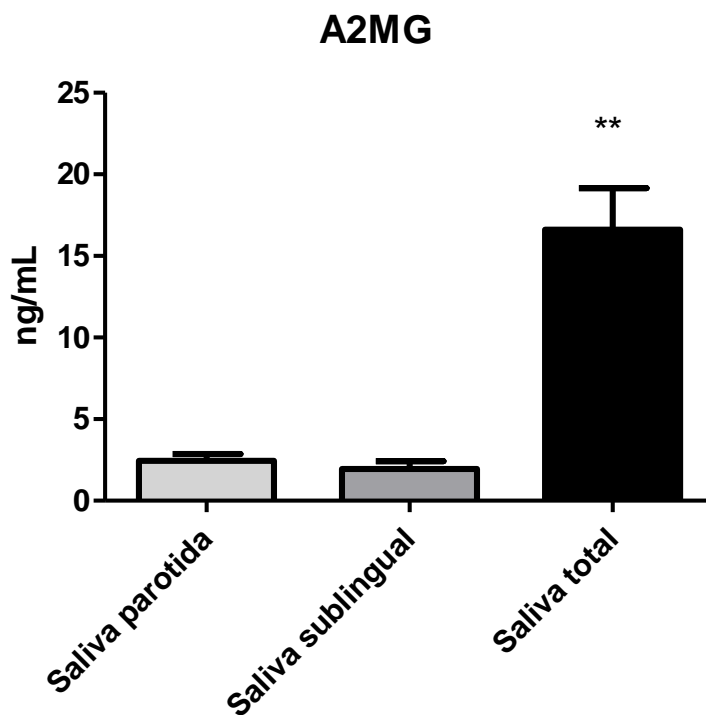
Dado que la saliva está compuesta por una variedad de electrolitos, pequeñas sustancias orgánicas, proteínas, péptidos y polinucleótidos que podrían interferir en la detección de la A2MG, se realizó un ensayo previo, cuyo objetivo fue confirmar que la detección por ensayo de ELISA no es afectada por la presencia de otro componente salival. Este ensayo consistió en identificar concentraciones de la proteína A2MG en ausencia o en presencia de saliva de sujetos con DM2 y controles sanos. En caso de existir alguna sustancia de cualquier origen que estuviera interfiriendo en la detección de A2MG, al agregar a la proteína recombinante, saliva tanto de sujetos diabéticos como sanos, la detección hubiese sido menor. Como muestra en la Figura 1, se detectaron concentraciones de la proteína A2MG en ausencia o en presencia de saliva de sujetos con DM2 y controles sanos. No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de detección cuando se agregó saliva de sujetos con DM2 y sanos respecto de la curva donde se utilizó solamente la proteína recombinante. Este resultado descarta la posibilidad de interferencia con algún componente salival en la detección de A2MG.





**Figura 1. Niveles de A2MG en ausencia y presencia de saliva de sujetos sanos y diabéticos.** Los niveles de A2MG recombinante humana en distintas concentraciones (40 ng/mL-0ng/mL) en presencia o ausencia de 100  $\mu$ l de saliva (1/25) fueron determinados por ELISA. Los niveles de A2MG son expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar. Los datos representan muestras triplicadas de 3 individuos.

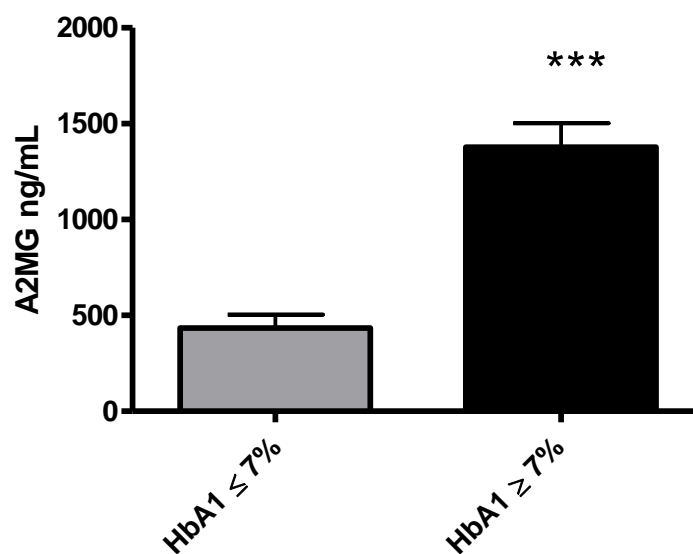
La A2MG es una glicoproteína que está presente en distintos fluidos corporales como la saliva. Sin embargo, no existen antecedentes que indiquen que su presencia salival corresponda únicamente a un trasudado o bien exista solamente una producción de la proteína por parte de las glándulas salivales. Con finalidad de determinar el origen de A2MG en saliva, realizamos en controles sanos, una detección diferenciada de A2MG en glándula parótida, glándulas sublinguales y saliva total. Como se observa en la Figura 2, hay mayor concentración de A2MG en la saliva total en comparación con la parotídea y sublingual, lo que sugiere que el origen de la glicoproteína en estudio no está determinado solamente por la producción a partir de glándulas salivales sino también provendría de fluidos como el crevicular o a partir de glándulas salivales menores.



**Figura 2. Niveles de A2MG en saliva parotídea, saliva sublingual y saliva total.** Fueron determinados por un ensayo de ELISA y expresados como el promedio  $\pm$  error estándar en ng/mL. Los datos representan muestras triplicadas de 4 individuos. Las diferencias significativas entre las distintas salivas están indicadas como \*\* ( $p < 0.05$ ).

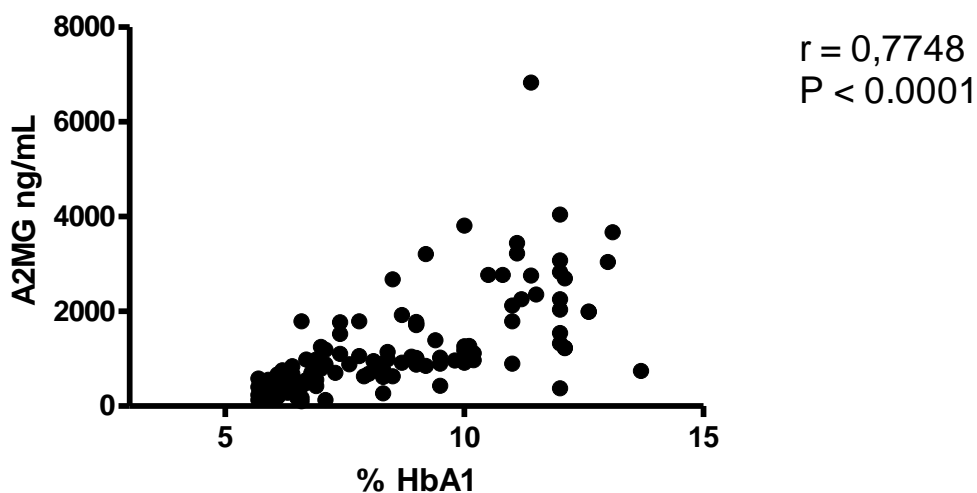
### **8.3 Asociación entre A2MG y HbA1 en sujetos con DM2**

Con el objetivo de determinar la asociación entre A2MG detectada en saliva en sujetos con DM2 y los valores de HbA1, analizamos primeramente, sujetos que tenían valores de HbA1 mayores y menores a 7%. Luego, fueron comparados los promedios de la concentración de A2MG entre ambos grupos. Tal como se observa en la figura 3, sujetos con HbA1 > 7% tenían mayor concentración de A2MG en saliva en comparación con los que tenían HbA1 < 7%. Se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar el promedio de la concentración de A2MG entre ambos grupos ( $p < 0,05$ ). El promedio de la concentración para sujetos con HbA1 < 7% fue de 519,2 ng/mL (ES 60,49) mientras que para los sujetos con HbA1 >7 % fue de 1377 ng/mL (ES 124,7).



**Figura 3. Niveles de A2MG en saliva de sujetos con DM2 compensada y no compensada.** Los niveles de Alfa 2 macroglobulina humana se determinaron utilizando un ensayo de ELISA. Las barras representan los niveles promedios +/- el error estándar de A2MG en muestras de saliva diluidas (1/10). Las diferencias significativas entre las distintas muestras de saliva están indicadas como \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

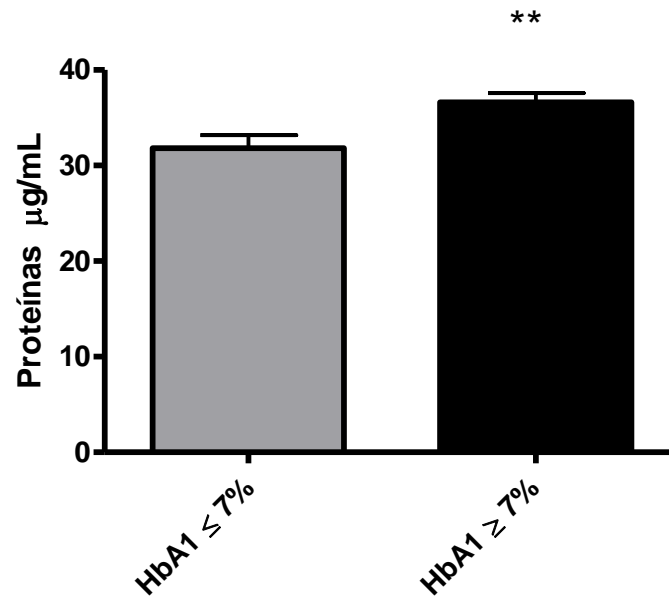
Con el objetivo de correlacionar los valores de las variables HbA1 y A2MG para la totalidad de la muestra, fueron primeramente expresados como promedios y desviación estándar. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. La figura 4 muestra una correlación positiva entre los valores obtenidos en A2M en saliva y HbA1.



**Figura 4. Correlación entre niveles A2MG y %HbA1 en sujetos con DM2.** Los niveles de Alfa 2 macroglobulina humana se determinaron utilizando un ensayo de ELISA y los porcentajes de HbA1c se determinaron mediante cromatografía por afinidad. Los niveles de A2MG y los porcentajes de HbA1c de cada individuo fueron correlacionados. Se observa asociación positiva entre ambas variables.

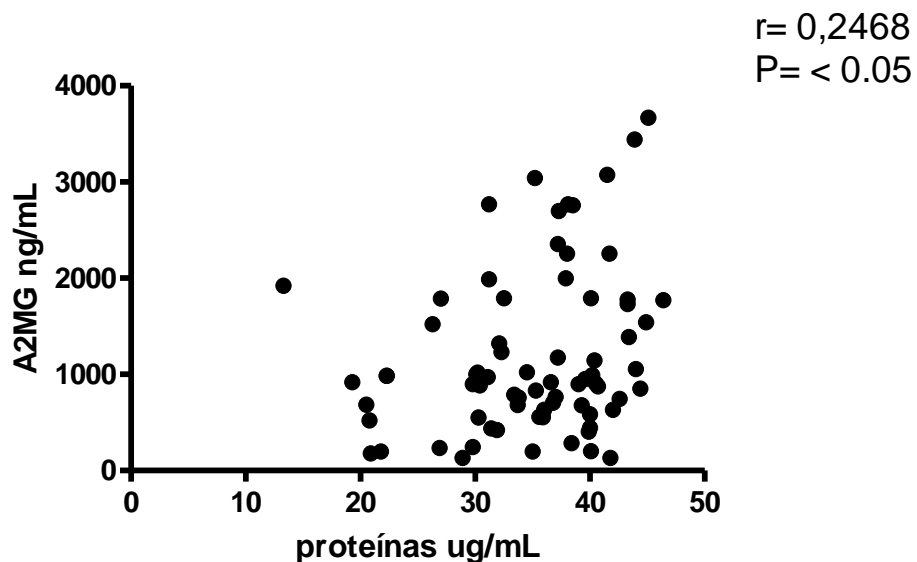
#### **8.4 Asociación entre A2M y concentración de proteínas en saliva en sujetos con DM2**

La concentración de proteínas de la saliva es bastante estable, siendo más significativa en la secreción parotídea. Además de mantener la osmolaridad y capacidad tampón, las proteínas salivales también participan en diversas funciones específicas. El número aproximado de las distintas proteínas salivales es de 100 a 140, donde aproximadamente el 30-40% son sintetizadas por las glándulas salivales, mientras que otras proteínas se originan a partir del trasudado del suero. Uno de los objetivos de este estudio fue establecer la asociación entre la concentración de la variable estudiada (A2MG) y características cuali y cuantitativas de la saliva. Fueron comparados los promedios de la concentración de proteínas en saliva entre los sujetos que tenían valores de HbA1c mayores y menores a 7%. Tal como se observa en la figura 5, sujetos con HbA1c > 7% tienen mayor concentración de proteínas (promedio 36,6 µg/mL y ES 1,376) en saliva en comparación con los que tienen HbA1c < 7% (promedio 31,82 µg/mL y ES 0,9687). Con el objetivo de asociar los valores de las variables A2MG y de proteínas en saliva en sujetos con DM2 para la totalidad de la muestra, fueron primeramente expresados como promedios y desviación estándar. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Se observó una asociación positiva entre Concentración de proteínas en saliva y A2MG. (figura 6)



**Figura 5. Concentración de proteínas en saliva de sujetos con DM2 compensada y no compensada.** Los niveles de proteínas se determinaron utilizando espectrofotometría. Las barras representan los niveles promedios +/- la error estándar de proteína en muestras de saliva. Las diferencias significativas entre las distintas muestras de saliva están indicadas como \*\* ( $p < 0.05$ ).

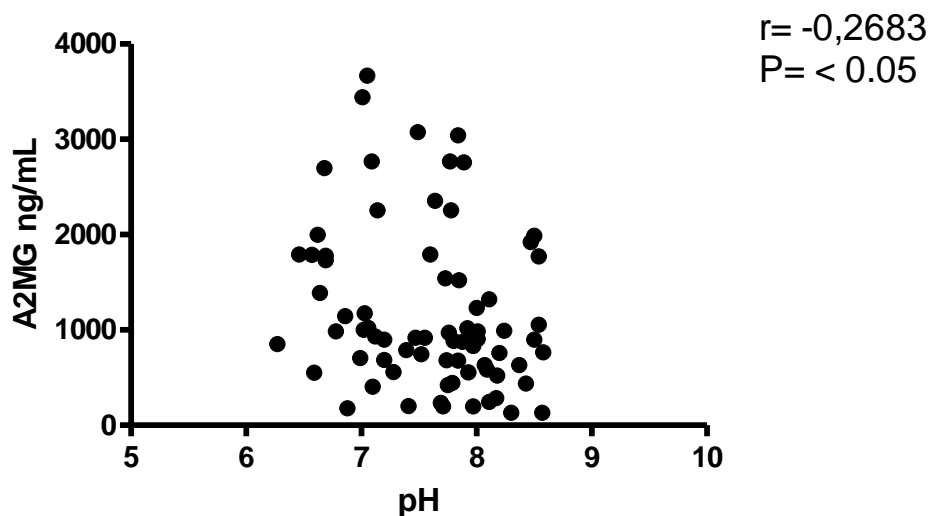




**Figura 6. Asociación entre la concentración de A2MG en saliva con la concentración de proteínas en saliva.** Los niveles de proteínas se determinaron utilizando espectrofotometría. Los niveles de A2MG y la concentración de proteínas en saliva de cada individuo fueron correlacionados. Se observa asociación positiva entre ambas variables.

### **8.5 Asociación entre A2MG y pH salival en sujetos con DM2**

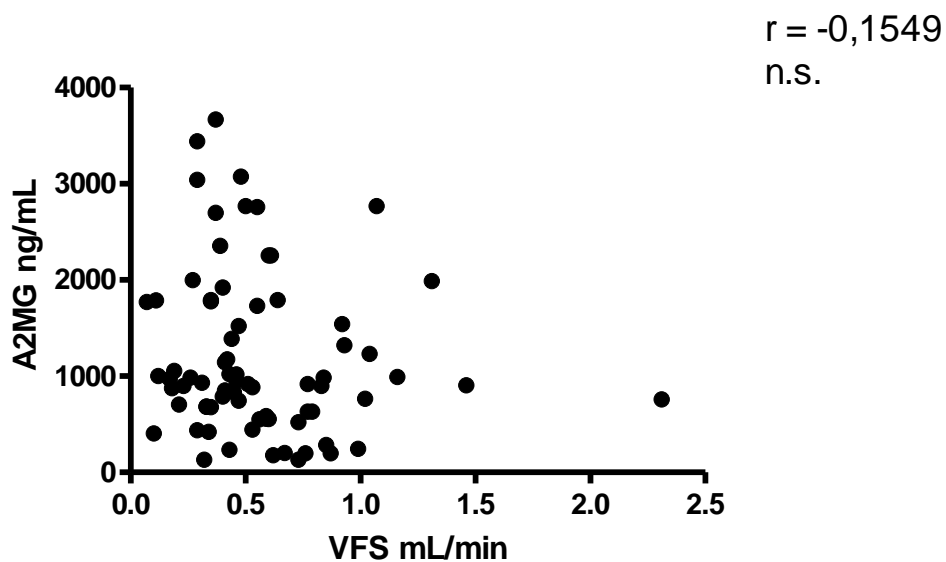
La literatura describe que A2MG es estable en un pH cercano a 7,65, similar al promedio que mostraron los sujetos de nuestro estudio (7,6 /DS 0,604). Mientras el grupo con valores de HbA1 <7% mostraron un promedio de pH salival de 7,6 (DS 0,6), el grupo descompensado presentó una media de 7,55 (DS 0,6) Hasta nuestro conocimiento, no existe evidencia que correlacione valores de pH con concentración de A2MG en saliva. Con el objetivo de asociar los valores de las variables A2MG en saliva y pH salival en sujetos con DM2 para la totalidad de la muestra, fueron primeramente expresados como promedios y desviación estándar. Se utilizó el test de Spearman. La figura 7 muestra una baja correlación negativa entre los valores obtenidos en A2M en saliva y concentración de proteínas en saliva.



**Figura 7. Asociación entre la concentración de A2MG en saliva y pH salival.** Para la medición del valor del pH de las muestras salivales se empleó un pH-metro digital cuya inmersión del electrodo en el tubo colector de saliva indicó los valores para pH salival. Los niveles de A2MG y pH en saliva de cada individuo fueron correlacionados. Se observa asociación inversa aunque baja entre ambas variables.

## **8.6 Asociación entre A2MG y VFS en sujetos con DM2**

Estudios indican que los sujetos con diabetes mellitus, experimentan un daño glandular que podría traducirse en menor producción de saliva. Sin embargo, no existe evidencia que correlacione la Velocidad de flujo salival con los valores de A2MG obtenidos en boca. Con el objetivo de asociar los valores de las variables A2MG en saliva y VFS en sujetos con DM2 para la totalidad de la muestra, fueron primeramente expresados como promedios y desviación estándar. Se utilizó el test de Spearman. La figura 8 muestra la ausencia de correlación entre las variables.



**Figura 8. Asociación entre la concentración de A2MG en saliva con VFS.** La saliva fue pesada por gravimetría asignando un peso específico de 1,005 g/mL al fluido y el volumen total determinado. Los resultados se expresaron en mililitros/minutos (mL/min). Los niveles de A2MG y VFS de cada individuo fueron correlacionados. No se observa asociación entre las variables

## 9. DISCUSION

Actualmente la combinación de biotecnologías emergentes ha ampliado el conocimiento de biomarcadores y existe suficiente evidencia que indica que la mayor parte de compuestos encontrados en la sangre están también el presente en saliva. Considerando que A2MG ha sido detectado en mayor concentración en la sangre y saliva de sujetos en estados pre diabéticos en comparación con sujetos sanos (26), el presente estudio buscó establecer una asociación entre grado de compensación metabólica medido con HbA1 en sujetos con DM2 y los valores de A2MG obtenido en la saliva de éstos.

La alta especificidad y sensibilidad de la técnica utilizada (ELISA tipo sándwich) otorga alta confiabilidad en términos de detectar la proteína en estudio. Según lo indicado por el fabricante del kit comercial de detección de A2MG, no existe reacción cruzada con proteínas de secuencias génicas muy similares y altamente conservadas tales como las proteínas naturales A2MG de ratón y componente C5a del complemento, así como con proteínas recombinantes humanas como CD109, LPR-1 (Cluster II/FC Chimera) y LPR-1 (Cluster IV/FC Chimera). Sin embargo, ya que la saliva está compuesta por una variedad de electrolitos, pequeñas sustancias orgánicas, proteínas, péptidos y polinucleótidos (13) que pudiesen interferir con la correcta detección de A2MG, realizamos un experimento

para determinar que la capacidad de detección del ensayo de ELISA utilizado, no es afectada por la presencia de otro componente presente en saliva. Se detectaron concentraciones de la proteína A2MG en ausencia o en presencia de saliva de sujetos con DM2 y controles sanos. Como se observa en la Figura 1, existe detección de A2MG en todas las condiciones estudiadas. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de detección cuando se agrega saliva de sujetos con DM2 y sanos respecto de la curva donde se utilizó solamente la proteína recombinante. Este resultado es indicativo no solo de que el kit utilizado detecta específicamente A2MG, sino que también, descarta la posibilidad de interferencia de otra proteína salival de diferente estructura o naturaleza.

Como la mayoría de las mediciones de A2MG han sido realizadas en sangre (31-34), con finalidad de ayudar a explicar y determinar el origen de esta proteína en saliva, realizamos un ensayo en 4 sujetos controles sanos una detección diferenciada de A2MG en glándula parótida, glándulas sublinguales y saliva total. Los resultados indican una mayor concentración de A2MG en la saliva total en comparación con la saliva parotídea y sublingual (Figura 2). Este resultado, nos permite suponer que la proteína A2MG podría originarse en glándulas salivales menores, así como en procesos inflamatorios en mucosas y desde el fluido crevicular. Con respecto a esto último, si bien se indica que el componente crevicular alcanza valores no superiores al 10% de la saliva total, un estudio ha descrito que la detección de A2MG en este fluido en enfermedad periodontal fue

significativamente mayor en pacientes con periodontitis agresiva en comparación con aquellos que presentaron periodontitis crónica (50). El autor sugiere que la mayor concentración crevicular de A2MG podría ser indicativa de la agresividad de la periodontitis. Además, Pederson (62) indica que es posible identificar en saliva total, mayor concentración de A2MG, A1-antitripsina y proteína C reactiva como indicadores de la progresión de la periodontitis. Por otro lado, Murakami et al, describe que A2MG tendría un rol protector a nivel plasmático inhibiendo una proteasa secretada por *Aeromonas sobria*, asociada con las gastroenteritis y las septicemias (63). Si A2MG eventualmente Inhibe fenómenos de virulencia de este microorganismo, podríamos sospechar que la elevada concentración de A2MG encontrada en fluido crevicular de sujetos con periodontitis avanzada descrita en el estudio de Ertugrul (50), recientemente mencionado, podría corresponder a una respuesta inmunológica ante la presencias de patógenos periodontales (63). Entonces, dado que DM2 ha sido asociada con una mayor severidad de enfermedad periodontal, podríamos suponer que los pacientes con mal control metabólico que evaluamos (con valores de HbA1 mayores a 7%), presentan cuadros de periodontitis más agresivos que podrían estar influyendo en los altos valores de A2MG detectados en ellos. Sin embargo, en nuestro estudio, si bien se realizó un examen bucal que detectó enfermedad periodontal en forma clínica en casi la totalidad de los sujetos en estudio, no fue posible determinar la severidad de la misma.



Si bien el fluido crevicular pudiese ser uno de los factores que expliquen la mayor detección de A2MG en sujetos con DM2, el porcentaje de proteínas aportado por éste componente en la saliva total, su composición es muy variable para considerarlo relevante en el momento de la detección de la concentración de A2MG en la saliva total (13). Además, Border M, estableció que en sujetos edéntulos con DM2 presentan alta concentración de biomarcadores en suero relacionados con procesos inflamatorios entre los que se encuentran A2MG en comparación con sujetos sanos (47). Este resultado es indicativo que la composición de la saliva no está condicionada solamente por el aporte de A2MG desde el fluido crevicular, considerando su ausencia en sujetos edéntulos. Además, se ha descrito que las glándulas salivales menores también poseen la capacidad de sintetizar proteínas entre las que podría considerarse A2MG (64). Este último factor podría incidir en la mayor concentración de este biomarcador detectado en saliva total en comparación con la detección en glándulas parotídea y sublingual que describimos.

Considerando que existe una alta correlación entre proteínas encontradas en saliva y en sangre (19) y que los estudios indican que A2MG se incrementa en la sangre de sujetos con DM1 y DM2 con complicaciones diabéticas tales como nefropatías, neuropatías, alteraciones cardíacas e hipertensión, en comparación con quienes no las presentan (48, 49), entonces resulta muy interesante buscar una asociación entre la presencia de A2MG en saliva de pacientes con DM2 y

marcadores que se relacionen con el estado de la enfermedad como es la HbA1c. Para aquello, en este estudio se determinaron los niveles de A2MG en saliva de individuos DM2 y se correlacionaron con los porcentajes de HbA1c determinadas en sangre.

Este estudio indica que existe una mayor concentración de A2MG en saliva de los individuos descompensados en comparación con los compensados metabólicamente (Figura 3). Además, en línea con estos resultados, se observó una asociación positiva entre los valores de HbA1 en sangre y A2MG en saliva en sujetos con DM2 (Figura 4). Los resultados del presente estudio son concordantes y complementan a los obtenidos por Takada *et al* (46) y por Sowmya *et al*, (52) quienes sugieren una asociación de A2MG detectada en sangre con los niveles de glicemia en el tiempo.

Debido a la alta correlación entre proteínas encontradas en saliva y en sangre (19), no es extraño pensar que podría existir un paso vía exocitosis de A2MG desde la sangre a la saliva en casos en que la concentración de esta proteína se encuentre elevada en el plasma. Estudios indican que A2MG se incrementa en la sangre de sujetos con DM1 y DM2 con complicaciones diabéticas en comparación con quienes no las presentan (48, 49). Wyatt *AR* (51), asoció una mayor concentración de A2MG con estados avanzados de otras enfermedades relacionadas con DM2 como es la insuficiencia renal crónica (IRC). Otros estudios describen que en el síndrome nefrótico también se observa una mayor

concentración de A2MG en suero, fenómeno que también sería explicado por el alto peso molecular de esta proteína y su consecutiva menor excreción (65). La DM2, en especial en sus estados más avanzados, se relaciona con IRC, así como también con el síndrome nefrótico. Respecto a la asociación de la DM2 con otras enfermedades como son las alteraciones cardiovasculares, Sowmya *et al* (52), inyectó A2MG en suero en ratas diabéticas observándose hipertrofia cardíaca lo que sería beneficioso para contrarrestar el daño del miocardio asociado a la diabetes. Este rol protector de la A2MG sería relevante considerando la estrecha relación entre DM2 y aumento del riesgo cardiovascular.

En el presente estudio, no detectamos una relación entre los niveles de A2MG en saliva con la presencia de complicaciones sistémicas asociadas con la progresión de la diabetes mellitus. Los sujetos con mayor grado de descompensación metabólica ( $HbA1c > 7\%$ ), en su mayoría, relataron no tener alteraciones renales ni cardíacas. Sin embargo, la mayor concentración de A2MG detectada en saliva de estos sujetos, podría ser indicativo de una progresión de la DM2 hacia otras alteraciones sistémicas aun no detectadas.

Los valores de A2MG salival detectado en sujetos DM2, podrían también estar condicionados con su dieta. Un estudio describe que la concentración de A2MG en la sangre, es variable según la alimentación de cada sujeto (66). La mayor concentración de glucosa que se podría encontrar en sujetos con diabetes,

implicaría un fenómeno de arrastre de proteínas desde la sangre a la saliva. Si bien, en el presente estudio no se consideró el tipo de dieta de cada sujeto, debemos mencionar que el índice de masa corporal en un 95 % de los participantes en este estudio fue mayor a 25 (Tabla I), lo que es considerado como sobrepeso u obesidad y podría asociarse no solo a una dieta desbalanceada y rica en carbohidratos, sino también, a un mayor grado de descompensación metabólica de la enfermedad lo que podría en definitiva, incidir en la composición salival.

Otro de los objetivos de este estudio fue determinar asociación entre la detección de A2MG en saliva de sujetos con DM2 y concentración de proteínas, pH, y VFS. Como se observa en la figura 5, los sujetos con DM2 presentaron mayor concentración de proteínas en saliva en comparación con los sujetos compensados metabólicamente, lo que está en línea con lo descrito por Banderas et al, que indica que el mayor grado de descompensación metabólica se relaciona con la mayor concentración de proteínas detectadas en saliva (16). Nuestros resultados indican la existencia de una asociación positiva entre la concentración de proteínas en saliva y la concentración de A2MG (figura 6). Sin embargo dado que el origen de las proteínas es diverso, la mayor concentración de proteínas detectada en saliva en sujetos con DM2 descompensada no se debería únicamente a la mayor concentración de A2MG detectada en nuestro estudio. Esto, podría explicarse con el fenómeno de la desintegración de la mucina, que es la estructura proteínica salival que permite el estado de permanente

humectación oral (18) y cuyas proteínas serían detectadas en la saliva total ya que al no conformar una estructura, quedarían libres. Este fenómeno se acentuaría en estados de descompensación metabólica. (67). Otra explicación a la mayor concentración de proteínas en saliva sería mayor aporte del fluido crevicular en estados inflamatorios locales como la periodontitis, fenómeno que ya fue discutido ampliamente.

La literatura describe que A2MG es estable en un pH cercano a 7,65, similar al promedio que mostraron los sujetos de nuestro estudio que promediaron 7,6 (DS 0,604) de pH salival (68). Hasta nuestro conocimiento, no existe evidencia que correlacione valores de pH con concentración de A2MG en saliva. Si bien nuestros resultados muestran una acidificación en la medida que mayores son los valores de HbA1 y correlacionan de manera negativa los valores de A2MG con los valores de pH (figura 7), la acidificación no afectarían en teoría al funcionamiento de A2MG ya que el grupo de sujetos con valores de HbA1 mayores a 7 %, mostraron una media de pH salival de 7,55 (DS 0,6) valores que no son suficientes para alterar el funcionamiento ni la estructura de A2MG. Otros estudios serían necesarios para establecer si el pH tiene incidencia en el funcionamiento de la glicoproteína en estudio.

Por otra parte, varios estudios (21, 22, 23,24) indican que los sujetos con diabetes mellitus, experimentan un daño glandular que podría traducirse en menor producción de saliva en comparación con los sujetos sanos. Sin embargo, en nuestro estudio la variable cantidad de saliva producida por minuto (VFS), no se asocio con la concentración en saliva de A2MG (figura 8), por lo que creemos que las características cualitativas más que las cuantitativas salivales, son las que se relacionan con la detección de A2MG detectada en este estudio.

Finalmente, nuestros hallazgos indican que existe una correlación positiva entre los niveles de A2MG detectados en saliva y el porcentaje de HbA1c, lo cual permite contar con los antecedentes para validar la técnica de detección de A2MG en saliva total para el monitoreo de control metabólico en la DM2, considerando que el método de recolección salival es poco invasivo y de eventual menor costo económico en comparación con la HbA1, actual gold estándar utilizado.

## **9. CONCLUSIONES**

- 9.1. Los valores de A2MG obtenida en saliva total y HbA1c obtenida en sangre se correlacionan positivamente.
- 9.2. Los valores de A2MG obtenida en saliva y concentración de proteínas en saliva se correlacionan positivamente.
- 9.3. Los valores de A2MG obtenida en saliva y pH se correlacionan en forma negativa e inversa.
- 9.4. Este trabajo otorga antecedentes para validar la técnica de detección de A2MG en saliva total para el monitoreo de control metabólico en la DM2.

## 10. REFERENCIAS

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014 Jan; 37 (1): 81-90.
2. Nomura K Cardiovascular event in elderly patients with diabetes mellitus *Nihon Rinsho*. 2013 Nov; 71(11):1954-9.
3. Villarroel R P, Parra L X, Ardiles A L. Frequency of chronic kidney disease among ambulatory patients with type 2 diabetes. *Rev Med Chile*. 2012 Mar; 140(3):287-94.
4. Pereira MA. Diet beverages and the risk of obesity, diabetes, and cardiovascular disease: a review of the evidence *Nutr Rev*. 2013 Jul;71(7):433-40
5. Kristensen T, Yderstræde K. Obesity and co-morbidities in type 2 diabetes: An opportunity to bend the Health Care Cost Curve. *Rev Clin Esp*. 2014 Apr;214(3):140-2
6. Cuevas A, Molina A, Rigotti A, Miquel JF, Marshall G, Reyes S, et al. Trends in obesity and diabetes prevalence in a Chilean urban population: 1993-2001. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008 Sep;6(3):219-22.
7. Weber MA, Bakris GL, Jamerson K, Weir M, Kjeldsen SE, Devereux RB, et al. Cardiovascular events during differing hypertension therapies in patients with diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jun 29;56(1):77-85.
8. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003 Dec;31 (1):3-23.
9. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM. Defining the relationship between plasma glucose and HbA (1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 2002;25 (2):275-8.



10. Randie R. Littlea and David B. Sacksb. HbA1c: how do we measure it and what does it mean? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009;16:113-8.
- 11 Gillett MJ. The International Expert Committee. International expert committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32(7):1-8. *Clin Biochem Rev.* 2009 Nov;30(4):197-200.
- 12.Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, Fanali C, Fiorita A, Cabras T, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2011 Dec;31(6):347-57.
- 13.Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001 Feb;85(2):162-9.
14. Smidt D, Torpet LA, Nauntofte B, Heegaard KM, Pedersen AM. Associations between labial and whole salivary flow rates, systemic diseases and medications in a sample of older people. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010 Oct;38(5):422-35.
- 15 Maier H, Bihl H. Effect of radioactive iodine therapy on parotid gland function. *Acta Otolaryngol.* 1987 May-Jun;103(5-6):318-24.
- 16.Banderas JA, Gonzalez M. Saliva y Cavidad Bucal: Parte II, Proteínas Salivales: Funciones Biológicas en el Mantenimiento de la Homeostasis Bucal. *Práctica Odontológica.* 1994;15(7):8.
17. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem.* 2003 Feb 14;278(7):5300-8.
18. Wilmarth PA, Riviere MA, Rustvold DL, Lauten JD, Madden TE, David LL. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *J Proteome Res.* 2004 Sep-Oct;3(5):1017-23.

19. Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Aug;11(5):449-55.
20. Bermejo-Pareja F, Antequera D, Vargas T, Molina JA, Carro E. Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. *BMC Neurol*. 2010 Nov 3;10 (1):108.
21. Brinkmann O, Kastratovic DA, Dimitrijevic MV, Konstantinovic VS, Jelovac DB, Antic J, et al. Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. *Oral Oncol*. 2011 Jan;47(1):51-5.
22. Baughan LW, Robertello FJ, Sarrett DC, Denny PA, Denny PC. Salivary mucin as related to oral *Streptococcus mutans* in elderly people. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Feb;15(1):10-4.
23. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997 Jan;24(1):72-7.
24. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Duff GW. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2000 Nov;27(11):810-8.
25. Valdez IH, Fox PC. Diagnosis and management of salivary dysfunction. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(3-4):271-7.
26. Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res*. 2009 Jan;8(1):239-45.
27. Rehman AA, Ahsan H, Khan FH.  $\alpha$ -2-Macroglobulin: a physiological guardian. *J Cell Physiol*. 2013 Aug; 228 (8) 1665-75.  $\alpha$ -2-Macroglobulin: a physiological guardian. *J Cell Physiol*. 2013 Aug;228(8):1665-75.

28 Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, Sojka D, Kopacek P. 2009. IrAM—An  $\alpha$ 2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: Characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *Dev Comp Immunol* 33: 489–498.

29 Lin YC, Vaseeharan B, Chen JC. 2008. Molecular cloning and phylogenetic analysis on  $\alpha$ 2-macroglobulin ( $\alpha$ 2-M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol* 32:317–329.

30 Kaur I, Katyal A. 2011. Modification of mouse A2MG B (620–792) and A2MG N (168–230) by malondialdehyde and acetaldehyde attenuates the proteinase and TGF- $\beta$ 1 binding ability of A2MGB. *FEBS Lett* 2011 Mar 23;585(6):829-33.

31 Sheikh AM, Chauhan V, Tsiouris JA, Mehta PD, Burgess K, Fenko MD, Spivack W, Vaughan M, Malik M. 2003. Elevated levels of serum  $\alpha$ 2 macroglobulin in wild black bears during hibernation. *Biochimie* 85:1027–1032.

32 Fredslund F, Jenner L, Husted LB, Nyborg J, Andersen GR, Sottrup-Jensen L. 2006. The structure of bovine complement component 3 reveals the basis for thioester function. *J Mol Biol* 361:115–127.

33 Marrero A, Duquerroy S, Trapani S, Goulas T, Guevara T, Andersen GR, Navaza J, Sottrup-Jensen L, Gomis-Ruth FX. 2012. The crystal structure of human  $\alpha$ 2-Macroglobulin reveals a unique molecular cage. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012 Apr 2; 51(14):3340-4

34 Raymond WW, Su S, Makarova A, Wilson TM, Carter MC, Metcalfe DD, Caughey GH. 2009.  $\alpha$ 2-Macroglobulin capture allows detection of mast cell chymase in serum and creates a reservoir of angiotensin II-generating activity. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5770-7

35 Roy CN. 2012. The anemia of inflammation and chronic disease. *J Nutr* 2012;142(11):1929-1934

36 Wyatt AR, Constantinescu P, Ecroyd H, Dobson CM, Wilson MR, Kumita JR, Yerbury JJ. Protease-activated  $\alpha$ 2-macroglobulin can inhibit amyloid formation via two distinct mechanisms. *FEBS Lett*. 2013 Mar 1;587(5):398-403..

37 Panyutich A, Gunz T. 1991. Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:101–106.

38 Gunnarsson M, Jensen PEH. 1998. Binding of soluble myelin basic protein to various conformational forms of  $\alpha$ 2-Macroglobulin. *Arch Biochem Biophys* 359:192–198.

39 Pongpaew P, Boonyakarnkul N, Schelp F-P, Changbumrung S, Supawan V, Tawprasert S, Migasena P. 1994. Serum concentrations of alpha-2-macroglobulin and other serum proteinase inhibitors in Thai vegetarians and omnivores. *Nutr Res* 14:337–345.

40 Hocheplied T, Lenven FV, Libert C. 2002. Mice lacking alpha2-macroglobulin show an increased host defense against Gram-negative bacterial sepsis, but are more susceptible to endotoxic shock. *Eur Cytokine Network* 13:86–91.

41 Chen CH, Zhang XQ, Lo CW, Liu PF, Liu YT, Gallo RL, Hsieh MF, Schooley RT, Huang CM. The essentiality of alpha-2-macroglobulin in human salivary innate immunity against new H1N1 swine origin influenza A virus. *Proteomics*. 2010 Jun;10(12):2396-401.

42 Tenorio-Laranga J, Peltonen I, Keskitalo S, Duran-Torres G, Natarajan R, Männistö PT, Nurmi A, Vartiainen N, Airas L, Elovaara I, García-Horsman JA Alteration of prolyl oligopeptidase and activated  $\alpha$ -2-macroglobulin in multiple sclerosis subtypes and in the clinically isolated syndrome. *Biochem Pharmacol*. 2013 Jun 15;85(12):1783-94.

43. Kanoh Y, Ohtani H, Egawa S, Baba S, Akahoshi T. Clinicopathological characteristics of androgen-dependent advanced prostate cancer patients with  $\alpha$ 2-macroglobulin deficiency. *Int J Oncol*. 2012 Jul;41(1):39-45.

45 Aurer A, Stavljenić-Rukavina A, Aurer-Kozelj J. Markers of periodontal destruction in saliva of periodontitis patients. *Acta Med Croatica*. 2005;59(2):117-22.

46 Takada T, Kodera Y, Matsubara M, Kawashima Y, Maeda T, Fujita Y, Shichiri M. Serum monomeric  $\alpha$ 2-macroglobulin as a clinical biomarker in diabetes. *Atherosclerosis*. 2013. May; 228(1):270-6.

47 Border MB, Schwartz S, Carlson J, Dibble CF, Kohlfarber H, Offenbacher S, Buse JB, Bencharit S. Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes. *Mol Biosyst*. 2012 Apr;8(4):1304-10.

48 Subbiah R, Chengat V, Clifton JD, Rathinavel A, Bidulescu A, Tharmarajan R, Selvam GS. Cardiac isoform of alpha 2 macroglobulin and its reliability as a cardiac marker in HIV patients. *Heart Lung Circ*. 2010 Feb;19(2):93-5.

49. Turecký L, Kupcová V, Szántová M. Alpha 2-macroglobulin in the blood of patients with diabetes mellitus. *Bratisl Lek Listy*. 1999 Jan;100(1):25-7.

50 Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, Bozoglan A. Evaluation of beta-2 microglobulin and alpha-2 macroglobulin levels in patients with different periodontal diseases. *Aust Dent J*. 2013 Jun;58(2):170-5.

51 Wyatt AR, Constantinescu P, Ecroyd H, Dobson CM, Wilson MR, Kumita JR, Yerbury JJ. Protease-activated alpha-2-macroglobulin can inhibit amyloid formation via two distinct mechanisms. *FEBS Lett*. 2013 Mar 1;587(5):398-403.

52 Sowmya et al., 2011-Apr Role of cardiac isoform of alpha-2 macroglobulin in diabetic myocardium., *Mol Cell Biochem* 2011; Apr. 350(1-2):229-35

53.. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Salud Pública. Resolución Exenta N°1052 del 16.12.2005

54. De Roy PG. Helsinki and the declaration of Helsinki. *World Med J* 2004; 50(1): 9-11

55. M. Navazesh, R.A. Mulligan, V. Kipnis, P.A. Denny and P.C. Denny. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy caucasian young and aged adults *J Dent Res* 1992;71(6):1275-8

56. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 694: 72-77
57. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160–3167
58. Ragnar Hanas 2010 Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1C Measurement. *Diabetes Care*. 2010 August; 33(8): 1903–1904.
59. Laemmli UK, Mölbert E, Showe M, Kellenberger E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol*. 1970 Apr 14;49(1):99-113.
60. Kitasako Y<sup>1</sup>, Burrow MF, Stacey M, Huq L, Reynolds EC, Tagami J. Comparative analysis of three commercial saliva testing kits with a standard saliva buffering test. *Aust Dent J*. 2008 Jun;53(2):140-4.
61. Morales I, Domínguez P, López RO. Devices for saliva collection from the major salivary glands. Results in normal subjects. *Rev Med Chile*. 1998 May;126(5):538-47.
62. Pederson ED<sup>1</sup>, Stanke SR, Whitener SJ, Sebastiani PT, Lamberts BL, Turner DW. Salivary levels of alpha 2-macroglobulin, alpha 1-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. *Arch Oral Biol*. 1995 Dec;40(12):1151-5
63. Murakami Y, Wada Y, *et al.* (2012). Inhibition of *Aeromonas sobria* serine protease (ASP) by  $\alpha$ 2-macroglobulin. *Biol. Chem.* 393 (10): 1193-200.
64. Gutierrez A, Cerón JJ, Fuentes-Rubio M, Tecles F, Beeley JA<sup>1</sup>. A Proteomic Approach To Porcine Saliva. *Curr Protein Pept Sci*. 2014 Feb;15(1):56-63.
65. Durán Álvarez Sandalio. Complicaciones agudas del síndrome nefrótico. *Rev Cubana Pediatr* 1999;71(4):245-53

66. Praneet Pongpaew, Narumol Boonyakarnkul, Frank-P. Schelp, Supranee Changbumrung, Venus Supawan, Somsak Tawprasert, Panata Migasena. Serum concentrations of alpha-2-macroglobulin and other serum proteinase inhibitors in Thai vegetarians and omnivores. *Nutr Neurosci.* 2006 Feb-Apr;9(1-2):93-8
67. Ryan, M E, Carnu O, Kamer A. The influence of diabetes on the periodontal tissues *J Am Dent Assoc*, 2003;134: 34-40.
68. Howel, James B., Beck, Thomas, Bates, Bruce, Hunter, Margaret J. Interaction of [alpha] 2-macroglobulin with trypsin, chymotrypsin, plasmin, and papain. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 221(1): 261-270.