

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO CIENCIAS FÍSICAS Y QUÍMICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA**

**“ALTERACIONES MOLECULARES DE LA SALIVA DE PACIENTES
AFECTADOS POR PAROTIDITIS CRÓNICA RECURRENTE INFANTIL Y SU
CORRELACIÓN CON EL COMPROMISO GLANDULAR”**

JIMENA PAZ TORRES CHOMON

**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**

**Santiago – Chile
2005**

*Dedico este trabajo a mi familia
por su apoyo constante durante
estos seis años de estudio, y a mis
amigos.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en forma general a todas las personas que participaron en mi formación profesional; compañeros, profesores, ayudantes, auxiliares, etc.

También quiero agradecer de manera particular, a mi tutora principal Dra. Irene Morales Bozo, por su acogida desde la primera instancia en el desarrollo de ésta tesis, por su paciencia, por darme su confianza, por compartir su tiempo conmigo, por su gran dedicación, por su alegría, y finalmente por enseñarme con mucho cariño todo lo que significa realizar un correcto trabajo de investigación.

A la Dra. Blanca Urzúa Orellana, tutora asociada, por su disposición, acogida, alegría, cariño y simpatía.

A la Dra. Mirtha Landaeta Martínez, tutora asociada, por su participación en todo lo relacionado con los pacientes y controles el Hospital San Juan de Dios.

Al Dr. Rubén León Berríos, por su gran acogida, disposición, paciencia, cariño y amistad, durante el proceso de realización de mi trabajo.

A Alvaro Pinochet, por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio.

A Raúl Montalbán, por su gran aporte con la toma de muestras.

A Cecilia Coccola, por compartir en el laboratorio y su amistad.

INDICE

INTRODUCCIÓN _____	1
MARCO TEÓRICO _____	4
HIPÓTESIS _____	19
OBJETIVO GENERAL _____	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	19
MATERIALES Y MÉTODOS _____	21
RESULTADOS _____	27
DISCUSIÓN _____	47
CONCLUSIONES _____	56
SUGERENCIAS _____	57
RESUMEN _____	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	61

INTRODUCCIÓN

La Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI) es una enfermedad de etiología desconocida, que se caracteriza por la inflamación recurrente de una o ambas glándulas parótidas. Afecta generalmente a niños desde la infancia temprana hasta la adolescencia, momento en el que tiende a remitir sin causa aparente. La inflamación de la glándula se manifiesta como un aumento de volumen doloroso que puede durar días, semanas o meses. Las recurrencias se presentan en forma imprevista y sin una frecuencia determinada, comprometiendo la calidad de vida del paciente (1).

Puesto que se desconoce el mecanismo etiopatogénico de esta enfermedad su tratamiento es controversial, el que puede variar desde una estimulación física de la glándula, hasta la extirpación de la misma (1).

El diagnóstico es clínico y se confirma mediante sialografía. Este examen complementario, se utiliza también para el seguimiento clínico de la enfermedad y a pesar de su relativa invasividad, es el método que se utiliza con más frecuencia (1, 2, 10). No es posible realizar un análisis directo del tejido glandular, debido a que la biopsia parotídea se encuentra restringida a casos extremos, dada la proximidad anatómica con el nervio facial. Otros medios de

análisis imagenológicos no constituyen exámenes de rutina y son de alto costo.

Por estas razones, el análisis molecular del producto de secreción glandular: la saliva, adquiere especial relevancia en esta patología dada la poca invasividad del método. La utilización de la saliva como un fluido diagnóstico de enfermedades bucales o sistémicas es un área de activa investigación y queda demostrada en patologías como el Síndrome de Sjögren e irradiación terapéutica del territorio máxilo-facial, entre otras (52, 53, 56, 57, 58).

Sin embargo, se conoce poco acerca de la calidad de la saliva de los pacientes con PCRI. El enfoque de la sialoquímica aplicada al estudio de la PCRI se ha basado en la determinación de los niveles de algunas proteínas particulares, especialmente aquellas que tienen relación con procesos inflamatorios. Aunque la información lograda por esta aproximación experimental ha permitido describir cambios salivales asociados a la alteración glandular, no ha hecho posible generar una visión global del mecanismo etiopatogénico de esta enfermedad. En el presente trabajo, se propone realizar un análisis molecular de la saliva en una población afectada con PCRI y una población de individuos clínicamente sanos. Adicionalmente, se propone correlacionar las posibles alteraciones salivales de los pacientes con PCRI, con el compromiso clínico y sialográfico de la enfermedad. Un análisis de esta naturaleza, permitiría determinar si es posible detectar en la saliva de estos

pacientes, moléculas involucradas en fenómenos destructivos de la glándula que permitiesen obtener información sobre la etiopatogenia de esta enfermedad.

MARCO TEÓRICO

Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI):

La PCRI se define como una inflamación parotídea, generalmente asociada a una sialectasia no obstructiva glandular. Se caracteriza por episodios recurrentes de aumento de volumen inflamatorio de una o ambas glándulas parótidas, acompañados ocasionalmente de fiebre y malestar general. Estos episodios se alternan con intervalos de remisión de semanas o meses, en los que la glándula se observa clínicamente asintomática (1,2). El primer episodio puede presentarse entre los 3 meses y los 13 años de edad; aunque, la enfermedad se inicia con mayor frecuencia entre los 2 y los 6 años. El número de recurrencias es variable en cada individuo, siendo el patrón más frecuente el de una recurrencia cada 3 o 4 meses. La frecuencia de recurrencias es más alta alrededor del primer año de escolaridad, para luego disminuir y mantenerse con un comportamiento impredecible en cada sujeto hasta la adolescencia. El cuadro clínico se acompaña de un compromiso del estado general en grado variable, con predominio de síndrome febril moderado. Aunque, en algunos casos el compromiso del estado general obliga a la hospitalización del paciente, con tiempo de estadía de alrededor de una semana (4). Los episodios de aumento de volumen se asocian a patología

respiratoria como resfrío, amigdalitis, neumonitis y bronquitis (3,4). Esta patología afecta a individuos de ambos géneros en una proporción relativamente similar. Se manifiesta preferentemente en forma unilateral y cuando se presenta en ambas glándulas parótidas, afecta en forma predominante a una de ellas. El aumento de volumen parotídeo es marcadamente doloroso y la piel de la zona puede presentarse enrojecida. En la glándula comprometida se produce una evidente disminución del flujo salival, la secreción se observa viscosa y con acumulo de material de aspecto mucoso-purulento y de color blanquecino (1, 2,4). El aumento de volumen inflamatorio puede tener una duración de 24 a 48 horas, 1 a 2 semanas y, en algunos casos meses. Luego de este período, con un aparente retorno a la normalidad, la glándula permanece en estado quiescente hasta un nuevo episodio inflamatorio. Después de la pubertad, los síntomas disminuyen pudiendo desaparecer completamente sin causa aparente, aunque en algunos casos la enfermedad puede persistir en el individuo adulto (1, 2, 4, 9).

Se desconocen los agentes etiológicos de la PCRI. Entre los factores asociados propuestos como causales se describen: malformaciones ductales congénitas, factores genéticos, alergias, manifestaciones locales de enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, etc. (1, 2, 64, 65). Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha podido ser demostrada y, hasta la

fecha, la etiopatogenia de esta enfermedad sigue siendo desconocida.

En un intento por dilucidar la causa de este cuadro clínico, se han realizado estudios microbiológicos de la secreción parotídea. Un estudio sobre la presencia de virus en la saliva parotídea de individuos portadores de esta enfermedad, excluiría a los principales virus respiratorios y al virus parotiditis como posibles agentes causales de ella (3). En estudios bacteriológicos, Concheiro y cols., reportan la presencia de una flora mixta de cocos Gram positivos (9). El estudio de Giglio y cols., revela el hallazgo de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus viridans* y/o *Moraxella catarrhalis* en el 80% de los casos estudiados (11). Estos resultados, sin duda, permiten comprender mejor el proceso patológico. Sin embargo, el hecho de que el proceso glandular sea principalmente de tipo inflamatorio, que el compromiso del estado general sea usualmente moderado, la existencia de la modalidad unilateral en pacientes portadores de la flora bacteriana descrita asociada a este cuadro y el que haya un número de casos en que los cultivos bacterianos resultan negativos, impiden aseverar que el origen de esta enfermedad sea de tipo infeccioso.

Diagnóstico de PCRI:

El diagnóstico de PCRI se basa en la historia clínica y se confirma con sialografía. 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 (1, 10). Estas imágenes serían el reflejo del estado inflamatorio en el que se encuentra el tejido glandular. El análisis histopatológico del tejido glandular extirpado a pacientes con PCRI, ha permitido observar un infiltrado linfocitario, con tendencia a formar folículos linfoides alrededor de ductos interlobulares dilatados (sialectasia). El epitelio ductal muestra hiperplasia y metaplasia con un patrón pseudoestratificado cilíndrico (1,5, 8).

Se postula que la sialografía no sólo permitiría confirmar el diagnóstico sino también seguir la evolución del estado glandular (10). Sin embargo, estudios experimentales indicarían que esta situación no siempre resulta consistente. Así, se debe tener presente que la PCRI puede ocurrir en ausencia de una imagen sialográfica de sialectasia (1,9). Adicionalmente, se debe considerar que los cambios sialográficos son usualmente bilaterales

aunque la inflamación sea unilateral, no existiendo una explicación para este hecho (1,2, 6,9). Esta última evidencia permitiría suponer la existencia de una alteración glandular subclínica. En el último periodo se ha utilizado la ultrasonografía como apoyo al diagnóstico, el que sería de utilidad por ser un método no invasivo. Estas imágenes muestran un aumento de volumen parotídeo difuso, con disminución en la ecogenicidad de la glándula y múltiples imágenes nodulares hipoecogénicas en el parénquima, que probablemente representarían sialectasias e infiltración linfocitaria (1, 6). La mayoría de los reportes clínicos sobre el diagnóstico mediante ultrasonografía establecen una correlación con la imagen sialográfica. (5, 6, 9). Se ha informado de casos en los que la sialografía no es compatible con el diagnóstico, mas la ultrasonografía muestra compromiso glandular bilateral (13). En otros reportes se señala que la ultrasonografía sería más sensible en la detección del compromiso glandular, tanto para el diagnóstico como en el seguimiento de la enfermedad (8). Aunque estos estudios sugieren que la ultrasonografía tendría una mayor sensibilidad y especificidad, la escasez de equipamiento y personal entrenado para la ejecución de este examen diagnóstico dificulta su utilización en la práctica diaria.

Tratamiento de PCRI:

Puesto que la etiología de PCRI sigue siendo un misterio y dado que el curso clínico de la enfermedad es de naturaleza variada, no existe consenso en relación a su manejo terapéutico. Al analizar la literatura especializada, se observa que los pacientes son atendidos por distintos especialistas, que indican variadas terapias para el manejo de una misma entidad patológica. Entre los tratamientos propuestos se encuentran:

1) Incrementar el flujo salival mediante maniobras físicas como: calor local, masajes glandulares, masticación de chicles, consumo de caramelos acidulados (5, 6). En general, estas maniobras se indican especialmente para la prevención de las recurrencias, aunque la inflamación de la glándula es súbita y el aumento de volumen se produce en unas pocas horas.

2) En otros reportes se indica que los episodios de recurrencias son tratados con antiinflamatorios no esteroideos (7, 6), los que pueden ser combinados con sialogogos, antihistamínicos, lisozima y antibióticos (9).

3) 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 del bromhexina en dosis de 4 mg cada 8 horas para el tratamiento de la fase de recurrencia de esta patología (7).

4) Basados en la observación de que en un número importante de pacientes se produce la desaparición de los síntomas con la sialografía y con la hipótesis de que el medio de contraste tendría un efecto antiséptico, en el Servicio Máxilo Facial Infantil del Hospital San Juan de Dios se propone un esquema terapéutico consistente en lavados intraglandulares periódicos vía conducto excretor parotídeo con un antiséptico yodado. El tratamiento se extiende por el tiempo necesario para que la glándula presente una imagen sialográfica compatible con normalidad. En casos de compromiso del estado general importante, el tratamiento se combina con un esquema antibiótico de amoxicilina (4).

5) Otro estudio propugna el tratamiento de la fase activa por medio de la inspección del conducto de Stenon con un sialendoscopio para realizar un lavado glandular con solución salina bajo anestesia general. Una vez lavado el conducto, se inyecta en la glándula, 100 mg de hidrocortisona. Estas maniobras se complementan con una terapia antibiótica de amoxicilina-ácido clavulánico intravenosa (13).

6) En algunos casos con daño glandular severo e irreversible como resultado de episodios agudos de larga duración, se postula como medida terapéutica la ligazón del conducto excretor para lograr la atrofia glandular (2, 5).

7) Como último recurso y sólo en casos severos, en los que las demás

medidas terapéuticas son inútiles, se realiza la parotidectomía parcial o total con la complejidad que implica este procedimiento dada la proximidad con el nervio facial (2,5). Es posible encontrar en la literatura casos extremos en los que se ha realizado la parotidectomía bilateral en niños de 11 años de edad (12).

A pesar de que el proceso patológico en la PCRI es de carácter eminentemente inflamatorio, como lo indica la histopatología, en la mayoría de los reportes se indica que los esquemas terapéuticos se combinan con antibioterapia. Los agentes antimicrobianos más frecuentemente utilizados son: amoxicilina, amoxicilina combinado con ácido clavulánico vía oral o sistémica y cefalosporinas de primera generación (1,4, 5, 6,9). Claramente, esta terapia se indica para disminuir el compromiso del estado general y evitar un compromiso mayor del paciente. Sin embargo, no se puede negar el riesgo de generar resistencia microbiana, por el uso recurrente de estos fármacos para tratar una enfermedad en la que no se tienen evidencias certeras acerca de su origen bacteriano. Situación que se ve agravada por el hecho de que, en algunos estudios se indica penicilina o cloramfenicol en forma tópica, para el lavado de la glándula en los períodos de agudización.

Frente a tan amplio espectro de esquemas terapéuticos, no existe un consenso acerca de cómo tratar esta enfermedad. A pesar de que la mayoría

de los estudios reporta un porcentaje de éxito variable, con ninguno de los tratamientos propuestos, ha sido posible evitar o prevenir totalmente las recurrencias de esta enfermedad. La tendencia general propendería a que, el tratamiento se enfoque principalmente 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, 6,7).

Evidencias de alteraciones en la composición salival en pacientes con PCRI:

En la mayoría de los estudios se describe que, a pesar de la fiebre y el malestar general, la presencia de pus emanada por el conducto de Stenon es poco frecuente y de existir se produciría por un corto tiempo y en poca cantidad (1, 2, 5,9). Los autores también concuerdan en la descripción de cambios cualitativos de la saliva parotídea en el período de actividad, que se acompañan de una disminución del flujo salival (1, 2, 3, 5). Algunos autores describen a la saliva parotídea como un material mucopurulento (1), otros como una secreción viscosa, lechosa y con acumulo de material semisólido entre mezclado (2). Otros, diferencian entre una saliva mucosa, purulenta y globosa (4) y otros la describen como una saliva turbia o purulenta (6). Se

relata también que con la desaparición de la inflamación transitoria de la glándula, la saliva se vuelve clara y libre del material extraño, pero pareciera ser producida en menor cantidad que en el lado no afectado (2). La denominación de mucopus al componente particulado presente en la saliva parotídea de estos pacientes es confundente, puesto que se trata de un material de consistencia distinta a la apariencia de pus. El color blanquecino de este material, es probablemente el causante de que sea confundido con secreción purulenta y tienda a inducir a la necesidad de una antibioterapia. El término pus sugiere infección, cuando en realidad la glándula está involucrada en un proceso inflamatorio no infeccioso (2, 8). Independientemente de cual sea la naturaleza del material extraño observable en la saliva de estos individuos, es evidente que en la PCRI la calidad de la saliva parotídea se encuentra alterada.

Es posible encontrar en la literatura algunos reportes que abordan el estudio de los cambios cualitativos de la saliva en la PCRI. En 1978, Tabak y cols., publican un estudio de sialoquímica realizado en un caso de PCRI. En éste, se analiza la saliva de ambas glándulas parótidas del paciente. Se determina la concentración salival de albúmina, lactoferrina, IgA, IgG e IgM en los días 1, 5, 7, 11, 22 y 79 desde la agudización. Los resultados indican que, en el primer día, existía un aumento significativo de todos los parámetros

analizados en la glándula enferma al compararla con la normal. A partir de ese momento, se producía una disminución paulatina en la concentración de las proteínas analizadas, hasta llegar a igualar los niveles de la glándula sana. Este trabajo constituye el primer reporte de alteraciones en la calidad proteica de la saliva de pacientes con PCRI. Tiene el valor de establecer una correlación directa, entre los niveles de proteínas secretadas en la saliva de la glándula enferma con el comportamiento clínico de este órgano. Pero, tiene la limitación de ser un estudio realizado en 1 individuo, lo que disminuye su validez externa (14).

En 1996, Ericson y Sjoback analizan la saliva parotídea de 17 niños con PCRI y de 17 controles sanos. Sus resultados indican que existiría gran variación interindividual en todas las variables analizadas, particularmente en la saliva de la glándula enferma. Reporta un aumento significativo del nivel salival de albúmina, IgA, lactoferrina y calicreina, al compararlo con el nivel encontrado en los individuos controles. Describe también que el nivel de amilasa y la concentración de proteínas totales son similares a las del grupo control. Este trabajo es el primer estudio en que se evalúa la calidad de la saliva parotídea en un grupo de pacientes con PCRI en etapa de recuperación (15).

Los estudios en que se analizan los cambios proteicos salivales en la

PCRi, indicarían la presencia de componentes inflamatorios asociados a la etapa aguda de la enfermedad. Sin embargo no existen estudios en los que se analice la presencia salival de moléculas relacionadas con la destrucción del tejido glandular. La búsqueda de marcadores de destrucción tisular, en el fluido secretado por la glándula parótida, pudiese ser un método de visualización molecular a distancia del proceso patológico que la afecta.

Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs):

Numerosos estudios involucran a las MMPs o matrixinas, como una de las principales moléculas relacionadas con la degradación y/o remodelación de los componentes de la matriz extracelular (16, 17, 18, 19, 20,21)

Las MMPs constituyen una familia de endopeptidasas metal-dependiente descritas en 1962, para la cual se han identificado a la fecha, al menos 23 miembros. Esta familia se clasifica en cinco clases principales: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, MMPs de membrana y un grupo heterogéneo de MMPs. Ellas comparten características funcionales y se diferencian en la especificidad por el sustrato y origen celular. Dentro de las características comunes para las MMPs se describe: el ser secretadas como una proforma inactiva o latente; el que requieren un pH neutro para poder actuar y el incluir en su estructura un dominio propéptido, un dominio catalítico y un dominio

hemopexina. (21,22) El dominio catalítico se caracteriza por la presencia de dos átomos de zinc en el sitio activo de la molécula y un residuo de cisteína esencial para el mantenimiento de la latencia enzimática. La activación se produce al interrumpirse la interacción entre este residuo aminoacídico con el átomo de zinc en el sitio activo enzimático. Este fenómeno ocurre en el espacio extracelular donde las MMPs activadas, reconocen y se unen a la matriz extracelular (MEC) (22, 23, 24).

Los principales sustratos de las colagenasas son el colágeno tipo I, II y III. Las gelatinasas hidrolizan principalmente componentes de la lámina basal como gelatina y colágeno tipo IV. Las estromelinas degradan elastina y colágenos tipo IV, V, X y XI. Las MMPs de membrana no se agrupan de acuerdo al sustrato hidrolizado, sino por su ubicación celular (18,25).

Las MMPs están ampliamente distribuidas en el organismo, donde desempeñan una serie de funciones fisiológicas como la cicatrización, la reabsorción ósea, la involución mamaria procesos fisiológicos asociadas al embarazo y al parto, migración de células inflamatorias, angiogénesis, etc. (26, 27, 28, 29, 29, 30, 32). Todos estos procesos son dependientes de la actividad controlada de estas enzimas extracelulares, las que en términos generales son reguladas por 3 mecanismos: 1) regulación de la transcripción; 2) activación de la MMP latente y 3) por sus inhibidores naturales: los Inhibidores Tisulares de

Metaloproteinasas (TIMPs). La desregulación en cualquiera de ellos, puede dar origen a procesos patológicos como: metástasis, desórdenes autoinmunes, ulceraciones tisulares, etc. (17, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39).

Algunas variedades de MMPs han sido descritas en la saliva total y en la placa dental (40, 41, 42). Las MMPs reportadas en estos estudios corresponden a la subfamilia gelatinasas, la que está compuesta por MMP-2 o gelatinasa A y MMP-9 o gelatinasa B, de 72 y 92 kDa, respectivamente (17). En estas enzimas, un dominio de unión a gelatina adicional se inserta en el dominio catalítico, situación que permite su identificación en zimogramas preparados con este sustrato.

Inicialmente, se pensaba que las MMPs de la saliva total se originaban en el fluido crevicular (40, 41, 42). Sin embargo, estudios recientes indican que se encuentran también en la saliva parotídea en condiciones de normalidad. Al respecto, existen reportes sobre la presencia de bajos niveles de MMP-2 y escasos o indetectables niveles de MMP-9 en la saliva parotídea de sujetos normales, quienes exhibían un patrón de actividad gelatinolítica similar.

Los estudios en los que se evalúa la presencia de MMPs en salivas glandulares, han sido realizados sólo en saliva parotídea (43, 44, 53). No existen reportes sobre la presencia de estas enzimas en la saliva submandibular/sublingual.

En general los informes sobre la presencia de MMPs en cualquier tipo de saliva en condiciones de normalidad, se han realizado en un número escaso de individuos controles sanos (43, 44). Así, se desconoce si existe variabilidad interindividual en la cantidad y tipo de MMPs salivales en poblaciones sanas.

Numerosos estudios describen alteraciones en la actividad gelatinolítica salival relacionadas con la presencia de patologías locales y sistémicas como: Diabetes, Síndrome de Down, VIH, Enfermedad periodontal y Caries (45, 46, 47, 48, 49, 50, 51).

De particular interés para nuestro estudio, resulta el hallazgo de niveles alterados de actividad gelatinolítica salival en patologías que afectan a las glándulas salivales como el Síndrome de Sjögren y en pacientes que han recibido irradiación terapéutica de cabeza y cuello (52, 53, 54, 55, 56). A la fecha, no existen estudios que evidencien la presencia de estas enzimas en la saliva de pacientes con PCRI.

HIPÓTESIS

Los pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil presentan alteraciones en parámetros moleculares de la saliva, que se correlacionan con el compromiso clínico y sialográfico de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Analizar parámetros moleculares en la saliva de pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil y correlacionarlos con el compromiso clínico y sialográfico de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar la concentración de proteínas de la saliva parotídea, submandibular/sublingual y total de sujetos controles sanos y de sujetos que presentan PCRI.
- b. Determinar el patrón de actividad metaloproteínasa MMP-2 y MMP-9 de la saliva parotídea, submandibular/sublingual y total, de sujetos controles sanos y de sujetos que presentan PCRI.

- c. Identificar alteraciones en la concentración de proteínas y en la actividad metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 en la saliva de sujetos que presentan PCRI.
- d. Clasificar a los pacientes con PCRI de acuerdo a la lateralidad de la afección clínica glandular.
- e. Determinar el compromiso sialográfico glandular en sujetos que presentan PCRI, mediante la clasificación del grado de anormalidad del árbol ductal observado en la sialografía.
- f. Correlacionar las alteraciones observadas en la concentración de proteínas y en el patrón de actividad metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 de la saliva de sujetos que presentan PCRI, con la lateralidad de la afección clínica y con el compromiso sialográfico de la glándula parótida.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Sujetos de Estudio.

a) Grupo de pacientes con PCRI:

Se conformó 1 grupo compuesto por 50 pacientes de entre 4 y 14 años de edad, de ambos géneros, con diagnóstico de PCRI en etapa de remisión y que se encontraban en tratamiento en el Servicio Máxilofacial 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) ausencia de enfermedades sistémicas.

b) Grupo de Individuos controles sanos:

De entre los pacientes que estaban recibiendo tratamiento ortodóncico en el Servicio Máxilofacial Infantil del Hospital San Juan de Dios, se constituyó un grupo control sano, pareado por género y edad, de 34 individuos voluntarios que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: a) ausencia de patología glandular; b) ausencia de patología sistémica.

Se obtuvo el consentimiento informado de los tutores de todos los individuos que participaron en el estudio.

5.2.- Recolección de muestras salivales.

De todos los individuos incluidos en el estudio, se recolectó 1 ml de saliva parotídea, derecha e izquierda, 1 ml de saliva submandibular/sublingual y 1 ml de saliva total; según procedimientos descritos por Morales y cols. (59). Se consignó el compromiso clínico unilateral o bilateral de cada individuo. La recolección fue realizada por un único operador calibrado para esta maniobra. La saliva fue recolectada bajo estimulación lingual con ácido cítrico al 2%. Las muestras de saliva fueron mantenidas en recipientes inmersos en hielo y trasladadas al laboratorio para su almacenamiento a -20°C , hasta su análisis.

5.3.- Análisis de parámetros moleculares salivales.

a) Cuantificación de las proteínas salivales.

Se aplicó el método de Bramhall (60), en forma de micrométodo y con adaptaciones descritas previamente (61, 62). Brevemente, alícuotas de 40 μl de saliva y de un estándar de seroalbúmina bovina (10-50 μg) fueron depositados sobre filtros de celulosa. Los filtros fueron fijados en ácido tricloroacético 5%, lavados sucesivamente en etanol 80% y etanol-éter 3:1 (v/v), teñidos con Coomassie Blue 0,25% durante 20 min a 60°C y lavados exhaustivamente en ácido acético 7% hasta obtener un fondo claro. Luego fueron lavados una vez en agua destilada, secados bajo lámpara y el colorante de cada disco fue eluido

en metanol 45%-amoníaco 0,25% y leído espectrofotométricamente a 610 nm.

b) Medición de la actividad metaloproteasa mediante Zimografía:

Alícuotas de saliva conteniendo 5 μ g de proteína, fueron mezcladas con tampón de muestra en condiciones no denaturantes y separadas electroforéticamente a un voltaje constante de 125 V, en un gel de poliacrilamida-SDS 10% de acuerdo al procedimiento estandarizado de Laemmli (63) excepto que contenía gelatina a una concentración final de 1 mg/ml. Una vez finalizada la separación electroforética, cuando el colorante del frente de corrida migró a 4 mm del borde inferior del vidrio, el gel fue incubado en tampón de activación (Tris HCl pH 7,5 10 mM, Triton X100 1,25%, CaCl₂ 5 Mm, ZnCl₂ 1uM) toda la noche a 37 °C.

Los geles fueron teñidos con Coomassie blue por 6 horas y desteñidos en una solución metanol 10%, ácido acético 15%(v/v) hasta evidenciar bandas de actividad enzimática. Los geles fueron calibrados utilizando estándares proteicos de tamaño molecular conocido, de entre 235 y 35 kDa. Se guardó registro fotográfico de todos los geles.

La medición de la actividad metaloproteasa fue de tipo cualitativa registrando presencia o ausencia de actividad enzimática.

c) Confirmación de la Actividad Metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9:

La actividad proteasa no dependiente de catión divalente fue descartada incubando las muestras de saliva con los siguientes inhibidores de proteasas inespecíficas: NEM (N-etilmaleimida) 50 mM (inhibidor de tiol- proteasa) y PMSF (fenil-metil-sulfunil-fluoruro) 50 mM (inhibidor de serín proteasas y proteasas de cisteína).

La actividad metaloproteinasa fue confirmada incubando un duplicado de cada gel en tampón de activación con EDTA, inhibidor específico de metaloproteasa, a una concentración de 0,5 M. Adicionalmente, se determinó el tamaño molecular a cada banda con actividad gelatinolítica, contrastándolas con estándares de tamaño molecular conocido y con estándares de MMP-2 y MMP-9.

En cada muestra salival se consignó la ausencia o presencia de actividad MMP-2 y MMP-9.

5.4.- Análisis del compromiso clínico y sialográfico.

a) Registro de la lateralidad de la afección clínica glandular:

Previo a la toma de muestra de saliva, se consignó si la presentación clínica de la enfermedad era unilateral derecha, unilateral izquierda o bilateral.

b) Grado de compromiso sialográfico de la glándula parótida:

En el análisis de correlación de la actividad metaloproteasa salival con el grado de compromiso sialográfico, se incluyeron 33 pacientes con PCRI, los que al momento de la toma de muestra salival disponían de sialografía bilateral.

El compromiso de la glándula parótida en la imagen sialográfica, fue realizado por 2 observadores calibrados, que clasificaron el compromiso del árbol ductal en 4 grados, como se indica a continuación:

Grado 0: Imagen normal.

Grado 1: Se observa conducto principal, secundarios y terciarios y existen unos pocos puntos radiopacos.

Grado 2: Se observa conducto principal, un menor número de conductos secundarios y terciarios que en el grado 1, y hay un número intermedio de puntos radiopacos.

Grado 3: Se observa conducto principal, el que puede estar alterado, no aparecen conductos secundarios ni terciarios y existe gran densidad numérica de puntos radiopacos.

5.5.- Análisis estadístico:

Los parámetros poblacionales fueron obtenidos mediante el cálculo de los valores promedios y sus respectivas desviaciones estándar. La significancia ($p < 0,05$) de las diferencias entre los valores correspondientes a distintas poblaciones de sujetos fue calculada mediante Test-t y test de Fisher. Se realizaron las correlaciones entre todas las variables y se determinó las asociaciones correspondientes. Haciendo uso del programa estadístico STATA.

RESULTADOS

1.-ANÁLISIS DE PARÁMETROS MOLECULARES DE LA SALIVA

1.1- ANALISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SALIVALES.

a) Concentración de proteínas salivales en individuos controles sanos.

En cada individuo, se determinó la concentración de proteínas de la saliva parotídea derecha e izquierda, submandibular/sublingual y total. Como se observa en la tabla I, en el grupo control los valores promedios de concentración de proteínas fueron $0,554 \pm 0,186$ mg/ml, $0,552 \pm 0,204$ mg/ml, $0,481 \pm 0,169$ mg/ml y de $0,773 \pm 0,203$ mg/ml respectivamente. El tipo salival que presentó la mayor concentración de proteínas correspondió a la saliva total, seguido de la saliva parotídea y luego de la submandibular/sublingual. La concentración de proteínas de la saliva aportada por ambas glándulas parótidas de un mismo individuo fue similar (Tabla I). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas salivales entre grupos de ambos sexos o distintas edades.

b) Concentración de proteínas salivales en pacientes con PCRI.

Al realizar este mismo análisis en los distintos tipos salivales en pacientes con PCRI, se observó que los valores promedios de concentración de

proteínas fueron $0,659 \pm 0,292$ mg/ml para la saliva parotídea derecha, $0,693 \pm 0,304$ mg/ml para la saliva parotídea izquierda, $0,471 \pm 0,154$ mg/ml para la saliva submandibular/sublingual y $0,612 \pm 0,169$ mg/ml para la saliva total (Tabla I). En este grupo de individuos, la saliva que presentó la mayor concentración de proteínas fue la saliva parotídea, seguida de la saliva total. Al igual que en el grupo control sano, la saliva submandibular/sublingual fue la menos proteica y la concentración de proteínas en la saliva de ambas glándulas parótidas fue similar (Tabla I). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas salivales entre grupos de ambos sexos o distintas edades.

Al comparar los valores promedios de concentración de proteínas de la saliva parotídea del grupo de pacientes con PCRI con la del grupo control sano, se determinó que el primer grupo presentó una mayor concentración de proteínas. Esta diferencia fue estadísticamente significativa con un $p = 0,034$ en la saliva parotídea derecha y un $p = 0,01$ en la saliva parotídea izquierda. Del mismo modo, al comparar los valores obtenidos en la saliva total, se pudo observar una menor concentración de proteínas en la saliva de los pacientes con PCRI en relación a los controles. Al igual que en el caso anterior, esta diferencia también resultó ser estadísticamente significativa con un $p = 0,0001$.

Los valores promedios de concentración de proteínas de la saliva

submandibular/sublingual entre ambos grupos no presentó diferencias estadísticamente significativas (Tabla I).

TABLA I: CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SALIVALES EN INDIVIDUOS CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON PCRI.

CONDICIÓN	SALIVA PAROTIDEA DERECHA	SALIVA PAROTIDEA IZQUIERDA	SALIVA SUBM/SUBL	SALIVA TOTAL
	X ± DE	X ± DE	X ± DE	X ± DE
GRUPO CONTROL n = 34	0,554 ± 0,186 p = 0,034	0,552 ± 0,204 p = 0,010	0,481 ± 0,169 p = 0,386	0,773 ± 0,203 p = 0,0001
GRUPO PCRI n = 50	0,659 ± 0,292 p = 0,034	0,693 ± 0,304 p = 0,010	0,471 ± 0,154 p = 0,386	0,612 ± 0,169 p = 0,0001

Concentración de proteínas obtenidas por el método de Bramhall y expresadas en mg/ml. Análisis estadístico: Test-t Student, programa STATA
X = Promedio, DE = Desviación Estándar.

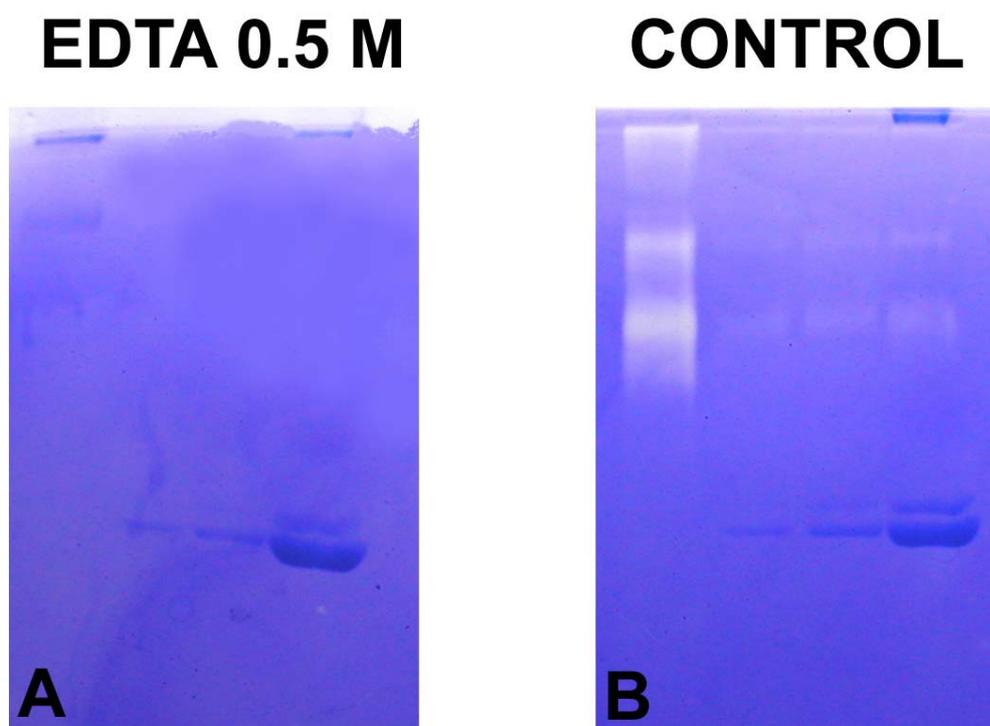
1.2- CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD METALOPROTEINASA MMP-2 Y MMP-9 SALIVAL.

Con la finalidad de verificar que la actividad gelatinolítica de la saliva, observada en las zimografías, correspondía específicamente a actividad metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9; se procedió a descartar la actividad proteasa inespecífica. Ninguno de los inhibidores de proteasas utilizados en los experimentos, según se describe en el punto 5.3c de Materiales y Métodos, inhibió la actividad gelatinolítica salival. (Fig. 1B). Sin embargo, la incubación de los geles con el agente quelante EDTA, resultó en la inhibición total de la actividad gelatinolítica de las muestras de salivas cargadas en el gel (Fig 1A).

De acuerdo a la movilidad relativa de las bandas con actividad gelatinolítica en las zimografías, se identificó a MMP-2 en la forma latente y activa como aquellas bandas que presentaban un tamaño molecular de 72 y 64 kDa respectivamente. En forma similar, se identificó la forma latente y activa de MMP-9 como aquellas bandas que presentaban un tamaño molecular de 92 y 84 kDa respectivamente (Fig.2 A). Adicionalmente las muestras de saliva en estudio, fueron separadas electroforéticamente en forma simultánea, con un estándar de MMP-2 y MMP-9 en sus formas latentes y activas (Fig. 2B).

El conjunto de estas condiciones experimentales permitió identificar con propiedad, a estas moléculas, como las metaloproteasas anteriormente mencionadas.

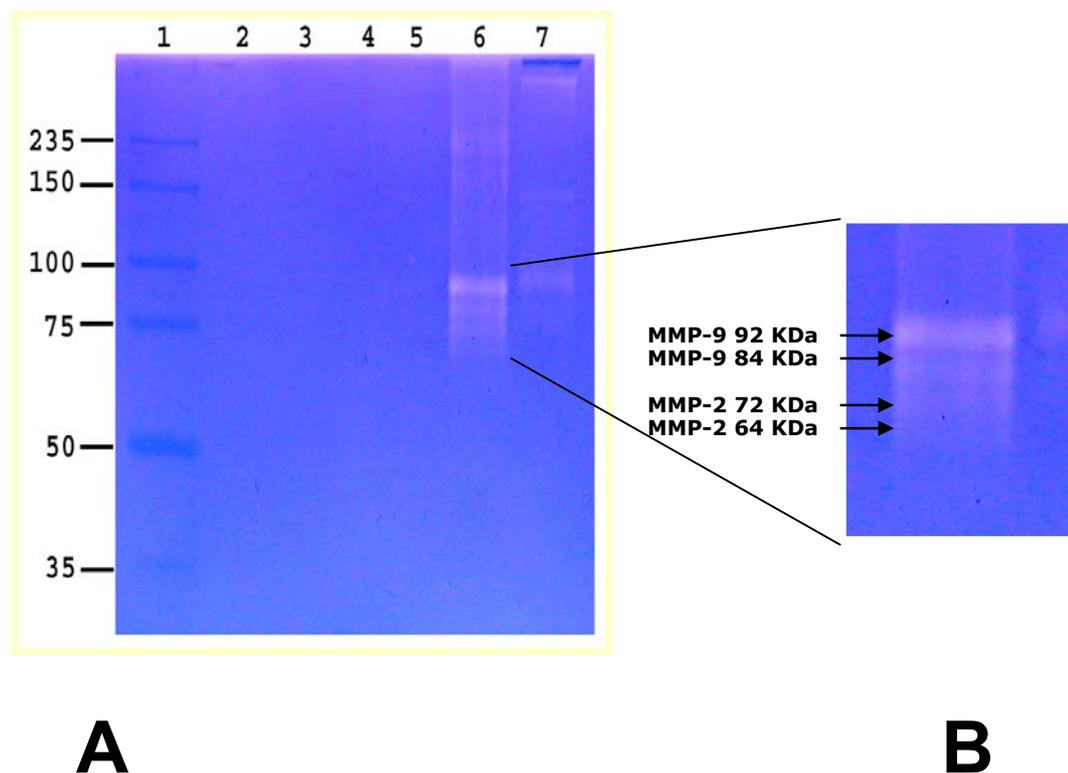
FIGURA 1: ZIMOGRAFÍA QUE CONFIRMA LA ACTIVIDAD METALOPROTEINASA SALIVAL.



A: Gel incubado con el agente quelante EDTA e inhibidores inespecíficos de proteasas, observe la inhibición total de la actividad gelatinolítica de las muestras de salivas cargadas en el gel.

B: Gel control incubado con inhibidores inespecíficos de proteasas pero sin EDTA, no se inhibe la actividad gelatinolítica salival.

FIGURA 2: ZIMOGRAFÍA QUE MUESTRA LA VERIFICACIÓN DE MMP-2 Y MMP-9 SALIVAL.



A: A cada banda con actividad gelatinolítica se le determinó su tamaño molecular contrastándolas contra proteínas estándares de tamaño molecular conocido (carril 1) y contra estándares de MMP-2 y MMP-9 (carril 6). En el carril 7 se ve actividad gelatinolítica de una muestra de saliva total de un sujeto control.

B: Aumento del carril 6 de la figura A, en la región comprendida entre 100 y 60 kDa, que muestra estándares de MMP-2 y 9.

1.3- ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD METALOPROTEINASA MMP-2 Y MMP-9 SALIVAL

a) Individuos controles sanos.

En el grupo de individuos control sano se determinó la presencia o ausencia de actividad metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 en las salivas parotídeas, submandibular/sublingual y total. Sólo 2 sujetos presentaron simultáneamente actividad metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 positiva en la saliva parotídea proveniente de ambas glándulas. En la saliva submandibular/sublingual, 8 individuos manifestaron actividad MMP-2 y 14 actividad MMP-9. En la saliva total, en 18 de ellos se observó actividad MMP-2 y en 22 actividad MMP-9 (Tablas II y III).

En orden decreciente, el tipo salival que presentó mayor frecuencia de actividad metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 fue la saliva total, seguida de la saliva submandibular/sublingual y finalmente la saliva parotídea.

b) Pacientes con PCRI.

De la misma forma que en el grupo control, en el grupo de pacientes con PCRI se determinó la actividad MMP-2 y MMP-9 en los distintos tipos salivales.

Se pudo observar que 14 individuos manifestaron actividad MMP-2 y 26 actividad MMP-9 en la saliva parotídea derecha. Al determinar la actividad de

estas enzimas en la saliva parotídea izquierda, se pudo observar que 20 individuos presentaron actividad MMP-2 y 27 actividad MMP-9. En la saliva submandibular/ sublingual, se observó que 12 sujetos presentaron actividad MMP-2 y 26 actividad MMP-9. En la saliva total se encontró actividad MMP-2 en 23 pacientes y actividad MMP-9 en 37 pacientes (Tablas II y III).

A continuación se procedió a comparar la frecuencia de individuos que presentaron actividad metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 de los distintos tipos salivales de los pacientes PCRI con la de los individuos sanos. Se determinó que el grupo de pacientes con PCRI presentó con mayor frecuencia actividad de estas enzimas en la saliva parotídea. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabla II y III). En tanto, la frecuencia de individuos que presentaron actividad metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 en la saliva submandibular /sublingual y total, no fue estadísticamente distinta al comparar ambos grupos. (Tabla II y III).

TABLA II: FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON PCRI QUE PRESENTAN ACTIVIDAD METALOPROTEINASA MMP-2 SALIVAL.

CONDICIÓN	ACTIVIDAD GELATINASA MMP-2							
	SALIVA PAROTIDEA DERECHA		SALIVA PAROTIDEA IZQUIERDA		SALIVA SUBM/SUBL		SALIVA TOTAL	
	+	-	+	-	+	-	+	-
GRUPO CONTROL n = 34	2	32	2	32	8	26	18	16
GRUPO PCRI n = 50	14 *p=0,011	36	20 *p=0,000	30	12 N.S	38	23 N.S	27

En cada tipo salival se determinó la presencia o ausencia de actividad MMP-2 mediante zimografía. La frecuencia de individuos que presentaron actividad enzimática en cada tipo salival fue comparada entre ambos grupos. Análisis estadístico: Test de Fisher, programa STATA.

N.S = No significativo estadísticamente.

* = p< 0,05

TABLA III: FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON PCRI QUE PRESENTAN ACTIVIDAD METALOPROTEINASA MMP-9 SALIVAL.

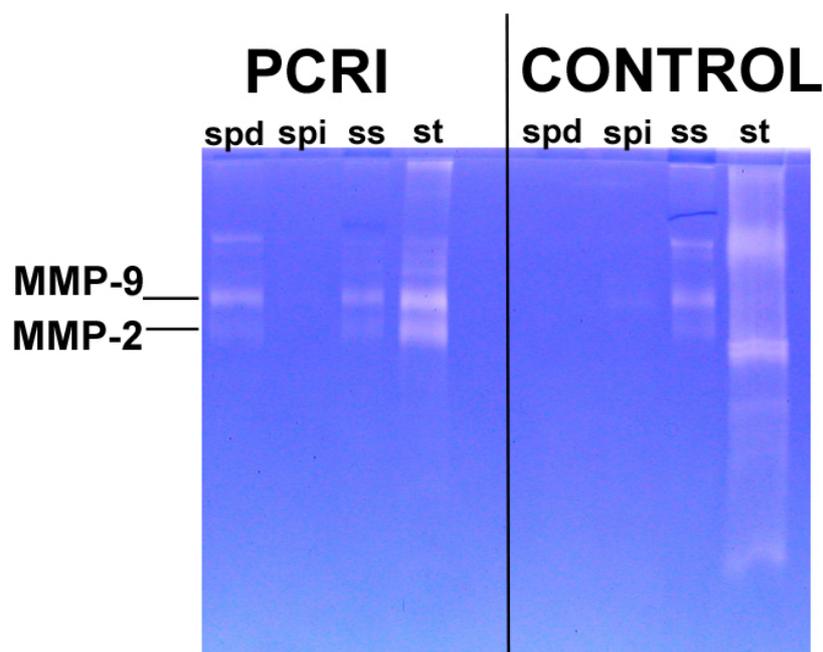
CONDICIÓN	ACTIVIDAD GELATINASA MMP-9							
	SALIVA PAROTIDEA DERECHA		SALIVA PAROTIDEA IZQUIERDA		SALIVA SUBM/SUBL		SALIVA TOTAL	
	+	-	+	-	+	-	+	-
GRUPO CONTROL n = 34	2	32	2	32	14	20	22	12
GRUPO PCRI n = 50	26 *p=0,000	24	27 *p=0,000	23	26 N.S	24	37 N.S	13

En cada tipo salival se determinó la presencia o ausencia de actividad MMP-9 mediante zimografía. La frecuencia de individuos que presentaron actividad enzimática en cada tipo salival fue comparada entre ambos grupos. Análisis estadístico: Test de Fisher, programa STATA.

N.S = Estadísticamente no significativo.

* = $p < 0,05$

FIGURA 3: ZIMOGRFÍA REPRESENTATIVA DE LA ACTIVIDAD METALOPROTEASA MMP-2 Y MMP-9 EN PACIENTES CON PCRI Y SUJETOS CONTROLES

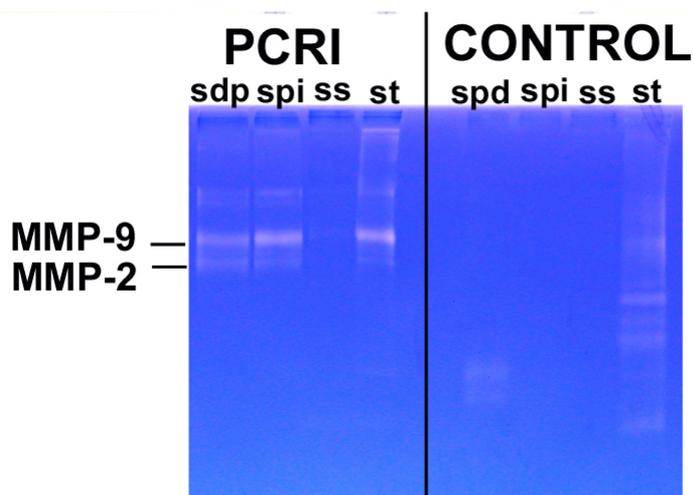


Actividad metaloproteasa salival en un individuo con PCRI y un sujeto control: Nótese que el paciente presenta actividad sólo en la saliva parotídea derecha y el individuo control ausencia de actividad en ambas salivas parotídeas, sin embargo ambos presentan actividad en la saliva total y submandibular/sublingual.

Las bandas electroforéticas de un tamaño molecular distinto a MMP-2 y MMP-9 corresponderían a formas poliméricas o truncadas de estas mismas enzimas.

spd= saliva parotídea derecha, spi = saliva parotídea izquierda, ss = saliva submandibular/sublingual, st = saliva total.

FIGURA 4: ZIMOGRAFÍA REPRESENTATIVA DE LA ACTIVIDAD METALOPROTEASA MMP-2 Y MMP-9 EN PACIENTES CON PCRI Y SUJETOS CONTROLES



Actividad metaloproteasa salival en un individuo con PCRI y un sujeto control: Nótese que el paciente presenta actividad en ambas salivas parotídeas en contraste con la ausencia de actividad en la saliva parotídea del individuo control. Sin embargo ambos presentan actividad en la saliva total y ausencia en la saliva submandibular/sublingual.

Las bandas electroforéticas de un tamaño molecular distinto a MMP-2 y MMP-9 corresponderían a formas poliméricas o truncadas de estas mismas enzimas.

spd= saliva parotídea derecha, spi = saliva parotídea izquierda, ss = saliva submandibular/sublingual, st = saliva total.

2.- ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON PCRI QUE PRESENTAN ACTIVIDAD MMP-2 Y MMP-9 EN LA SALIVA PAROTÍDEA, Y EL GRADO DE COMPROMISO SIALOGRÁFICO GLANDULAR.

En este análisis se incluyó a 33 pacientes con PCRI de los que se disponía sialografía bilateral. Las imágenes sialográficas correspondientes a las glándulas parótidas derecha e izquierda de cada individuo, fueron clasificadas dentro de uno de los 4 grados de compromiso sialográfico según se indica en el punto 5.4b de Materiales y Métodos. Como se indica en la tablas IV y V, se determinó que: a) 6 individuos presentaban compromiso grado 0 en la glándula izquierda y 13 en la glándula derecha; b) 6 individuos presentaban compromiso grado 1 en la glándula izquierda y 3 en la glándula derecha; c) 13 individuos presentaban compromiso grado 2 en la glándula izquierda y 11 en la glándula derecha; d) 8 individuos presentaban compromiso grado 3 en la glándula izquierda y 6 en la glándula derecha.

Luego se procedió a correlacionar la frecuencia de individuos con PCRI que presentaban actividad MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea proveniente de cada glándula, con el grado de compromiso sialográfico de la glándula respectiva.

Al observar la lateralidad izquierda, el análisis de la correlación entre ambas variables en cada individuo, permitió determinar que de 6 pacientes con compromiso grado 0, ninguno presentó actividad MMP-2 y MMP-9. De 6 pacientes con compromiso grado 1, sólo 1 paciente presentó ambas actividades enzimáticas. De 13 pacientes con compromiso grado 2, se observó que 6 de ellos presentaron actividad MMP-2 y 10 actividad MMP-9. Por último, de 8 pacientes con compromiso grado 3, se observó que 6 presentaron actividad MMP-2 y 7 actividad MMP-9. (Tabla IV)

En el lado derecho, el análisis de correlación entre ambas variables permitió observar que de 13 pacientes con un compromiso grado 0, ninguno presentó actividad MMP-2 y 2 actividad MMP-9. De 3 pacientes con compromiso grado 1, sólo 1 presentó actividad MMP-2 y 2 actividad MMP-9. De 11 pacientes con compromiso grado 2 se observó que, 3 presentaron actividad MMP-2 y 7 actividad MMP-9. Finalmente, de 6 pacientes con un compromiso grado 3, en 4 se encontró actividad MMP-2 y en 5 actividad MMP-9. (Tabla V)

Estos resultados mostraron que existe una correlación positiva y estadísticamente significativa entre ambos parámetros, tanto en la lateralidad derecha como en la izquierda. La correlación de la frecuencia de individuos con PCRI que presentaron MMP-9 y MMP-2 en la saliva izquierda, con el grado de

compromiso sialográfico de la glándula del mismo lado, arrojó un $p = 0,01$ y $0,02$ respectivamente. En el lado derecho, se obtuvo un $p = 0,02$ y $0,01$ para la correlación entre la frecuencia de individuos que manifestaron MMP-9 y MMP-2 en la saliva, y el grado de compromiso sialográfico de la glándula.

TABLA IV: FRECUENCIA DE PACIENTES CON PCRI QUE PRESENTAN ACTIVIDAD METALOPROTEINASA MMP-2 Y MMP-9 EN SALIVA PAROTIDEA IZQUIERDA SEGÚN GRADO DE COMPROMISO SIALOGRAFICO GLANDULAR IZQUIERDO.

COMPROMISO SIALOGRÁFICO	SALIVA PAROTÍDEA IZQUIERDA			
	ACTIVIDAD GELATINASA MMP-2		ACTIVIDAD GELATINASA MMP-9	
	+	-	+	-
GRADO 0 n = 6	0 □	6	0 ●	6
GRADO 1 n = 6	1 □	5	1 ●	5
GRADO 2 n = 13	6 □	7	10 ●	3
GRADO 3 n = 8	6 □	2	7 ●	1

Correlación positiva entre el grado de severidad observado en la sialografía y la frecuencia de MMPs en la saliva producida por la glándula afectada. Test Kruskal Wallis. ●Actividad MMP-9 (p = 0,001). □Actividad MMP-2 (p = 0,02). Programa estadístico STATA.

TABLA V: FRECUENCIA DE PACIENTES CON PCRI QUE PRESENTAN ACTIVIDAD METALOPROTEINASA MMP-2 Y MMP-9 EN SALIVA PAROTÍDEA DERECHA SEGÚN GRADO DE COMPROMISO SIALOGRÁFICO GLANDULAR DERECHO.

COMPROMISO SIALOGRÁFICO	SALIVA PAROTÍDEA DERECHA			
	ACTIVIDAD GELATINASA MMP-2		ACTIVIDAD GELATINASA MMP-9	
	+	-	+	-
GRADO 0 n = 13	0 □	13	2 ●	11
GRADO 1 n = 3	1 □	2	2 ●	1
GRADO 2 n = 11	3 □	8	7 ●	4
GRADO 3 n = 6	4 □	2	5 ●	1

Correlación positiva entre el grado de severidad observado en la sialografía y la frecuencia de MMPs en la saliva producida por la glándula afectada. Test Kruskal Wallis. ● Actividad MMP-9 ($p = 0,02$). □ Actividad MMP-2 ($p = 0,01$). Programa estadístico STATA.

3.- ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON PCRI QUE PRESENTAN ACTIVIDAD MMP-2 Y MMP-9 EN LA SALIVA PAROTÍDEA, Y EL COMPROMISO CLÍNICO UNI O BILATERAL PAROTIDEO.

La tabla VI muestra que los 33 pacientes con PCRI incluidos en el análisis del punto anterior, fueron agrupados de acuerdo a si su compromiso parotídeo clínico era unilateral derecho, unilateral izquierdo o bilateral. Luego se procedió a determinar la frecuencia de individuos que presentaron MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea derecha y/o izquierda por cada grupo, para hacer un análisis de correlación entre ambas variables.

De 6 pacientes con compromiso unilateral derecho, 2 presentaron actividad MMP-2 y 5 MMP-9 en la saliva secretada por la glándula afectada. De ellos, ninguno presentó actividad MMP-2 y uno actividad MMP-9 en la saliva producida por la glándula del lado no afectado (Tabla VI).

De 13 pacientes con compromiso unilateral izquierdo, 5 presentaron actividad MMP-2 y 7 actividad MMP-9 en la saliva producida por la glándula clínicamente comprometida. De estos pacientes, ninguno presentó actividad MMP-2 y 2 presentaron actividad MMP-9 en la saliva parotídea del lado no comprometido clínicamente. Finalmente, de 14 pacientes con compromiso

parotídeo bilateral, 6 manifestaron actividad MMP-2 y 9 individuos actividad MMP-9 en la saliva parotídea derecha; y 8 presentaron actividad MMP-2 y 10 actividad MMP-9 en la saliva parotídea izquierda (Tabla VI).

Los resultados indican que existe una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la frecuencia de individuos con PCRI que preentan actividad MMP-9 y MMP-2 en la saliva del lado derecho con la lateralidad del cuadro clínico ($p = 0,007$ y $0,03$ respectivamente). En el lado izquierdo, esta correlación no arrojó diferencias estadísticamente significativas, aunque el análisis estadístico sugiere una tendencia ($p = 0,08$ y $0,06$ respectivamente).

TABLA VI: FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON PCRI QUE PRESENTAN ACTIVIDAD METALOPROTEINASA MMP-2 Y MMP-9 SEGÚN LATERALIDAD DE LA AFECCIÓN CLÍNICA GLANDULAR.

GLÁNDULA AFECTADA	ACTIVIDAD METALOPROTEINASA EN SALIVA PAROTIDEA							
	DERECHA				IZQUIERDA			
	MMP-2		MMP-9		MMP-2		MMP-9	
	+	-	+	-	+	-	+	-
PAROTIDA DERECHA n = 6	2 †	4	5 *	1	0 ◇	6	1 ‡	5
PAROTIDA IZQUIERDA n = 13	0 †	13	2 *	11	5 ◇	8	7 ‡	6
AMBAS PAROTIDAS n = 14	6 †	8	9 *	5	8 ◇	6	10 ‡	4

Correlación positiva entre la lateralidad del cuadro clínico y la frecuencia de individuos con actividad MMPs en la saliva producida por la glándula afectada. Lado derecho: Test Kruskal Wallis. *MMP-9 (p = 0,007). †MMP-2 (p = 0,03). Programa estadístico STATA.

El valor estadístico del lado izquierdo sugiere una tendencia: ‡MMP-9 (p = 0,08). ◇MMP-2 (p = 0,06).

DISCUSIÓN

La PCRI es una enfermedad a la que se le describen factores asociados como malformaciones ductales congénitas, factores genéticos, alergias, manifestaciones locales de enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, infecciones bacterianas, etc. Sin embargo, a ninguna de estas condicionantes se les ha podido confirmar un rol causal en la etiopatogenia de esta enfermedad y hasta la fecha, su etiología continúa siendo desconocida (1,2, 9,11).

El esclarecimiento de la etiología de esta enfermedad se ha visto dificultado por la falta de acceso al tejido glandular involucrado en el proceso patológico. La biopsia de la glándula parótida se encuentra limitada a casos estrictamente necesarios, dada la proximidad del nervio facial. En un intento por describir la evolución de la patología en el tejido glandular comprometido a través de exámenes complementarios, se ha realizado una correlación entre la imagen sialográfica de la glándula enferma con su comportamiento clínico, la que no siempre resulta ser evidente (1,9). Por otra parte, la sialografía es un examen de alta invasividad, que en la actualidad está tendiendo a ser reemplazado por la ultrasonografía (5, 6, 8, 9, 13). Sin embargo, la escasez de equipamiento y personal entrenado para la ejecución de este último examen diagnóstico, dificulta su aplicación en forma masiva.

Por estas razones, en este proceso patológico, resulta de particular

interés utilizar al material secretado por la glándula afectada para su análisis molecular. De esta forma se podría utilizar a la saliva parotídea, como un material de utilidad diagnóstica, no invasiva y de fácil obtención.

En este estudio se pretendió identificar, en la saliva secretada por la glándula parótida de individuos con PCRI, moléculas que pudiesen estar asociadas al proceso patológico que la afecta.

Primero se realizó un análisis de la concentración de proteínas en la saliva total y en la secretada por las glándulas salivales mayores de sujetos controles y afectados con PCRI. La saliva parotídea del grupo de pacientes con PCRI presentó una mayor concentración de proteínas que la del grupo control. Estos resultados difieren con el estudio de Ericson y Sjobak (15), quienes no encuentran diferencia en las proteínas totales entre ambos grupos. Sin embargo en este estudio, se reporta un aumento en las concentraciones de albúmina, IgA, lactoferrina y calicreina salivales en el grupo de pacientes con PCRI, respecto del grupo control. Probablemente, la diferencia en los valores de concentración de proteínas totales entre ambos estudios se deba a los métodos de cuantificación de proteínas utilizados.

El aumento de la concentración de la saliva parotídea observado en nuestro trabajo, podría deberse a un aumento en la cantidad de proteínas secretadas por el acino, una falla en la filtración de proteínas séricas o una

disminución en el contenido de agua del fluido secretado (64). Aunque, se requiere de un análisis molecular adicional para determinar el origen del aumento de esta concentración proteica, la alteración de este parámetro bioquímico salival indicaría una falla en el funcionamiento de la glándula observable en la saliva.

A diferencia de la saliva parotídea, la saliva submandibular/sublingual proveniente de los grupos incluidos en nuestro estudio, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas. Este sería el primer informe sobre antecedentes de este tipo salival en casos de PCRI. La normalidad de este fluido en los pacientes con PCRI no fue un hecho sorprendente, puesto que las glándulas submandibular y sublingual no se encuentran clínicamente comprometidas en este proceso patológico.

La saliva total está formada por la confluencia de las salivas glandulares mayores y menores (57). Puesto que la saliva parotídea de los pacientes con PCRI fue más concentrada que la de los individuos controles y la submandibular/sublingual no mostró diferencias en la concentración, era razonable esperar que la saliva total de los pacientes con PCRI de nuestro estudio hubiese presentado una mayor concentración de proteínas que el grupo control. Sin embargo, esta saliva en los pacientes con PCRI presentó una menor concentración de proteínas que la de los individuos sanos. Esta situación

podiese tener relación con la ya descrita disminución del flujo salival parotídeo en los pacientes afectados por esta enfermedad (1,2).

A continuación, se analizó la actividad metaloproteasa salival. Como un primer paso en el desarrollo de este trabajo de investigación, fue necesario determinar la frecuencia de individuos con actividad MMP-2 y MMP-9 salival en una población de 34 sujetos controles sanos.

Aunque en la literatura especializada se encuentra descrita esta actividad en la saliva total de grupos controles sanos, los estudios en que se analiza esta actividad en salivas glandulares, son escasos y en la mayoría de ellos los grupos controles están constituidos por pocos individuos (entre 1 y 17) (43, 44, 53).

De acuerdo a nuestros resultados, más del 50% de los individuos controles presentaron actividad MMP-2 y MMP-9 en la saliva total; alrededor de un tercio en la saliva submandibular/sublingual, y sólo 2 individuos en la saliva parotídea (Tablas II y III). Los resultados obtenidos en la saliva total y la saliva parotídea concuerdan con los descritos en la literatura especializada (43, 44, 53). Sin embargo nuestros datos respecto a la presencia de estas metaloproteasas en la saliva submandibular/sublingual difieren con los resultados de Mäkelä (43), quien describe ausencia de estas enzimas en este tipo salival en un estudio realizado en 17 individuos. Nuestro estudio incluye un

número mayor de individuos controles sanos que los estudios realizados por otros autores (43, 44, 53). Esta situación permite establecer con mayor confianza el comportamiento de estas enzimas en la saliva en condiciones de normalidad.

El escaso numero de individuos controles, que presentaron actividad MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea, sugiere que estas moléculas no estarían presente en este fluido glandular o que serían secretadas por un porcentaje muy bajo de la población. Aunque los 2 individuos con actividad enzimática positiva en la saliva parotídea no presentaban patología sistémica, desconocemos si eran portadores de alguna patología glandular subclínica que pudiese explicar la presencia de estas moléculas en su saliva, situación que está siendo analizada. Otra alternativa que pudiese dar cuenta de este hecho sería la contaminación de la muestra con saliva total, sin embargo fue descartada, pues el patrón de bandeado observado en la zimografía para la saliva total fue distinta a la de la saliva parotídea en estos 2 individuos. Con el mismo fundamento descartamos la posibilidad de contaminación de la saliva submandibular/sublingual en los individuos que presentaron actividad metaloproteasa en este tipo salival. Aunque nuestros resultados describen la presencia de MMP-2 y MMP-9 en la saliva submandibular/sublingual y total de un porcentaje importante de los controles sanos, en este estudio no se abordó

el posible origen de estas moléculas. En la literatura se describe al fluido crevicular gingival como una posible fuente de las metaloproteasas de la saliva total (43), sin embargo esta hipótesis no explicaría la presencia de estas moléculas en la saliva aportada por las glándulas submandibular y sublingual en condiciones de normalidad reportada por nosotros. Se requiere de un estudio adicional que aborde esta situación y plantee una posible explicación para la presencia de estas moléculas en el fluido glandular.

Una vez realizado el análisis en la población normal, se procedió a efectuar el mismo proceso en la población de individuos afectados con PCRI.

En este grupo de individuos más del 50% de ellos presentó actividad MMP-2 y MMP-9 en la saliva total, y alrededor de un tercio, manifestó esta misma actividad enzimática en la saliva submandibular/sublingual. Al comparar estos resultados con el grupo control sano, vemos que la actividad de estas enzimas es muy similar entre ambos grupos, sugiriendo que podría corresponder a un fenómeno de carácter normal la presencia de actividad MMP-2 y MMP-9 en la saliva total y submandibular /sublingual de individuos con PCRI.

Sin embargo en las muestras de saliva parotídea proveniente de pacientes con PCRI, alrededor de un 30% presentó actividad MMP-2 y más de un 50% actividad MMP-9, contrastando con el 5,9% encontrado en los sujetos

controles sanos.

Estudios previos, que analizan la presencia de estas enzimas en la saliva parotídea de pacientes afectados por patologías que afectan a las glándulas salivales, como el Síndrome de Sjögren y la irradiación terapéutica de cabeza y cuello, indican que estos pacientes presentan un aumento de estas moléculas en la saliva parotídea en relación a sujetos controles sanos (52, 53, 54, 55, 56).

A la fecha, no existen estudios que analicen la presencia de estas enzimas en la saliva de pacientes con PCRI. Nuestro estudio constituye el primer reporte de un aumento de la frecuencia de individuos con PCRI que manifiestan actividad MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea. Estos resultados sugerirían que estas moléculas pudiesen estar involucradas en algún mecanismo de destrucción glandular relacionado con un desbalance en cualquiera de los mecanismos de regulación: a nivel de la transcripción, activación y/o inhibición, descritos para estas metaloproteasas (17, 33, 37).

Dada la posible relación de estas enzimas con el mecanismo de destrucción glandular, fue de interés investigar si este aumento en la frecuencia se relacionaba con parámetros clínicos o imagenológicos de severidad ya establecidos (1, 2, 10).

Puesto que la sialografía es el examen complementario de rutina utilizado para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, lo utilizamos para clasificar

el grado de compromiso glandular (1, 2, 5, 7,10)

Entonces, se procedió a evaluar la posible correlación entre la frecuencia de individuos con PCRI que presentan actividad MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea, y el grado de compromiso sialográfico glandular. Los resultados permitieron observar una correlación positiva y estadísticamente significativa entre ambos parámetros. Así, los pacientes con PCRI que presentaron un mayor grado de severidad, indicado por la sialografía, presentaron también actividad MMP-2 y MMP-9 con mayor frecuencia.

Debido a que nuestro estudio corresponde a una primera aproximación al problema, determinamos presencia o ausencia de actividad de las metaloproteasas analizadas en el fluido salival. Producto de los resultados obtenidos, sería de interés complementar el análisis mediante un estudio que incluya la cuantificación de la actividad enzimática y la determinación de sus formas moleculares activas o latentes.

Como parámetro clínico indicador de compromiso glandular utilizamos la condición de unilateralidad o bilateralidad de los pacientes con PCRI analizados.

Entonces se procedió a correlacionar la frecuencia de individuos con PCRI que presentaron actividad enzimática MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea, con el compromiso clínico unilateral o bilateral de las glándulas

parótidas de estos pacientes.

Los resultados indican que las glándulas clínicamente comprometidas presentan actividad MMP-2 y MMP-9 salival, con mayor frecuencia que las glándulas no comprometidas. Este resultado refuerza la noción de que a medida que existe compromiso glandular, ya sea clínico o sialográfico existe una mayor probabilidad de observar estas metaloproteasas en la saliva. Este hecho sugiere que la identificación de estas moléculas en la saliva parotídea de los pacientes con PCRI, podría ser utilizada como una herramienta en la clínica para la evaluación del compromiso glandular; tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la enfermedad.

Adicionalmente, este enfoque experimental, podría constituir un buen modelo de estudio, que permita describir a nivel molecular la etiopatogenia de la enfermedad.

Para ello se requeriría evaluar la presencia de moléculas involucradas en la activación, inhibición y sobreexpresión de estas enzimas. Fundamentado en los antecedentes de la literatura especializada, sería de particular interés identificar la presencia de TIMPs 1 y 2, Citoquinas de origen epitelial y Factores de crecimiento en la saliva parotídea de estos pacientes (17, 18, 22, 24, 26, 29).

CONCLUSIONES

- 1.- La saliva parotídea de pacientes con PCRI presenta una mayor concentración de proteínas respecto a la de individuos controles sanos.
- 2.- Los pacientes con PCRI presentan con mayor frecuencia MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea en relación a los sujetos controles sanos.
- 3.- Los pacientes con PCRI que presentan un mayor grado de compromiso sialográfico de la glándula parótida, presentan con mayor frecuencia actividad MMP-2 y MMP-9 en la saliva secretada por la glándula analizada.
- 4.- La saliva secretada por glándulas parótidas comprometidas clínicamente, presentan actividad MMP-2 y MMP-9 con mayor frecuencia que las glándulas no afectadas.

SUGERENCIAS

El presente trabajo permitió describir alteraciones moleculares de la saliva parotídea de pacientes con PCRI.

El análisis zimográfico indicó que en la saliva parotídea de estos pacientes se encuentran las metaloproteasas 2 y 9 que normalmente estarían ausentes en individuos sanos. El presente estudio constituye el primer reporte de la presencia de estas moléculas en la saliva de estos pacientes. Estos resultados hacen necesario un análisis complementario que permita cuantificar la actividad de estas enzimas y determinar si ellas se encuentran activadas o en forma latente. Adicionalmente podría complementarse la caracterización molecular de estas enzimas mediante la detección con anticuerpos específicos. Puesto que estas enzimas estarían involucradas en la fisiopatología de esta enfermedad, sería de particular interés el analizar si existe en la saliva de estos pacientes, moléculas relacionadas con los mecanismos que las regulan.

Desde una perspectiva clínica, sería interesante realizar un estudio de correlación entre las alteraciones moleculares de la saliva parotídea en pacientes con PCRI descritas en nuestro estudio; con exámenes imagenológicos de una probable mayor sensibilidad que la sialografía como

serían la ultrasonografía, la tomografía axial computarizada o la resonancia nuclear magnética.

Además, se podría determinar en un estudio de seguimiento, si las metaloproteasas 2 y 9 de la saliva parotídea de los pacientes con PCRI, disminuyen al remitir el cuadro clínico.

RESUMEN

La Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI) es una inflamación recurrente y dolorosa, de etiología desconocida. Se inicia alrededor de los 2 años de edad y se mantiene hasta la adolescencia. No existen estudios que analicen las características moleculares de la saliva de estos pacientes. En el Síndrome de Sjögren y radiación terapéutica del territorio máxilo-facial, se han descrito alteraciones en la actividad metaloproteasa 2 y 9 salival. En el presente trabajo se propuso analizar si existían alteraciones moleculares de la saliva en casos de PCRI que se correlacionaran con el compromiso clínico y sialográfico glandular.

En 50 pacientes con PCRI de 4 a 14 años y 34 voluntarios sanos pareados por edad y género, se recolectó saliva total, parotídea y submandibular/sublingual. Se cuantificó proteínas por el método de Bramhall, y se midió la actividad metaloproteasa 2 y 9 mediante zimografía en presencia de gelatina. Se clasificó el compromiso clínico y sialográfico de la glándula parótida y se les correlacionó con los parámetros moleculares de la saliva.

Los pacientes con PCRI, al compararlos con el grupo control, presentaron aumento en la concentración de proteínas de la saliva parotídea y disminución en la saliva total. Aumento en la frecuencia de individuos con

actividad metaloproteasa 2 y 9 en la saliva parotídea.

La presencia de metaloproteasa 2 y 9 en la saliva parotídea se correlacionó positivamente con el compromiso clínico y sialográfico en estos pacientes.

El análisis molecular salival parotídeo en la PCRl podría ser utilizada para monitorear su evolución clínica y para estudiar otras moléculas involucradas en su fisiopatología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Chitre V.V., Premchandra D.J. Recurrent parotitis. Arch. Dis. Child. 1997 Oct, 77(4):359-63. Review.
- 2) Baurmash H.D. Chronic recurrent parotitis: a closer look at its origin, diagnosis, and management. J. Oral Maxil. Surg. 2004, 62(8):1010-8. Review.
- 3) Vinagre C., Martínez M.J., Avendaño L.F., Landaeta M., Pinto M.E. Virology of infantile chronic recurrent parotitis in Santiago de Chile. J. Med. Virol. 2003, 70(3):459-62.
- 4) Landaeta M., Giglio M.S., Ulloa M.T., Martínez M.J., Pinto M.E. Clinical, microbiological etiology and therapeutic aspects in infantile chronic recurrent parotitis (PCRI). Rev. Chil. Pediatr. 2003, 74(3):269-276.
- 5) Nahlieli O., Shacham R., Shlesinger M., Eliav E. Juvenile recurrent parotitis: a new method of diagnosis and treatment. Pediatrics. 2004, 114(1):9-12.
- 6) Nazar M., Iñiguez F.O., Der M C., Méndez C., García C., Arce J., Díazalesnik E. Parotiditis aguda recurrente en el niño. Rev. Chil. Pediatr. 2001, 72(5):437-442.
- 7) Rostián C.G., Giuliano C., Acosta S. Parotiditis crónica recurrente en el niño. Rev. Chil. Pediatr. 2004, 75(1):43-47.

- 8) Shimizu M., Ussmuller J., Donath K., Yoshiura K., Ban S., Kanda S., Ozeki S., Shinohara M. Sonographic analysis of recurrent parotitis in children: a comparative study with sialographic findings. *Oral Surg. Oral Med. O.* 1998, 86(5):606-15.
- 9) Concheiro A., Bellver E., Garrido R., Garcia F. Chronic recurrent parotitis in childhood. *An. Esp. Pediatr.* 2000, 53(5):418-21.
- 10) Ramirez J., Urrutia H., Aravena A. Correlación entre la duración de la enfermedad y las imágenes sialográficas en casos con parotiditis recurrente unilateral. *Arch. Odontoestomatol.* 1996, 12(9):517-21.
- 11) Giglio M.S., Landaeta M., Pinto M.E. Microbiology of recurrent parotitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997, 16(4):386-90.
- 12) Moody A.B., Avery C.M., Walsh S., Sneddon K., Langdon J.D. Surgical management of chronic parotid disease. *Brit. J. Oral Max. Surg.* 2000, 38(6):620-622. Review.
- 13) Isaacs D. Recurrent parotitis. *J. Paediatr Child H.* 2002, 38(1):92-4.
- 14) Tabak L., Mandel I.D., Herrera M., Baumash H. Changes in lactoferrin and other proteins in a case of chronic recurrent parotitis. *J. Oral Pathol. Med.* 1978, 7(2):91-9.

- 15) Ericson S., Sjoback I. Salivary factors in children with recurrent parotitis. Part 2: Protein, albumin, amylase, IgA, lactoferrin lysozyme and kallikrein concentrations. *Swed. Dent. J.* 1996, 20(5):199-207.
- 16) Birkedal-Hansen H, Moore WG; Bodden MK, WindsoLJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A. Matrix Metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993, 4: 197-250
- 17) De Souza A, Line S. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev FOB.* 2002, 10(1):1-6
- 18) Johnson L., Dyer R., Hupe D. Matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998, 2 :466-447
- 19) Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1995, 7: 728-735
- 20) Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays.* 1992, 14 : 455-463
- 21) Bode W, Fernandez-Catalán C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maslos K. Structural properties of metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999, 55: 639-652
- 22) Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. Structure of Human Pro-Matrix Metalloproteinase-2: Activation Mechanism Revealed. *Science.* 1999, 284:1667-1670

- 23) Nagase H., Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol. Chem.*1999, 274; 31:21491–21494
- 24) Smith G, Mickler e, Hasty K, Brandt K. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline. Relationship to structure of the enzyme. *Arth. Rheum.* 1999, 42 (6): 1140-1146.
- 25) Xu Xiaoping, Wnag Y, Lauer- Fields J, Fields G, Steffenden B. Contributions of the MMP-2 collagen binding domain to gelatin cleavage Substrate via the collagen binding domain is required for hydrolysis of gelatin but not short peptides. *Matrix Biol.* 2004, 23: 171-181
- 26) Curry T., JR, Osteen K. The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle extensive remodeling of the uterus occurs to support. *Endocr. Rev.* 2003, 24: 428–465
- 27) Delaissé JM, Vaes G. Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. *Biology and Physiology of the Osteoclast.* Boca Raton: CRC Press. 1992, 289-314.
- 28) Jeffrey JJ. Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin. Perinatol.*1991, 15: 118-126

- 29) Talhouk RS, Bissell MJ, Werb Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell. Biol.* 1992, 118:1272-1282
- 30) Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery.* 1997, 122: 264-272
- 31) Wolf C, Chenerd MP, Durand de Grossouvre P, Bellocq JP, Chambon P, Basset P. Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 1992, 99: 870-872
- 32) Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix Metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 1997, 6: 199-213
- 33) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991, 64: 327-336
- 34) Forsyth P, Wong H, Laing T, Rewcastle, Morris D, Muzik H, Leco K, Johnston R, Brasher P, Sutherland G, Edwards D. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Brit. J. Cancer.* 1999, 79:11/12,1838-1835

- 35) Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *New. Engl. J. Med.* 1990, 322: 1277-1289
- 36) Jones C, Sane D, Herrington D. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc. Res.* 2003, 59: 812-823
- 37) Klein G, Vallenga E, Fraaije M, Kamps W, de Bont E. The possible role of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 2004, 50: 87-100
- 38) Shima I, Sasaguri Y, Kusukawa J, Yamana H, Fujita H, Kakegawa T. Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behaviour of esophageal carcinoma. *Cancer.* 1992, 70: 2747-2753
- 39) Waas E, Wobbes T, Lomme R, De Groot J, Ruers T, Hendriks T. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. *Brit. J. Surg.* 2003, 90 : 1556-1564
- 40) Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Kontinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* 1996, 23(12):1127-1132

- 41) Uitto V, Soumalainen K, Sorsa T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J. Periodontal Res.* 1990, 25: 195-242
- 42) Sorsa T, Ding Y, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J. Clin. Periodontol.* 1995, 22: 709-717
- 43) Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J. Dent. Res.* 1994, Aug;73(8):1397-1406
- 44) Wu A, Lafrenie R, Park C, Apinhasmit W, Chen Z, Birkedal-Hansen H, Yamada K, Stetler-Stevenson W, Baum B. Modulation of MMP-2 (Gelatinase A) and MMP-9 (Gelatinase B) by Interferon- γ in a Human Salivary Gland Cell Line. *J. Cell. Physiol.* 1997, 171: 117-124
- 45) Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Ronka H, Konttinen YT, Koivisto AM, Uusitupa M. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Periodontal Res.* 2000, Oct;35(5):259-265
- 46) Komatsu T, Kubota E, Sakai N. Enhancement of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activity in gingival tissue and cultured fibroblast from Down's syndrome patients. *Oral Dis.* 2001, 7: 47-55

- 47) Mellanen L, Salo T, Ingman T, Konttinen YT, La hdevirta J, Sorsa T. 72-kDa and 92-kDa gelatinases in saliva of patients with human immunodeficiency virus infection. *Acta Odontol. Scand.* 1998, 56:135±142
- 48) Sorsa T, Suomalainen K, Uitto V. The role of ginival crevicular fluid and salivary collagenases in human periodontal diseases. *Arch. Oral Biol.* 1990, 35: 193-196
- 49) Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J. Dent. Res.* 2001, 80:1545-1549
- 50) Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J. Dent. Res.* 1998, 77: 1622-1629
- 51) Westerlund U, Ingman T, Lukinmaa P, Salo T, Kjeldsen L, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J. Dent. Res.* 1996, 75: 1553-1563
- 52) Asatsuma M, Ito S, Watanabe M, Takeishi H, Nomura S, Wada Y, Nakano M, Gejyo F, Igarashi A. Increase in the ratio of metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in saliva from patients with primary Sjögren' syndrome. *Clin. Chim. Acta.* 2004, 345:99-104

- 53) Benjavongkulchai B, Caterina N, Birkedal-Hansen, Fox P. Matrix metalloproteinases in parotid saliva of primary Sjögren Syndrome patients. *J. Dent. Res.* 1997, 76: 274
- 54) Hanemaaijer R, Visser H, Konttinen YT, Koolwijk P, Verheijen JH. A novel and simple immunocapture assay for determination of gelatinase-B (MMP-9) activities in biological fluids: saliva from patients with Sjogren's syndrome contains increased latent and active gelatinase-B levels. *Matrix Biol.* 1998 Dec;17(8-9):657-665
- 55) Konttinen Y., Halinen S., Hanemaaijer R., Sorsa T, Hietanen J., Ceponis A., Xu J.,Manthorpe R., Whittington J., Larson A., Salo T., Kjeldsen L., Stenman U., Eisen A. Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 Type IV Collagenase/Gelatinase Implicated in the pathogenesis of Sjögren's Syndrome. *Matrix Biol.* 1998, 17: 335-347
- 56) Vuotila T, Ylikontiola L, Sorsa T, Luoto H, Hanemaaijer R, Salo T, Tjaderhane L. The relationship between MMPs and pH in whole saliva of radiated head and neck cancer patients. *J. Oral Pathol. Med.* 2002, Jul; 31(6):329-338
- 57) Kaufman E., Lamster I.B. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002; 13(2):197-212. Review.

- 58) Streckfus C.F., Bigler L.R. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis.* 2002; 8(2):69-76. Review.
- 59) Morales I., Domínguez P., López R.O. Dispositivos para colección de saliva de las glándulas salivales mayores. Resultados en sujetos normales. *Rev. Med. Chil.* 1998, 126(5):538-547.
- 60) Bramhall S., Noack N., Wu M., Loewenberg J.R. A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal. Biochem.* 1969; 31, 146-148.
- 61) Durham J.P., López-Solís R. Effect of sodium hydroxyde upon protein binding to filter paper disks and its significance in the determination of protein in colorimetric and radioisotopic assays. *Anal. Biochem.* 1979; 100, 98-99.
- 62) Durham J.P., Gillies D., Bexter A., López-Solís R. The application of a simple, sensitive disc assay for sialyltransferase activity to particulate and soluble enzyme-preparation and its use in measuring enzymatic activity in human plasma samples. *Clin. Chim. Acta.* 1970; 95. 425-432.
- 63) Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227, 680-685.
- 64) Shkalim V, Monselise Y, Mosseri R, Finkelstein Y, Garty BZ. Recurrent parotitis in selective IgA deficiency. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2004, 15(3):281-3.

- 65) Fazekas T, Wiesbauer P, Schroth B, Potschger U, Gadner H, Heitger A.
Selective IgA deficiency in children with recurrent parotitis of childhood.
Pediatr. Infect. Dis. J. 2005, 24(5):461-2.