



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

**“IDENTIFICACIÓN DE FORMAS MOLECULARES DE MMP-9 EN SALIVA
PAROTÍDEA DE PACIENTES AFECTADOS POR PAROTIDITIS CRÓNICA
RECURRENTE INFANTIL”.**

GUSTAVO VALVERDE MORENO

**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
2010**

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a la Dra. Irene Morales Bozo, por su acogida, paciencia, buena disposición, pero sobre todo por motivarme a realizar este trabajo de investigación aun cuando las cosas no resultaban. Su alegría y dedicación a la investigación me sirvieron de ejemplo, y fueron el principal pilar para sacar este trabajo adelante.

A la Prof. Dra. Blanca Urzúa Orellana, por su simpatía y ayuda en el laboratorio, y a la Dra. Mirtha Landaeta, por la toma de muestras salivales que fueron utilizadas en este trabajo.

A mi familia, por ayudarme y apoyarme durante toda mi vida, y en forma especial a mi padre, por brindarme todas las oportunidades para estudiar, ser mejor persona y por enseñarme a valorar las cosas que nos da la vida.

A Milena, por su compañía a lo largo de todo este proceso universitario, por su amor y apoyo incondicional.

A mis amigos, que con su simpatía y compañía ayudaron a que este proceso fuera más ameno.

A todos los que de alguna manera ayudaron a que este trabajo saliera adelante, incluyendo compañeros, docentes y funcionarios.

Este trabajo se encuentra adscrito a proyecto DI-MULT 06/14-2.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	4
Hipótesis	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Materiales y métodos	14
Resultados	18
Discusión	24
Conclusiones	29
Sugerencias	30
Bibliografía	31

RESUMEN

La Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI) es una inflamación recurrente y dolorosa, de etiología desconocida. Generalmente, se inicia alrededor de los 2 años de edad y se mantiene hasta la adolescencia. Estudios anteriores han demostrado, mediante zimografía, la presencia de metaloproteasas 2 y 9 en la saliva parotídea de pacientes con PCRI. En este estudio se propuso analizar, mediante zimografía, la actividad gelatinasa en saliva parotídea de dichos pacientes e identificar, mediante inmuno-western-blot, las formas moleculares de metaloproteasa 9.

En 34 pacientes con PCRI de 4 a 13 años de edad, se recolectó saliva parotídea bilateral, se midió concentración de proteínas mediante el método de Bramhall, para posteriormente determinar la actividad gelatinasa mediante zimografía. Se registró el compromiso clínico-sialográfico de ambas glándulas parótidas y se les correlacionó con la actividad enzimática de las gelatinasas en cuestión. Además se realizó inmuno-western-blot con anticuerpo antiMMP-9 y se comparó la frecuencia de las distintas formas moleculares de metaloproteasa 9 en saliva proveniente de parótidas clínicamente afectadas y clínicamente sanas.

La saliva parotídea de pacientes con PCRI presentó actividad gelatinasa en ambas glándulas, independiente de si están o no afectadas clínicamente. Sólo se observó diferencia estadísticamente significativa en la actividad enzimática de la metaloproteasa de 141kDa, donde hubo una mayor actividad en glándulas clínicamente afectadas.

La saliva de individuos con PCRI no presentó un patrón uniforme de formas moleculares de MMP-9. La frecuencia de las formas moleculares de las MMP-9 analizadas en saliva parotídea de pacientes PCRI, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre aquellas muestras tomadas de glándulas clínicamente sanas y clínicamente afectadas, salvo en las formas moleculares de 169kDa y 139kDa, que fueron más frecuentes en saliva proveniente de glándulas comprometidas clínicamente.

INTRODUCCIÓN

La Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI) es una enfermedad de etiología desconocida, caracterizada por la inflamación recurrente de una o ambas glándulas parótidas. Afecta por lo general a niños desde la infancia temprana hasta la adolescencia, donde sin causa aparente tiende a remitir. La inflamación glandular se manifiesta como un aumento de volumen doloroso que puede durar días, semanas o meses, presentando recurrencias en forma imprevista sin una frecuencia determinada, lo que compromete la calidad de vida del paciente (1).

La falta de conocimiento de los factores causales y de la fisiopatología de la PCRI, determina que no exista consenso sobre su manejo terapéutico. Los pacientes son atendidos por diversos especialistas con tratamientos que se prolongan por toda su infancia y adolescencia, atenuando los signos y síntomas pero sin remediar la enfermedad. En Chile los Centros de Referencia para esta patología se han desarrollado espontáneamente en hospitales públicos. De esta forma, los pacientes no sólo no encuentran solución a su problema de salud, sino que deben acudir recurrentemente a lugares de atención distantes a su domicilio y que se encuentran altamente solicitados. Además los centros de atención se ven en la necesidad de gastar recursos materiales y humanos en maniobras poco eficaces.

Para su diagnóstico se realiza un examen clínico, el cual es confirmado mediante la sialografía. La sialografía como examen complementario y, a pesar de su carácter invasivo, es el método utilizado con mayor frecuencia (1; 2). La biopsia parotídea se encuentra restringida a casos extremos dada la proximidad anatómica del nervio facial, lo que hace que no sea posible analizar directamente el tejido glandular. Además existen otros métodos imagenológicos que aportan al diagnóstico y seguimiento pero que no se utilizan de rutina debido a su alto costo, como es el caso de la ultrasonografía.

Por lo dicho anteriormente, el análisis molecular de la saliva como producto de secreción glandular adquiere relevancia en esta patología, por la poca invasividad del método de obtención de las muestras. El uso de la saliva, como

fluido diagnóstico de enfermedades bucales o sistémicas, es un área activa en investigación ya que la composición molecular salival es un reflejo del estado de funcionamiento de la glándula que la sintetiza. El análisis en saliva de moléculas asociadas a la evolución de la patología, junto con describir el mecanismo fisiopatológico de esta enfermedad, permitiría postular estrategias terapéuticas alternativas relacionadas con el tipo de daño existente, más eficaces, con menor tiempo de duración y menor costo que las actuales.

En un estudio reciente realizado en el laboratorio de Biología y Bioquímica Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en el que se abordó el análisis molecular de la saliva parotídea de pacientes con PCRI, se describió alteraciones en la composición salival en relación a sujetos controles sanos. Se analizó mediante zimografía la frecuencia de individuos que presentan actividad Metaloproteasa 2 (MMP-2) y Metaloproteasa 9 (MMP-9) en su saliva parotídea. Los resultados indican que sólo 2 sujetos controles presentaron estas enzimas en su saliva y en contraste, 18 pacientes con PCRI presentaron actividad MMP-9 y 10 pacientes presentaron actividad MMP-2. Este constituye el primer informe sobre la presencia de metaloproteasas en saliva de pacientes con PCRI (3)

El presente trabajo propone aportar mayor conocimiento sobre las moléculas asociadas al mecanismo fisiopatológico de esta patología, identificando mediante inmuno-western-blot la frecuencia de formas moleculares de MMP- 9, y mediante zimografía la actividad enzimática de esta metaloproteasas presente en la saliva parotídea de los pacientes con PCRI.

MARCO TEÓRICO

La parotiditis crónica recurrente infantil (PCRI) es una enfermedad de etiología desconocida, definida como una inflamación parotídea asociada a una sialectasia no obstructiva glandular. Se caracteriza por presentar episodios recurrentes de parotidomegalia inflamatoria dolorosa, que duran días, semanas o meses, acompañados usualmente por compromiso del estado general del paciente. Se alterna con intervalos de remisión, en los que la glándula se observa clínicamente asintomática (1; 2). El número de recurrencias es variable e impredecible en cada individuo, se inicia entre los 3 y 6 años de edad y se mantiene hasta la adolescencia, comprometiendo significativamente la calidad de vida del individuo. Sólo algunos casos requieren hospitalización por la magnitud del compromiso del estado general. En general, la mayoría de episodios de agudización de PCRI están asociados a patologías respiratorias como resfrió, amigdalitis, neumonitis y bronquitis (4; 5)

La distribución por géneros de esta patología es similar para ambos sexos, y su manifestación es preferentemente unilateral. Si se manifiesta bilateralmente, afectará predominantemente a una de las glándulas. El aumento de volumen glandular es marcadamente doloroso, pudiendo existir compromiso de la piel de la zona con enrojecimiento local. Después de la pubertad los síntomas se atenúan pudiendo desaparecer por completo sin causa aparente, aunque en algunos casos ésta persiste hasta la edad adulta (1; 2; 6).

La mayoría de los estudios sobre PCRI describen una disminución del flujo salival parotídeo acompañado de cambios en el aspecto macroscópico de la saliva, como aumento de la viscosidad salival o la presencia de un material particulado blanquecino en la secreción (2). Otros autores diferencian entre saliva mucosa, purulenta y globosa, señalando como más frecuente al primero de estos tipos (4), (Figura 1). También la han descrito como una secreción turbia o purulenta (7). En la mayoría de estos estudios se describe que a pesar de la fiebre y malestar general, la presencia de pus emanada por el conducto de stenson es poco frecuente, produciéndose por poco tiempo y en baja cantidad (1; 2; 8; 9).

Baurmash y cols. Señalan que después del episodio de inflamación aguda glandular la saliva se vuelve clara y libre de material particulado, pero en menor cantidad que el lado no afectado del paciente (2).



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

La etiología concreta de la PCRI es desconocida, pero se han propuesto posibles factores causales como: malformaciones ductales, factores genéticos, inmunodeficiencias, procesos alérgicos, autoinmunes e infecciosos, entre otros (1; 2; 4; 5; 6; 10; 11; 12). Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha podido ser demostrada.

Se han realizado diversos estudios intentando determinar la causa de la PCRI, como por ejemplo estudios microscópicos de tejido glandular, pero estos son escasos ya que la biopsia de la glándula sólo se indica en casos que el beneficio sea mayor que el costo, por la proximidad del nervio facial y el riesgo de dañarlo. Los estudios histopatológicos existentes indican que existe un infiltrado linfocitario que tiende a formar folículos linfoides alrededor de ductos interlobulares dilatados (sialectasia). El epitelio ductal muestra hiperplasia y metaplasia con un patrón cilíndrico pseudoestratificado (8; 13; 14). También se han realizado estudios microbiológicos de la saliva parotídea en individuos con PCRI, excluyendo la presencia de los principales virus respiratorios y del virus parotidis, descartándolos de esta manera como posibles agentes causales (5). Estudios Bacteriológicos reportan la presencia de una flora mixta de cocos Gram positivos, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus Viridans* y/o *Moraxella Catarrhalis* en el 80% de los casos estudiados (9; 15). Sin embargo existen razones que impiden aseverar un origen infeccioso de esta enfermedad con estos agentes causales, entre las cuales encontramos que el proceso glandular es principalmente de tipo inflamatorio, el compromiso del estado general

es moderado, la mayoría de los casos son unilaterales y hay un número de casos en que los cultivos bacterianos arrojan resultados negativos.

El diagnóstico de PCRI se basa en la historia clínica y se confirma con sialografía, examen que permitiría seguir la evolución del estado glandular (1; 13). La sialografía es considerada como el método más importante y confiable para el diagnóstico de PCRI (16). Esta consiste en la inyección de un medio de contraste yodado a través del conducto de Stenon, para observar en una imagen radiográfica los conductos glandulares, evidenciando las dilataciones de los ductos en lo que se define como “ciruelo en flor” (Figuras 2 y 3). Existiría una relación entre el tipo de sialectasia observada en el sialograma y el compromiso glandular. Así, en un principio la sialectasia sería del tipo punteado, para presentarse como globular a cavitario en el estado más avanzado y degenerativo de la glándula (1; 2; 17; 18; 19). Después de múltiples recurrencias, se produciría un efecto destructivo permanente de la glándula observable en la sialografía. En estos pacientes existiría una tendencia a hacer cuadros más prolongados y más frecuentes que en los individuos con menor daño glandular acumulado (2). Cuando la enfermedad se atenúa, los cambios sialográficos tenderían a disminuir pudiendo llegar a desaparecer cuando la enfermedad se hace inactiva (1). Otro estudio reporta que existirían en el sialograma evidencias de una recuperación del sistema ductal secundario y terciario de la glándula en 15 pacientes una vez resuelto el cuadro clínico, aunque en 9 pacientes se mantiene la imagen alterada a pesar de no presentar evidencias clínicas (4). También se ha descrito que la sialografía tiene efectos benéficos, en términos de mejorar los síntomas y reducir la frecuencia de las recurrencias (8; 16).



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



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

Se ha utilizado la ultrasonografía (US) 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 representarían sialectasias e infiltración linfocitaria (1; 7; 13). Los estudios clínicos establecen una correlación entre ambos exámenes complementarios (13; 17; 20; 21) pero aún se depende de la sialografía para corroborar el diagnóstico. Algunos reportes señalan que la US sería más sensible en la detección del compromiso glandular, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de la PCRI (13). Sin embargo en nuestro país existen pocos especialistas expertos en la realización e interpretación de este examen y los servicios públicos donde se realiza, se encuentran sobrepasados por la demanda.

No existe consenso sobre el manejo terapéutico de PCRI, distintos especialistas indican variadas terapias para una misma entidad patológica. En algunos casos se ha usado maniobras físicas como calor local, masajes glandulares, etc. (10), en otros, se indican antiinflamatorios no esteroidales (AINES) (10; 22), además de combinaciones de antihistamínicos, lisozima y antibióticos (15). Sustentados en los resultados obtenidos con el uso de mucolíticos en patologías como el Síndrome de Sjögren y Xeroftalmia, en el Servicio de Cirugía del Hospital Roberto del Río se plantea el uso de bromhexina para el tratamiento de esta enfermedad (4mg cada 8 horas para tratar recurrencias) (22). Basados en la observación de que en un número importante de pacientes se produce la desaparición de los síntomas de la fase aguda con la sialografía (1; 15) 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 con un antiséptico yodado (4) (Figura 4). Otro estudio propugna el tratamiento por medio de la inyección de hidrocortisona intraglandular bajo anestesia general (23). También se propone la intervención glandular a través de un sialendoscopio por el cual se realiza un lavado, la dilatación ductal e inyección de hidrocortisona (8). En casos con daño glandular severo e irreversible como resultado de episodios agudos de larga duración, se busca la atrofia glandular mediante la ligazón del conducto excretor (2). Como último recurso y sólo en casos severos, en los que las demás medidas terapéuticas son inútiles, se realiza la parotidectomía parcial o total (2; 24), existiendo casos extremos de parotidectomía bilateral en niños de 11 años de edad (24), técnica que tiene un alto riesgo de dañar el nervio facial.



Figura 4: Lavado intraglandular vía conducto de Stenon con antiséptico yodado (Reliev®), de 0,7 a 1 ml de antiséptico 1 vez al mes.

A pesar de que el proceso patológico en la PCRI es de carácter eminentemente inflamatorio, en la mayoría de los reportes se indica que los esquemas terapéuticos se combinan con antibioterapia sistémica (1; 4; 7; 8; 15; 23), con el riesgo de generar resistencia microbiana, por el uso recurrente de estos fármacos para tratar una enfermedad en la que no se tienen evidencias acerca de su origen bacteriano.

La mayoría de los estudios reporta un porcentaje de éxito variable, pero ninguno de los tratamientos propuestos ha podido evitar o prevenir totalmente las recurrencias. La tendencia general es enfocar el tratamiento al alivio de los síntomas, la disminución del período de actividad y prolongación del período de quiescencia, la prevención del compromiso grave del estado general y a evitar, de la mejor manera posible, el daño del parénquima glandular producido por la inflamación recurrente (1; 2; 7; 8; 22).

La contraindicación de biopsia glandular en esta enfermedad, ha dificultado la obtención de información acerca del estado del tejido afectado por PCRI. Desde esta perspectiva, el análisis molecular del producto de secreción glandular ha llegado a establecerse como mecanismo no invasivo, alternativo al estudio histológico de la glándula, en una serie de alteraciones inflamatorias que afectan a las glándulas salivales.

La mayoría de los estudios sobre PCRI concuerdan en describir alteraciones de la calidad de la saliva parotídea en esta patología (1; 2; 4; 7), sin embargo los estudios que analizan su composición química son escasos, se han realizado en un número reducido de individuos y analizan la presencia de algunas proteínas particulares. En ellos se reporta que la saliva parotídea de pacientes con PCRI presenta mayores concentraciones de albúmina, lactoferrina, calicreina e IgA, en relación a sujetos controles (25; 26). Además de estas proteínas, en una serie de patologías inflamatorias que afectan a glándulas salivales, se ha podido detectar en la composición de la saliva la presencia de macromoléculas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular, como son las metaloproteasas (MMPs) y los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), permitiendo obtener información en relación al proceso patológico de la glándula afectada (27; 28; 29).

Las MMPs conforman una familia de 26 endopeptidasas dependientes de iones calcio y zinc, encargadas de la remodelación de la matriz extracelular en condiciones normales y patológicas (30). Su expresión es regulada por factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y componentes de la matriz extracelular (31). Estas enzimas son sintetizadas inicialmente como zimógenos (proMMP o forma latente) y requieren de la hidrólisis proteolítica de un propéptido en el espacio extracelular, para exponer su sitio catalítico (MMP o forma activada) (32). Las gelatinasas A (MMP-2) y B (MMP-9) han sido involucradas en una amplia variedad de condiciones patológicas del adulto como el Síndrome de Sjögren, diabetes mellitus, periodontitis, entre otras (29; 33; 34). Adicionalmente, también han sido estudiadas en patologías inflamatorias propias de la infancia como en la otitis crónica media con efusión y en niños con enfermedades crónicas del pulmón (35; 36). Ambas gelatinasas han sido detectadas en una amplia variedad de fluidos como líquido cefalorraquídeo, secreción traqueal, secreción del oído medio, fluido

gingival, plasma y saliva (27; 33; 35; 36; 37; 38; 39).

Con la excepción del estudio de Wu (27), casi la totalidad de los estudios determinan los niveles de las metaloproteasas en saliva total. Se debe considerar que la saliva total es una mezcla compleja de fluidos a la que también confluye el fluido crevicular gingival, células descamadas de la mucosa bucal, flora microbiana y restos alimenticios. En este fluido se ha descrito la presencia de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2 en condiciones de normalidad gingival y en enfermedad periodontal (33). De esta forma, se desconoce cuál es el origen de estas moléculas presentes en saliva total. En un intento por dilucidar este problema, Makela (40) analiza en forma independiente muestras de saliva parotídea, saliva submandibular/sublingual, saliva total y fluido crevicular gingival de 17 controles sanos. Sus resultados indican que la saliva total y el fluido crevicular presentaron niveles similares de MMP-9, detectándose sólo trazas en las salivas glandulares. Collin (34) reporta que la actividad MMP-9 en saliva total de individuos desdentados, es decir sin fluido crevicular gingival, era significativamente menor que la de sujetos dentados. Ambos resultados sugieren que MMP-9 salival sería principalmente aportada por el periodonto.

Estudios realizados sobre cortes de tejido sano de glándula parótida y submandibular indican que MMP-2, MMP-9 se encontrarían principalmente en el sistema ductal y ausente del sistema acinar (41; 42; 43). Estudios similares en glándula salival labial, describen la presencia de MMP2 y MMP-9 en las células ductales y en la región basal de las células acinares (44; 45). Estos resultados sugerirían que estas moléculas no serían liberadas desde la glándula a la cavidad bucal en condiciones de normalidad. Teniendo en cuenta toda la evidencia analizada, se deduce que para la identificación en saliva de moléculas provenientes de la glándula parótida, se debe analizar la secreción parotídea y que se deben extremar los cuidados para recolectar este material libre de contaminación con otro fluido bucal.

En un estudio reciente realizado en el laboratorio de Biología y Bioquímica Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en el que se abordó el análisis molecular de la saliva parotídea de pacientes con PCRI (n = 33), *Morales et al.* describió alteraciones en la composición salival en relación a sujetos controles sanos (n = 33). Para la recolección de saliva parotídea en forma aislada,

sin contaminación con otros fluidos bucales, se diseñó previamente un dispositivo (snail collector), termoformado, desechable, que permite recolectar saliva parotídea de alta pureza (46; 47; 48) y que permite utilizarse en un número alto de individuos con un relativo bajo costo. La saliva de los sujetos enfermos presentó alteraciones en la concentración de proteínas, en los modos de difusión de sus proteínas salivales y en los bandeos polipeptídicos, al contrastarla con la saliva del grupo control. Además se analizó la frecuencia de individuos que presentan actividad MMP-2 y MMP-9 en su saliva parotídea. Los resultados indican que sólo 2 sujetos controles presentaron estas enzimas en su saliva y en contraste, 18 pacientes con PCRI presentaron actividad MMP-9 y 10 pacientes presentaron actividad MMP-2. Este constituye el primer informe sobre la presencia de metaloproteasas en saliva de pacientes con PCRI (3). Otro estudio reportado por los mismos investigadores indica que existe una asociación entre la presencia de MMPs 2 y 9 en la saliva de pacientes con PCRI y el grado de compromiso sialográfico de la glándula parótida afectada. En conjunto esta evidencia nos permite suponer que estas gelatinasas pudiesen estar involucradas en el mecanismo de daño de la glándula parótida en la PCRI (49).

Tanto la MMP-2 y la MMP-9 son secretadas por las células como monómeros y en distintas formas diméricas. Las MMP-9 pueden formar homodímeros (dos moléculas de MMP-9 unidas entre sí) y heterodímeros (unidas a otras proteínas). Las distintas especies moleculares de MMP-9 tienen propiedades bioquímicas y enzimáticas diferentes (50). Es así como se han descrito el homodímero MMP-9/MMP-9, la unión MMP-9/TIMP (su inhibidor), heterodímeros MMP-9/MMP1, MMP-9/NGAL (Lipocalina de neutrófilo asociada a gelatinasa), MMP-9/Haptoglobulina, y la unión de MMP-9 con variados proteoglicanos y glicoproteínas. Especial atención sugiere la unión de MMP-9/NGAL. En neutrófilos humanos se produce este complejo dimérico covalente, sensible a la reducción, de aproximadamente 125-130 kDa. El heterodímero proMMP-9/NGAL puede atar al inhibidor TIMP-1, además de mejorar la activación de la enzima por la calicreína plasmática y $HgCl_2$, protegiendo a la MMP-9 de la degradación, rompiendo así el equilibrio entre su síntesis y su degradación (51; 52; 53). En otras palabras, la actividad de MMP-9 se vería estabilizada por la presencia de NGAL (50). En placas ateroscleróticas la NGAL podría promover

una actividad proteolítica prolongada y aumentada, provocando una desestabilización de la malla colágena haciendo más susceptibles las placas a la erosión y ruptura con una subsecuente trombosis e infarto (54). También se ha visto una relación entre la actividad de este complejo y la profundidad de la invasión tumoral (55), y se ha encontrado también en fluido sinovial de pacientes con osteoartritis. NGAL o lipocalina 2 (25 kDa) es una proteína de unión con alta afinidad a sideroforos bacterianos; constituye un componente del sistema inmune innato frente a infecciones bacterianas en tejidos expuestos al medio ambiente externo (tracto respiratorio, gastrointestinal y urinario) y su expresión se eleva cuando estos tejidos se encuentran infectados o inflamados (56). Un estudio realizado en glándula submandibular de 10 pacientes con sialadenitis crónica, indica que NGAL se sobreexpresa en el infiltrado inflamatorio y en las células ductales de la glándula, en relación al tejido glandular de individuos controles (57). Otro estudio realizado en glándula salival labial de individuos con polineuropatía amiloidea, establece que existe una sobreexpresión de los mRNA de NGAL y una sobreexpresión de la forma de 130 kDa de MMP-9, en relación a individuos controles (58). A la fecha, no existen estudios sobre la presencia de NGAL o complejos MMP-9 con otras moléculas en glándula parótida o en la saliva producida por ella en condiciones de normalidad o patológica.

En este trabajo se propone identificar los distintos complejos moleculares de la MMP-9 existentes en saliva de pacientes con PCRI, buscando información adicional para entender el mecanismo fisiopatológico involucrado en la destrucción de la glándula parótida.

HIPÓTESIS

La saliva parotídea producida por glándulas clínicamente afectadas en pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil, presenta con mayor frecuencia formas de MMP-9 de distinto peso molecular a las formas activa de 92 kDa y latente de 82 kDa que la saliva producida por glándulas no afectadas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el aumento en la frecuencia de las formas moleculares de MMP-9 de distinto peso molecular a las formas activas y latentes, en la saliva parotídea de glándulas clínicamente afectadas de pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar la actividad gelatinasa en pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil en la saliva producida por glándulas parótidas afectadas y no afectadas clínicamente por la enfermedad.
- b. Identificar en pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil, formas de MMP-9 de bajo y alto peso molecular en la saliva producida por glándulas parótidas afectadas y no afectadas clínicamente por la enfermedad.
- c. Determinar en pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil, la frecuencia de las formas moleculares de MMP-9 en la saliva producida por glándulas parótidas afectadas y no afectadas clínicamente por la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos:

Se conformó 1 grupo compuesto por 34 pacientes de entre 4 y 14 años de edad, de ambos géneros, con diagnóstico de PCRI 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) imagen sialográfica parotídea compatible con diagnóstico de PCRI; c) ausencia de enfermedades sistémicas.

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

Recolección de saliva:

En todos los individuos incluidos en el estudio se recolectó 1 ml de saliva parotídea, derecha e izquierda, según procedimientos descritos por Morales y cols. (48) (Figura 5). La recolección fue realizada por un único operador calibrado para esta maniobra. La saliva se recolectó bajo estimulación lingual con ácido cítrico al 2% (p/v). Las muestras de saliva fueron mantenidas en recipientes inmersos en hielo y trasladadas al laboratorio para su almacenamiento a -20 grados C, hasta su análisis. Para cada muestra se registró si esta provenía de una parótida sana o comprometida según diagnóstico clínico-sialográfico.

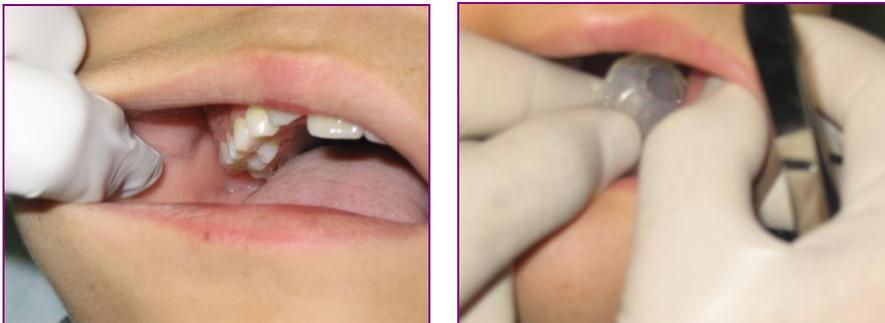


Figura 5: Inspección y Recolección de muestra vía conducto parotídeo (42).

Concentración de proteínas:

Se aplicó el método de Bramhall (59) en forma de micrométodo y con adaptaciones descritas previamente (60; 61). Brevemente, alícuotas de 40 μ l de saliva y de un estándar de seroalbúmina bovina (10-50 μ g) se depositaron 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 minutos a 60 grados $^{\circ}$ C y lavados exhaustivamente en ácido acético 7% hasta background claro. Luego se enjuagaron 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 para determinar su absorbancia. Se creó una curva de calibración en base al estándar para determinar la concentración de proteína de las muestras.

Zimografía:

Las muestras de saliva fueron mezcladas con buffer de muestra en condiciones no denurantes y separadas electroforéticamente a un voltaje constante de 125 V, en un gel de poliacrilamida-SDS (10%) de acuerdo al procedimiento estandarizado de Laemmli (62) con la excepción 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 buffer de activación (Tris HCL pH 7,5 10 mM, Triton x100 1,25%, CaCl_2 5 mM, ZnCl_2 1 μ M) toda la noche a 37^a C.

Luego los geles fueron teñidos con Coomassie blue por 6 horas y desteñidos en una solución metanol 10%, ácido acético 15%(v/v) hasta evidenciar las bandas claramente. Los geles fueron calibrados utilizando una mezcla de proteínas estándares de peso molecular y estándar de MMP-2 y MMP-9.

Confirmación de la Actividad Metaloproteasa:

La actividad proteasa de un origen distinto al de metaloproteasa 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 en cisteína).

Posteriormente, la actividad metaloproteasa fue confirmada incubando las muestras de saliva con el inhibidor específico de metaloproteasa EDTA 5 mM. Adicionalmente, se contrastó la actividad metaloproteasa contra estándares de MMP2 y MMP9.

Determinación de la actividad enzimática de las Metaloproteasas:

Se obtuvo una imagen digital de cada gel tras la zimografía mediante fotografía con retroiluminación. Dicha imagen se trabajó en escala de grises y fue analizada con el software UNI-SCAN-IT gel® v4.1 (Silk Scientific Corp.) para determinar el número de píxeles en cada banda y realizar una curva de calibración con los estándares de metaloproteasa y así obtener la cantidad de enzima presente en cada una de ellas.

Inmuno-western-blot:

Las muestras de saliva fueron mezcladas con buffer de muestra en condiciones no denaturantes y separadas electroforéticamente a un voltaje constante inicial de 125 V por 10 minutos, y luego 150 V por una 1 hora aproximadamente, en un gel de poliacrilamida-SDS (10%) de acuerdo al procedimiento estandarizado de Laemmli (62). Las proteínas así separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (PIERCE, 0,45 μ m), utilizando un cassette de transferencia y buffer de transferencia 1x (Tris 248 mM, Glicina 1,92 mM), siguiendo el siguiente protocolo: (10 V por 10 min, 20 V por 10 min, 30 V por 10 min, 40 V por 10 min, 50 V por 50 min). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por una hora en amortiguador TBS-T (Tris-HCL 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM y Tween 20 al 0,1%) con leche descremada al 5%, y se realizaron 4 lavados con TBS-T por 15 minutos. Luego se incubaron con un anticuerpo primario antiMMP-9 (R&D systems) en una concentración 1:250 en TBS-T toda la noche. A la mañana siguiente fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario (GAMPO, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) en una concentración de 1:10.000 en TBS-T por 1 hora. A continuación se realizaron

nuevamente 4 lavados en TBS-T de 15 minutos cada uno y se identificó la reacción positiva utilizando el método de quimioluminiscencia (SuperWest Femto, Pierce Biotechnology, Rockford, USA). En un cuarto oscuro se expusieron a películas radiográficas (Kodak) y se revelaron utilizando los líquidos respectivos.

Determinación de la frecuencia de formas moleculares de MMP-9:

En las películas radiográficas, se determinó el tamaño molecular de las bandas radiopacas correspondientes a Metaloproteasa 9, mediante la movilidad relativa de estas enzimas, contrastándola con la de proteínas estándares de tamaño molecular. Se determinó la frecuencia de estas formas moleculares en la totalidad de las muestras analizadas, registrando si estas provenían de glándulas sanas o comprometidas.

Análisis estadístico:

En las muestras provenientes tanto de parótidas afectadas clínicamente y no comprometidas por la enfermedad, se determinó la actividad enzimática expresada en: a) nanogramos de enzima por microgramos de proteína total en cada muestra; y b) nanogramos de enzima por microlitros de saliva. Se determinó la frecuencia de glándulas parótidas que presentaron bandas correspondientes a MMP-9 salival detectadas por inmuno-western-blot. El análisis estadístico se realizó aplicando el test de Wilcoxon y el test exacto de Fisher según correspondía. La significación estadística fue fijada en $p < 0,05$. Para todo esto se utilizó el programa estadístico STATA® 9.1.

RESULTADOS

De los 34 pacientes con PCRI (edad promedio: 10,7 años \pm 4,42), 16 presentaban un cuadro bilateral y 18 un cuadro unilateral, así se encontraron 18 glándulas parótidas sanas y 50 glándulas comprometidas según el diagnóstico clínico-sialográfico.

Concentración de Proteínas:

Se determinó la concentración de proteínas para la saliva de las glándulas derecha e izquierda de cada paciente. En el grupo de glándulas afectadas clínicamente por PCRI, el valor promedio de concentración de proteínas fue de $806,3 \pm 377,84$ mg/ml, donde el valor menor fue de 249,23 mg/ml y el mayor de 1761,21 mg/ml. En el grupo de glándulas no afectadas clínicamente, la concentración de proteínas promedio de las salivas parotídeas fue de $665,78 \pm 372,65$ mg/ml, donde el valor menor fue de 180 mg/ml y el mayor de 1471 mg/ml. (Tabla I)

Al comparar los valores promedio de concentración de proteínas de la saliva parotídea entre ambos grupo, se observó que las glándulas clínicamente afectadas por PCRI presentaron una mayor concentración de proteínas. Este resultado no fue significativo estadísticamente (Test de Wilcoxon, Mann-Whitney $p > 0,05$). (Tabla I)

TABLA I: Concentración de proteínas salivales de glándulas clínicamente afectadas por PCRI y glándulas clínicamente sanas.

Condición	Concentración de proteínas en saliva parotídea(mg/ml) Promedio ± D.E.	Rango de Concentraciones de proteínas en saliva parotídea (mg/ml)
Glándulas clínicamente afectadas por PCRI n = 50	806,3 ± 377,84*	249,23 – 1761,21
Glándulas clínicamente sanas n = 18	665,78 ± 372,65* * p = 0,137	180 – 1471

Concentración de proteínas obtenidas por el método de Bramhall (59).

D.E. = Desviación Estándar

*Test de Wilcoxon, Mann-Whitney

Determinación de la actividad enzimática de las Gelatinasas:

La actividad enzimática fue analizada a partir de las imágenes digitalizadas de los geles zimográficos y fue expresada en nanogramos de enzima por microgramos de proteína total y en nanogramos de enzima por microlitros de saliva. Todas las muestras presentaron al menos una banda con actividad gelatinasa, es decir, todos los pacientes con PCRI presentaron actividad metaloproteasa en su saliva proveniente tanto de la glándula parótida clínicamente comprometida como de la clínicamente sana. Se evidenciaron 4 tipos distintos de bandas correspondientes a actividad gelatinasa que se expresaban en las

muestras de saliva parotídea de los pacientes. Se determinó el peso molecular de estas bandas mediante la migración relativa comparada con el estándar de peso molecular. El peso promedio de los estándares de MMP's fue de 87,5kDa (ProMMP-9), 76kDa (MMP-9), 58,2kDa (ProMMP-2) y 53kDa (MMP-2). Las bandas de las muestras de saliva parotídea, en promedio pesaron 141kDa, 91kDa, 76kDa y 61kDa y se les denominó Gelatinasa de 141kDa, 91kDa, 76kDa y 61kDa respectivamente (Fig6).

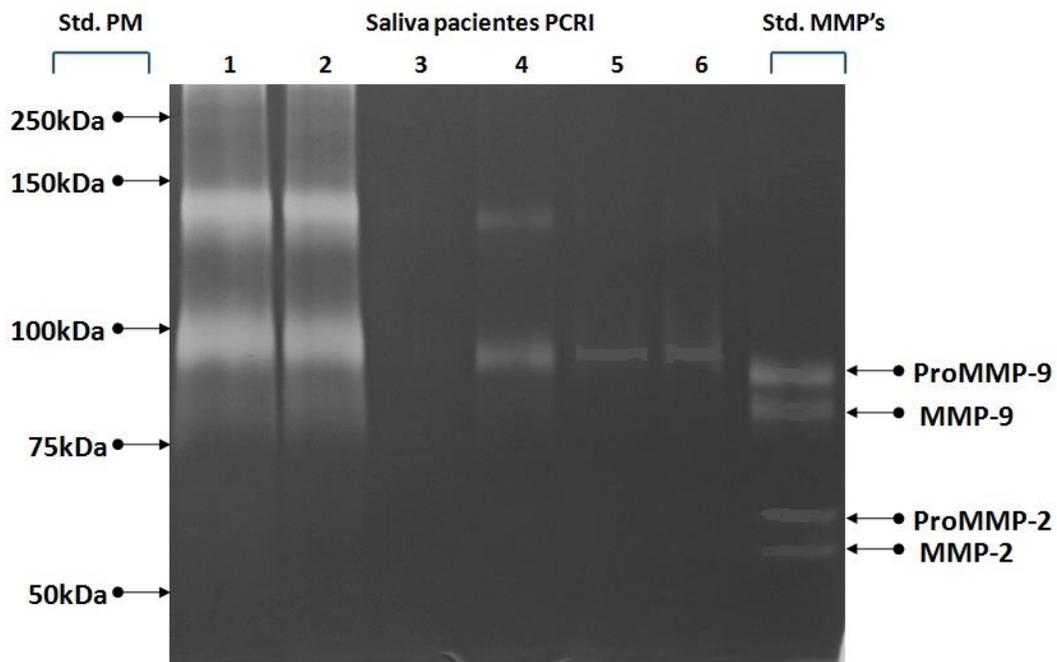


Figura 6: Ejemplo de zimografía que muestra las distintas bandas correspondientes a actividad gelatinasa que se encontraron en la saliva parotídea de glándulas clínicamente sanas y enfermas de pacientes con PCR-I. Carriles 1, 2 y 6: muestras de saliva de glándulas clínicamente afectadas. Carriles 3, 4 y 5: muestras de saliva de glándulas clínicamente sanas.

No hubo diferencia significativa entre la actividad enzimática de las glándulas sanas y las enfermas, a excepción de la concentración en nanogramos de enzima por microlitros de saliva de la Gelatinasa de 141kDa (Tabla II). A pesar de esto, se observó una mayor actividad enzimática en las glándulas enfermas de la Gelatinasa de 141kDa, 91kDa y 76kDa respecto de las glándulas sanas y sólo la Gelatinasa de 61kDa presentó menor actividad enzimática en la glándula enferma (Tabla II).

Tabla II: Actividad enzimática de las distintas gelatinasas en saliva parotídea de pacientes con PCRI en relación al compromiso clínico de la glándula.

	Gelatinasa							
	141kDa		91kDa		76kDa		61kDa	
	sana	PCRI	sana	PCRI	sana	PCRI	sana	PCRI
Nº	14	44	15	44	9	33	2	14
ng Enzima/ug Proteína Total	2,00 ± 1,41	5,75 ± 7,15	3,53 ± 3,11	7,7 ± 10,88	2,16 ± 1,19	3,23 ± 3,34	0,95 ± 0,1	0,93 ± 0,93
ng Enzima/ul Saliva	1,75 ± 2,37	9,20 ± 23,71*	3,03 ± 4,08	7,4 ± 12,76	2,05 ± 2,03	3,49 ± 5,29	0,47 ± 0,24	0,6 ± 0,57

*Significación estadística, test de Wilcoxon, Mann-Whitney (p= 0,037)

Determinación de la frecuencia de formas moleculares de MMP-9:

Tras el inmuno-western-blot, se evidenciaron 8 bandas de distintos tamaños moleculares correspondientes a MMP-9 que se expresaban en las muestras de saliva parotídea de los pacientes. Se determinó el peso molecular de estas bandas mediante la migración relativa comparada con el estándar de peso molecular. El peso promedio de los estándares de MMP's fue de 92kDa (ProMMP-9) y 82kDa (MMP-9). Las bandas correspondientes a MMP-9 en las muestras de saliva parotídea de los pacientes con PCRI no mostraron un patrón uniforme, y en promedio pesaron 169kDa, 139kDa, 108kDa, 94kDa, 81kDa, 60kDa, 44kDa y 29 kDa, y se les denominó por dicho peso promedio. (Fig7).

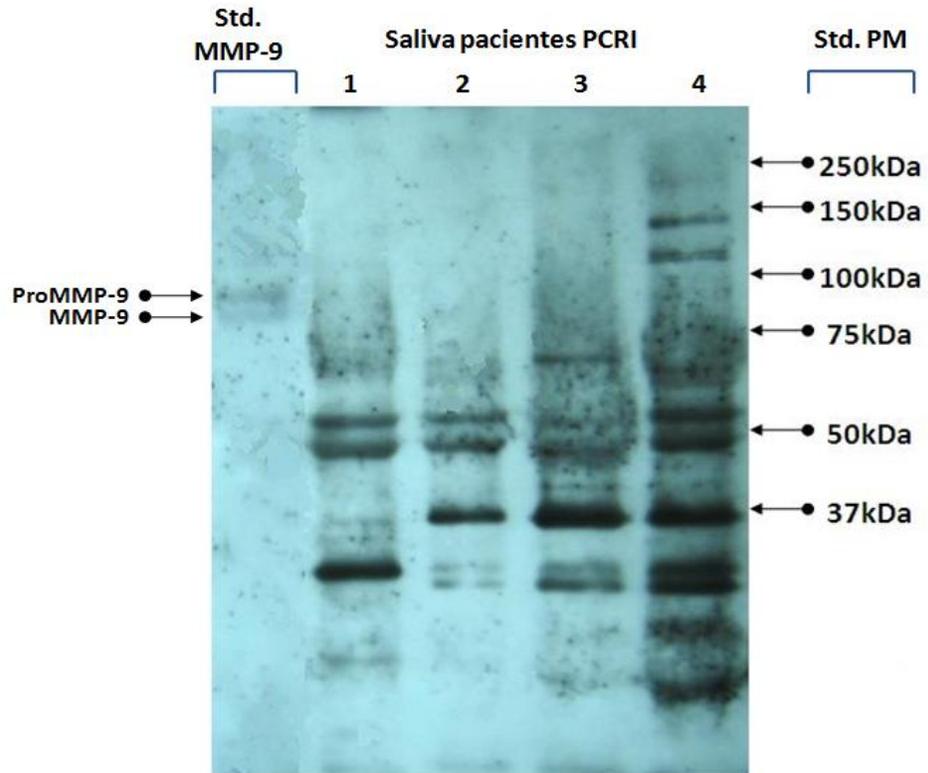


Figura 7: Ejemplo de Inmuno-western-blot que muestra los distintos patrones moleculares de MMP-9 que se encontraron en la saliva parotídea de glándulas clínicamente sanas y enfermas de pacientes con PCRI. Carriles 1 y 2, muestras de saliva de glándulas clínicamente sanas. Carriles 3 y 4, muestras de saliva de glándulas clínicamente afectadas.

Hubo diferencia estadísticamente significativa entre la frecuencia de las formas moleculares de 169kDa y 139kDa presentes en la saliva parotídea de las glándulas sanas versus las enfermas (Test exacto de Fisher, $p < 0.05$). En el resto de las formas moleculares no se encontró diferencia estadística (Tabla III).

TABLA III: Frecuencia de formas moleculares de MMP-9 en saliva parotídea de pacientes con PCRI en relación al compromiso clínico de la glándula.

Glándula	Forma molecular MMP-9															
	169kDa*		139kDa*		108kDa		94kDa		81kDa		60kDa		44kDa		29kDa	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Clínicamente sana	18	0	15	3	15	3	12	6	16	2	7	11	9	9	3	15
PCRI	41	9	29	21	37	13	26	24	38	12	14	36	19	31	10	40
Total	59	9	44	24	52	16	38	30	54	14	21	47	28	40	13	55

- ausente en la glándula, + presente en la glándula

*Significación estadística encontrada por test exacto de Fisher en formas moleculares de 169 y 139kDa ($p= 0,049$ y $p= 0,047$ respectivamente).

DISCUSIÓN

La PCRI es una enfermedad con posibles factores causales como malformaciones ductales congénitas, factores genéticos, alergias, manifestaciones locales de enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, infecciones bacterianas, etc. Sin embargo a ninguno de estos se les ha podido atribuir un rol causal en la etiopatogenia de esta enfermedad, por lo cual su etiología sigue siendo desconocida

El análisis molecular de la saliva parotídea en pacientes con PCRI cobra importancia por la dificultad de realizar estudios histopatológicos. La biopsia de la glándula parótida se encuentra limitada a casos estrictamente necesarios por la proximidad de ésta con el nervio facial. Es por eso que en el último tiempo se han desarrollado diversos estudios bioquímicos de la saliva de pacientes con PCRI, permitiendo evaluar de una forma no invasiva la función glandular para intentar comprender mejor el mecanismo de la enfermedad. Por lo mismo, los resultados a nivel molecular obtenidos en este estudio no pueden ser contrastados con análisis histológicos, y se imposibilita aun más si se considera que no estaría indicado tomar biopsia de la glándula asintomática.

En este estudio se realizó un análisis bioquímico de 68 muestras salivales parotídeas de pacientes con PCRI, correspondientes a 50 glándulas clínicamente afectadas y 18 glándulas clínicamente sanas. El primer análisis correspondió a determinar la concentración de proteínas salivales en cada muestra. En este análisis, la saliva parotídea de glándulas clínicamente afectadas con PCRI presentó una mayor concentración de proteínas salivales en comparación con la saliva de glándulas clínicamente sanas ($806,3 \pm 377,84$ mg/ml para glándulas PCRI y $665,78 \pm 372,65$ mg/ml para glándulas clínicamente sanas, $p= 0,137$). Aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, la mayor concentración encontrada en glándulas afectadas pudiese ser un indicador de mal funcionamiento glandular, relacionándose posiblemente con un aumento en la cantidad de proteínas secretorias sintetizadas por la glándula (como por ejemplo inmunoglobulinas); con una mayor extravasación de proteínas plasmáticas (por

ruptura del acino glandular) o con una disminución en el contenido de agua de la saliva (63; 64).

En segundo lugar se procedió a determinar la actividad enzimática de las gelatinasas salivales presentes en PCRI, donde sólo se encontró diferencia significativa en la Gelatinasa de 141kDa ($p=0,037$) entre la saliva proveniente de glándulas clínicamente afectadas y glándulas clínicamente sanas. El tamaño molecular de esta banda no corresponde a los descritos para las formas activas y latentes de gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9). El estudio zimográfico no permite diferenciar entre ambas gelatinasas, por lo tanto la banda de 141kDa podría corresponder, por su tamaño molecular, a un homodímero de MMP-2 o a un heterodímero de MMP-2 o MMP-9. En variados procesos patológicos como aterosclerosis (54), invasión tumoral (55), osteoartritis (56) y polineuropatía amiloidea (58), se describen heterodímeros de MMP-9/NGAL cercanos a este peso molecular.

Finalmente se procedió a determinar la frecuencia de formas moleculares de MMP-9 mediante inmuno-western-blot. En estudios previos, mediante zimografía, se ha determinado una frecuencia significativamente mayor de metaloproteasas 2 y 9 en saliva parotídea de pacientes con PCRI comparada con saliva de individuos controles sanos (3). A la fecha, sólo existe un estudio en el cual se compara la frecuencia de estas metaloproteasas en la saliva de las glándulas sanas versus enfermas en pacientes con PCRI, también mediante zimografía (65). Este es el primer estudio en que utilizando inmuno-western-blot anti-MMP-9 se comprueba la presencia de esta metaloproteasa en saliva parotídea de pacientes con PCRI. Casi la totalidad de las glándulas analizadas en este estudio presentaron MMP-9 salival ($n=65$), independiente de la afección clínica. En este trabajo se encontraron formas moleculares que en promedio pesaron 169kDa, 139kDa, 108kDa, 94kDa, 81kDa, 60kDa, 44kDa y 29 kDa. En el caso de las 2 primeras, se encontraron con mayor frecuencia en saliva parotídea de glándulas clínicamente enfermas (diferencia significativa, $p<0,05$). La MMP-9 no ha sido descrita en saliva parotídea de individuos sanos, por lo tanto su presencia en saliva proveniente de glándulas afectadas por PCRI, en cualquiera de sus formas moleculares, sugeriría una relación con la enfermedad. El hecho de que la forma molecular de 139kDa se encuentre con mayor frecuencia en

glándulas clínicamente afectadas, sugiere un posible rol en la afección clínica. En algunas patologías inflamatorias y degenerativas como aterosclerosis (54), osteoartritis (56) y polineuropatía amiloidea (58) se ha descrito la presencia de formas acomplejadas de MMP-9. Las 2 formas de alto peso molecular observadas en este estudio podrían corresponder a formas acomplejadas de MMP-9 con distintas macromoléculas, siendo probable que la forma de 139kDa pudiese corresponder a la unión MMP-9/NGAL, ya que se encuentra cercana al rango de 125-130kDa con la cual se ha descrito en diversos estudios (51; 52; 53). Aun así son necesarios mayores estudios para comprobar si esta forma molecular correspondería a este complejo, y para descubrir si en verdad son formas con actividad enzimática in vivo.

El resto de las formas moleculares pueden corresponder a formas truncadas de MMP-9. El que no tengan actividad en las zimografías puede deberse a que hayan perdido el dominio catalítico, o perdido la capacidad de degradar la gelatina, pero que aun conserven el antígeno reconocido por el anticuerpo anti-MMP-9. Un estudio con anticuerpo específico para la identificación de formas activas de MMP-9 permitiría verificar si estas moléculas se encuentran activas in vivo en la saliva de estos pacientes.

La presencia de MMP-9 salivales fragmentadas en casos de PCRI, indicaría que la saliva presenta actividad proteolítica (actividad proteasa activa en la saliva de los pacientes), o que al interior de la glándula estas moléculas pudiesen ser fragmentadas y secretadas de tal forma, situación que no puede ser dilucidada mediante este estudio.

Las formas activas y latentes de MMP-9 no han sido descritas en saliva proveniente de glándulas parótidas de individuos sanos. En nuestro estudio pudimos detectar MMP-9 tanto en saliva proveniente de glándulas clínicamente sanas como enfermas de pacientes con PCRI. Nuestros resultados concuerdan con los estudios previos donde se ve actividad gelatinasa en glándulas sanas y enfermas. Esto podría sugerir que en esta patología ambas glándulas se encuentran comprometidas en el proceso patológico aunque no estén afectadas clínicamente. Esta alteración evidenciada a nivel molecular en la saliva de las glándulas asintomáticas, es concordante con lo descrito por muchos autores a nivel sialográfico (1; 6; 17; 19) y ultrasonográfico (1; 17; 21). Por lo tanto podría

tratarse siempre de un cuadro bilateral, y las razones del por qué se inflama una sola glándula en algunas ocasiones aun son desconocidas, y es probable que la glándula no comprometida clínicamente esté manifestando una modalidad subclínica de la enfermedad. Por otro lado, las formas de alto peso molecular podrían estar relacionadas con las recurrencias clínicas de la enfermedad. Un estudio longitudinal de la presencia de estas formas moleculares salivales en los periodos de actividad e inactividad de la enfermedad permitiría esclarecer esta situación.

Varias investigaciones han atribuido a la MMP-2 y MMP-9 un rol en el desarrollo y resolución de inflamación como parte de la regulación de la inmunidad innata (66). Además, estudios in vitro han demostrado que metaloproteasas 2 y 9 fragmentan mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas, alterando la función de estas proteínas al generar fragmentos más activos o inactivos de estas. Al modificar quimioquinas, se generaría un gradiente que resultaría en señales quimiotácticas para líneas linfocitarias de la respuesta inmune adaptativa. Esto sugeriría que, in vivo, estarían produciendo una regulación en la respuesta inflamatoria (67; 68), y la presencia y actividad de MMP-9 en las glándulas de los pacientes con PCRI descrita en nuestro estudio, podría estar asociada a este rol regulador de inflamación.

El manejo de los pacientes con PCRI en Chile incluye variadas maniobras terapéuticas entre las cuales se encuentran: terapia antibiótica en unión con AINES, medidas físicas, bromhexina, lavados glandulares periódicos con solución yodada etc.(4; 7; 9; 22). Los pacientes incluidos en este estudio recibieron este último esquema de tratamiento. Los pacientes asistieron a controles periódicos en los que se les realizó lavados intraglandulares bilaterales vía conducto de Stenon con una solución yodada (RELIEV 76®) durante los periodos de remisión. La glándula parótida afectada clínicamente es evaluada sialográficamente una vez al año. Desconocemos si el conjunto de maniobras terapéuticas y de seguimiento pudiesen estar relacionadas de alguna manera con los resultados de nuestro estudio (69; 70).

El análisis bioquímico de la saliva de pacientes con PCRI estaría permitiendo observar aspectos que no son evidenciables en la clínica ni mediante exámenes complementarios. Por la poca invasividad y la relativa simplicidad del

análisis, este tipo de estudio podría ser útil para comparar la composición molecular de la saliva parotídea de glándulas afectadas y no afectadas clínicamente al inicio del tratamiento y durante la mantención terapéutica. Adicionalmente permitiría comparar la saliva de glándulas afectadas y no afectadas clínicamente de pacientes sometidos a distintos esquemas terapéuticos, para así determinar la efectividad del tratamiento.

En este estudio logramos corroborar que las glándulas clínicamente afectadas con PCRI presentaron una mayor frecuencia de algunas formas de alto peso molecular de MMP-9 que las glándulas clínicamente sanas, lo que sugiere que dichas formas de MMP-9 podrían estar relacionadas con las recurrencias clínicas de la enfermedad.

CONCLUSIONES

La saliva parotídea de pacientes con PCRI presenta actividad gelatinasa en ambas glándulas, independiente de si están o no afectadas clínicamente, es decir, tanto en modalidad unilateral y bilateral.

La saliva parotídea de glándulas afectadas clínicamente por PCRI presentan una mayor actividad de la gelatinasa de 141kDa que las glándulas no comprometidas clínicamente.

La saliva de individuos con PCRI, proveniente tanto de glándulas afectadas y sanas clínicamente, no presento un patrón uniforme de formas moleculares de MMP-9.

La saliva parotídea proveniente de glándulas afectadas clínicamente por PCRI presenta una mayor frecuencia de las formas moleculares de MMP-9 de 169kDa y 139kDa que las glándulas clínicamente sanas.

SUGERENCIAS

Sería interesante realizar un estudio longitudinal de la composición salival de una misma glándula parótida de un individuo con PCRI durante estados activos e inactivos de la enfermedad, para determinar si existen cambios moleculares según la condición clínica.

Realizar un análisis molecular de la saliva parotídea en pacientes con PCRI al momento del ingreso al Servicio Hospitalario y repetirlo durante los controles terapéuticos, permitiría determinar si existe algún cambio de la composición molecular de la saliva relacionada al tipo de tratamiento recibido.

Para establecer si las maniobras de seguimiento del cuadro clínico pudiesen estar influyendo en la presencia de las moléculas salivales detectadas en nuestro estudio, sería interesante comparar la composición molecular de la saliva parotídea de pacientes con PCRI que son evaluados mediante sialografía versus pacientes evaluados por ultrasonografía.

Aun falta realizar un estudio con anticuerpo antiMMP-2 y observar si existen formas moleculares de metaloproteasa 2 en saliva parotídea de pacientes con PCRI, para así comprobar si la actividad gelatinasa observada en las zimografías corresponde a MMP-2 y 9 o sólo a MMP-9.

Por otro lado, también sería interesante realizar un estudio con un anticuerpo específico para identificación de formas activas de MMP-9, para verificar qué moléculas de las detectadas en este estudio presentan actividad enzimática y cuáles se encuentran inactivas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Chitre VV., Premchandra D.J.** Recurrent parotitis. *Arch Dis Child.* Oct; 77(4):359-63. Review., 1997.
2. **Baurmash HD.** Chronic recurrent parotitis: a closer look at its origin, diagnosis, and management. *J Oral Maxillofac Surg.* 62(8):1010-8, 2004.
3. **Morales-Bozo I. Urzúa-Orellana B., Landaeta M., Montalbán R., Torres J., Pinochet A., Valverde G., Muñoz-Martínez A.** Molecular alterations of parotid saliva in Infantile Chronic Recurrent Parotitis. *Pediatrics Research* . 61(2):202-208, 2007.
4. **Landaeta M., Giglio M.S., Ulloa M.T., Martínez M.J., Pinto M.E.** Clinical, microbiological aetiology and therapeutic aspects in infantil chronic recurrent parotitis (PCRI). *Revista Chilena de Pediatría.* 74(3):269-276, 2003.
5. **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.* 70(3):459-62, 2003.
6. **Ericson S, Zetterlund B, Ohman J.** Recurrent parotitis and sialectasis in childhood. Clinical, radiologic, immunologic, bacteriologic, and histologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 100(7):527-35., 1991.
7. **Nazar M., Iñiguez F.O., Der M C., Méndez C., García C., Arce J., DíazalesnikE.** Parotiditis aguda recurrente en el niño. *Revista Chilena de Pediatría* . 72(5):437-442., 2001.
8. **Nahlieli O., Shacham R., Shlesinger M., Eliav E.** Juvenile recurrent parotitis: a new method of diagnosis and treatment. *Pediatrics* . 114(1):9-12, 2004.
9. **Giglio M.S., Landaeta M., Pinto M.E.** Microbiology of recurrent parotiditis. *Pediatr Infect Dis J.* . 16(4):386-90, 1997.

10. **Shkalim V, Monselise Y, Mosseri R, Finkelstein Y, Garty BZ.** Recurrent parotitis in selective IgA deficiency. *Pediatr Allergy Immunol.* 15(3):281-3, 2004.
11. **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.* 24(5):461-2., 2005.
12. **Kolho KL, Saarinen R, Paju A, Stenman J, Stenman UH, Pitkaranta A.** New insights into juvenile parotitis. *Acta Paediatrica.* 94(11):1566-70, 2005.
13. **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 Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 86(5):606-15, 1998.
14. **Ussmuller J, Donath K.** Clinical, histopathologic and immunohistochemical studies of chronic sialectatic parotitis in childhood and adolescence. *Klin Padiatr.* 211(3):165-71., 1999.
15. **Concheiro A., Bellver E., Garrido R., Garcia F.** Chronic recurrent parotitis in childhood. *An Esp Pediatr.* 53(5):418-21. , 2000.
16. **Galili D, Marmary Y.** Juvenile recurrent parotiditis: clinicoradiologic Foyo-up study and the beneficial effect of sialography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 61: 550-56., 1986.
17. **Mandel L, Bijoor R.** Imaging (computed tomography, magnetic resonance imaging, ultrasound, sialography) in a case of recurrent parotitis in children. *J Oral Maxillofac Surg.* 64(6):984-8., 2006.
18. **Ramirez J., Urrutia H., Aravena A.** Correlación entre la duración de la enfermedad y las imágenes sialográficas en casos con parotiditis recurrente unilateral. *Archivos de Odontostomatología.* 12(9): 517-21., 1996.
19. **Geterud A, Lindvall AM, Nylen O.** Follow up study of recurrent parotidits in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 97:341-6., 1988.

20. **Leerdam CM, Martin HC, Isaacs D.** Recurrent parotitis of childhood. *J Paediatr Child Health.* 41(12):631-4., 2005.
21. **Encina S, Ernst P, Villanueva J, Pizarro E.** Ultrasonography: a complement to sialography in recurrent chronic childhood parotitis. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 97(5):258-63. , 1996.
22. **Rosti3n C.G., Giuliano C., Acosta S.** Parotiditis cr3nica recurrente en el ni1o. *Rev. chil. pediatr.* 75(1):43-47., 2004.
23. **D., Isaacs.** Recurrent parotitis. *J Paediatr Child Health.* 38(1):92-4., 2002.
24. **Moody A.B., Avery C.M., Walsh S., Sneddon K., Langdon J.D.** Surgical management of chronic parotid disease. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 38(6):620-622., 2000.
25. **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.* 20 (5):199-207., 1996.
26. **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.* 7 (2):91-9., 1978.
27. **Wu A., Lafrenie R, Park C, Apinhasmit W, Chen Z, Bikerdal-Hansen H, Yamada K, Stetler-Stevenson W, Baum B.** Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol.* 171(2):117-24., 1997.
28. **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 contain increased latent and active gelatinase-B levels. *Matrix Biol.* 17(8-9):657-65., 1998.
29. **Asatsuma M, Ito S, Watanabe M, Takeishi H, Nomura S, Wada Y, Nakano M, Gejyo F, Igarashi A.** Increase in the ratio of matrix metalloproteinase-9 to

tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in saliva from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Chim Acta.* . 345(1-2):99-104., 2004.

30. **Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S.** The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* . 85(1):22-32. , 2006.

31. **Sternlicht MD, Werb Z.** How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:463-516, 2001.

32. **Nagase H, Woessner JF Jr.** Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 30; 274(31):21491-4, 1999.

33. **Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B, Gamonal J.** Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res.* 40(3):199-207., 2005.

34. **Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Ronka H, Kontinen 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.* 35(5):259-265, 2000.

35. **Jang CH, Shin SH, Cho HH, Moon SJ, Cho YB.** Expression of matrix metalloproteinase-9 and -2 in pediatric chronic otitis media with effusion. . *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 70(7):1155-8. Epub 2006 Jan 18., 2006; .

36. **Ekekezie II, Thibeault DW, Simon SD, Norberg M, Merrill JD, Ballard RA, Ballard PL, Truog WE.** Low levels of tissue inhibitors of metalloproteinases with a high matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio are present in tracheal aspirate fluids of infants who develop chronic lung disease. *Pediatrics.* 113(6):1709-14, 2004.

37. **Valenzuela MA, Collados L, Kettlun AM, Gonzalez F, Cartier L.** Increased activity of metalloproteinases and their inhibitors in cerebrospinal fluid of patients with tropical spastic paraparesis. *Rev Med Chil.* . 128(6):585-92., 2000.

38. **Kettlun AM, Cartier L, Garcia L, Collados L, Vasquez F, Ramirez E, Valenzuela MA.** TIMPs and MMPs expression in CSF from patients with TSP/HAM. . *Life Sci.* . 72(25):2863-76., 2003.
39. **Schulz CG, Sawicki G, Lemke RP, Roeten BM, Schulz R, Cheung PY.** MMP-2 and MMP-9 and their tissue inhibitors in the plasma of preterm and term neonates. . *Pediatr Res.* . 55(5):794-801. Epub 2004 Feb 18., 2004.
40. **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.* . 73(8):1397-1406, 1994, Aug.
41. **Ogbureke KU, Fisher LW.** Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands. *J Dent Res.* 83(9):664-70, 2004.
42. **Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, Hemmerlein B.** Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology.* 44(3):222-31, 2004.
43. **Teymoortash A, Mandic R, Schrader C, Werner JA.** Extracellular matrix molecules in chronic obstructive sialadenitis: an immunocytochemical and Western blot investigation. *J Oral Sci.* 46(4):227-33, 2004 .
44. **Perez P, Kwon YJ, Alliende C, Leyton L, Aguilera S, Molina C, Labra C, Julio M, Leyton C, Gonzalez MJ.** Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjogren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloprotein. *Arthritis Rheum.* . 52(9):2751-60, 2005.
45. **Perez P, Goicovich E, Alliende C, Aguilera S, Leyton C, Molina C, Pinto R, Romo R, Martinez B, Gonzalez MJ.** Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 43(12):2807-17, 2000 .

46. **López-Solís R.O., Morales-Bozo I., Aguilera S.** Patrones de difusión de proteínas de la saliva humana. . *Rev. Med. de Chile.* . 126 (9):1065 – 1072., 1998.
47. **Morales-Bozo I, Urzúa-Orellana B, Domínguez P, Aguilera S, López-Solís R.** Patterns and variability in electrophoretic polypeptide profiles of human saliva in a healthy population. Submitted to *Journal Of Physiology and Biochemistry*.
48. **Morales I., Domínguez P., López R.O.** Dispositivos para colección de saliva de las glándulas salivales mayores. Resultados en sujetos normales. *Revista Médica de Chile* . 126(5):538-547, 1998.
49. **Morales-Bozo I, Landaeta M, Urzúa-Orellana B, Retamales P.** Association between the occurrence of matrix metalloproteinases 2 and 9 in parotid saliva with the degree of parotid gland damage in juvenile recurrent parotitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Jun 20. [Epub ahead of print]PMID: 18567510., 2008 .
50. **Malla N, Sjoli S, Winberg J, Hadler-Olsen E, Uhlin-Hansen L.** Biological And Pathobiological Functions of Gelatinase Dimers and Complexes. *Connect. Tissue Res.* 49:180-184, 2008.
51. **Tschesche H, Zolzer V, Triebel S.** The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix metalloproteinases. *Euro. J. Biochem.* 268, 1918-1928, 2001.
52. **Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA.** The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem.* 5;276(40):37258-65, 2001 Oct.
53. **P, Devarajan.** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Ther.* 5(B):463-470, 2007.
54. **Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U.** Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 136-142, 2006.

55. **Zhang H, Xu L, Xiao D, Xie J, Zeng H, Wang Z , Zhang X.** Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oropharyngeal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumor invasion. *J. Clin. Pathol.* 60, 555-561, 2007.
56. **Xu S, Venge P.** Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim Biophys Acta.* 18;1482(1-2):298-307, 2000 Oct .
57. **Woo JS, Kim KM, Kang JS, Zodpe P, Chae SW, Hwang SJ, Lee HM.** Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in human salivary glands. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 116(8):599-603, 2007 Aug.
58. **Sousa MM, do Amaral JB, Guimarães A, Saraiva MJ.** Up-regulation of the extracellular matrix remodeling genes, biglycan, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, and matrix metalloproteinase-9 in familial amyloid polyneuropathy. *FASEB J .* 19(1):124-6, 2005 Jan.
59. **Bramhall S., Noack N., Wu M., Loewenberg J.R.** A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal. Biochem.* 31, 146-148., 1969.
60. **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.* . 100, 98-99., 1979.
61. **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 it use in measuring enzymatic activity in human plasma samples. *Clin. Chim. Acta.* . 95. 425-432., 1970.
62. **U.K., Laemmli.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685., 1970.
63. **Kaufman E, Lamster I.** The diagnostic applications of saliva- a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13(2):197-212 , 2002 .
64. **Streckfus C, Bigler L.** Saliva as a diagnostic fluid . *Oral Dis* . 8(2):69-76, 2002.

65. **Pinochet, Alvaro.** Determinación de la frecuencia y actividad enzimática de las formas activas y latentes de las metaloproteinasas 2 y 9 en la saliva parotídeade pacientes afectados por parotiditis crónica recurrente infantil. *Trabajo de investigación para optar a título cirujano-dentista Facultad de Odontología Universidad de Chile 2008 .*
66. **Overall CM, McQuibban GA, Clark-Lewis I.** Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics. *Biol Chem.* 383(7-8):1059-66, 2002 Jul-Aug.
67. **Greenlee KJ, Corry DB, Engler DA, Matsunami RK, Tessier P, Cook RG, Werb Z, Kheradmand F.** Proteomic identification of in vivo substrates for matrix metalloproteinases 2 and 9 reveals a mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol .* 15;177(10):7312-21, 2006 Nov .
68. **Manicone A, McGuire J.** Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol.* 19(1):34-41, 2008 Feb.
69. **Cockrell D, Rout P.** An adverse reaction following sialography. *Dentomaxillofac Radiol .* 22: 41-42., 1993 .
70. **Ozdemir D, Polat NT, Polat S, Lipiodol UF.** retention in dental sialography. *Br J Radiol.* 77(924):1040-1., 2004 Dec.