



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

**“DETERMINACION DE LA FRECUENCIA Y ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS FORMAS
ACTIVAS Y LATENTES DE LAS METALOPROTEINASAS 2 Y 9 EN LA SALIVA PAROTÍDEA DE
PACIENTES AFECTADOS POR PAROTIDITIS CRÓNICA RECURRENTE INFANTIL.”**

ALVARO NICOLÁS PINOCHET MONDACA

**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
2008**

*A mi familia, amigos y formadores.
Sin ellos los logros no serian lo mismo.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Irene Morales Bozo, por su constante buena disposición, acogida, motivación, dedicación y simpatía, la que dejó ver desde segundo año en su asignatura, en tercero durante la ayudantía y en sexto como tutora principal de este trabajo. Mi gratitud es inmensa ya que fue el docente que más influyó a lo largo de mi paso por pregrado y que dejó en mí, una marca para el futuro ya que sin proponérselo, me sirvió de ejemplo y me enseñó a tener una visión distinta de la práctica clínica.

Prof. Dra. Blanca Urzúa Orellana por su ayuda en el laboratorio

A la Dra. Mirtha Landaeta, tutora asociada, por su buena acogida en el Hospital San Juan de Dios, por compartir conmigo parte de su tiempo y experiencia.

A Raúl Montalbán por su ayuda con las muestras y fichas de los pacientes.

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

INDICE

INTRODUCCIÓN _____	5
MARCO TEÓRICO _____	7
HIPÓTESIS _____	19
OBJETIVO GENERAL _____	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	19
MATERIALES Y MÉTODOS _____	21
RESULTADOS _____	26
DISCUSIÓN _____	29
CONCLUSIONES _____	33
SUGERENCIAS _____	34
RESUMEN _____	35
BIBLIOGRAFÍAS _____	37

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.

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 y que sólo logran atenuar los signos y síntomas de la enfermedad. En nuestro país, 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.

Por otra parte, los centros de atención se ven en la necesidad de gastar recursos

materiales y humanos en maniobras poco eficaces. El diagnóstico de esta enfermedad incluye exámenes complementarios como la sialografía o ecografía de la glándula parótida y exámenes sanguíneos de laboratorio que permiten descartar otras patologías asociadas.

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.

El presente trabajo, tiene como objetivo aportar mayor conocimiento sobre las moléculas asociadas al mecanismo fisiopatológico de esta patología mediante el análisis de frecuencia y actividad enzimática de las metaloproteinasas presente en la saliva parotídea de los pacientes con PCRI

MARCO TEORICO

La PCRI es una inflamación parotídea, generalmente asociada a sialectasia no obstructiva glandular. Se caracteriza por episodios recurrentes de aumento de volumen inflamatorio de la glándula parótida, acompañados ocasionalmente de fiebre y malestar general. Los 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 se presenta en la etapa preescolar y desde este momento hasta la adolescencia, las recurrencias tienen un comportamiento impredecible en cada sujeto. 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 puede llegar a ser de tal magnitud, que obliga a la hospitalización del paciente con tiempo de estadía de alrededor de una semana ⁽³⁾. Los episodios de aumento de volumen se asocian a patología respiratoria como resfrío, amigdalitis, neumonitis y bronquitis ^(3, 4). Afecta a individuos de ambos géneros en una proporción similar y se manifiesta preferentemente en forma unilateral. Cuando se presenta en ambas glándulas parótidas, afecta en forma predominante a una de ellas. La parotidomegalia es marcadamente dolorosa y la piel de la zona puede presentarse eritematosa. En la glándula afectada, se produce una evidente disminución del flujo salival y la secreción se

observa viscosa y con acumulo de material de aspecto particulado y de color blanquecino ^(1, 2, 3). El aumento de volumen puede durar desde horas a meses, luego de este período con un aparente retorno a la normalidad, la glándula permanece en estado quiescente hasta un nuevo episodio. Después de la pubertad los síntomas se atenúan pudiendo desaparecer completamente sin causa aparente, aunque en algunos casos la enfermedad puede persistir en el individuo adulto ^(1, 2).

Entre los posibles factores causales de PCRI, se describen: malformaciones ductales congénitas, factores microbianos, genéticos, alergias, manifestaciones locales de enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, etc. ^(1,2,3,4,5,6,7,8). Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha podido ser demostrada y hasta la fecha la etiopatogenia de esta enfermedad sigue siendo un enigma.

Estudios sobre el análisis microscópico del tejido glandular son escasos. La biopsia parotídea es un examen de alto riesgo dada la proximidad del nervio facial y por lo tanto se indica sólo en casos en que la relación costo/beneficio lo amerite. Estudios realizados sobre tejido glandular extirpado a pacientes con PCRI, ha permitido describir un infiltrado linfocitario con tendencia a formar folículos linfoides alrededor de ductos interlobulares dilatados (sialectasia). ^(1,9, 10,11).

El diagnóstico de PCRI se basa en la historia clínica y se confirma con sialografía, examen que permitiría seguir la evolución del estado glandular ^(1,10). Cuando la

enfermedad se atenúa, los cambios sialográficos tenderían a disminuir pudiendo llegar a desaparecer cuando la enfermedad se hace inactiva ⁽¹⁾.

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 ^(1,12,15,63). Los estudios clínicos establecen una correlación entre ambos exámenes complementarios ^(10,13,14,15) pero aún se depende de la sialografía para corroborar el diagnóstico. 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. ⁽⁶⁾, en otros, se indican antiinflamatorios no esteroidales ^(6, 16), en otros combinaciones de antihistamínicos, lisozima y antibióticos ⁽¹⁷⁾. 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 ⁽¹⁶⁾. 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 ^(1,17) 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 ⁽³⁾. Otro estudio propugna el tratamiento por medio de la inyección de hidrocortisona intraglandular bajo anestesia general. ⁽¹⁸⁾. Un estudio reciente propone la intervención glandular a través de un sialendoscopio por el cual se realiza un lavado, la dilatación ductal e inyección de hidrocortisona ⁽⁹⁾. En casos con daño glandular severo e irreversible como resultado de episodios agudos de larga duración, se postula la ligazón del conducto excretor para lograr la atrofia glandular ⁽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, 19). Es posible encontrar en la literatura casos extremos en los que se ha realizado la parotidectomía bilateral en niños de 11 años de edad ⁽¹⁹⁾. 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 ^(1,3, 9, 12, 17, 18), 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.

Aunque 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. La tendencia general es propender a que el tratamiento se enfoque 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.

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 ^(1,2,3,12), 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 ^(20,21).

En una serie de patologías locales y sistémicas que afectan a las glándulas salivales, se ha podido detectar en saliva, la presencia de macromoléculas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular, lo que ha permitido obtener información en relación al proceso patológico de la glándula afectada ^(22,23,24). Algunas de estas moléculas descritas corresponden a las metaloproteasas (MMPs) e inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs).

Las MMPs conforman una familia de 26 endopeptidasas dependientes de calcio y zinc encargadas de la remodelación de la matriz extracelular en condiciones normales y patológicas ⁽²⁵⁾. Su expresión es regulada por factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y componentes de la matriz extracelular ⁽²⁶⁾. 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) ⁽²⁷⁾. En la matriz extracelular, la actividad MMP es controlada por pequeños cambios en el delicado balance entre la expresión y síntesis de MMPs y de sus principales inhibidores endógenos, los TIMPs ⁽²⁸⁾. Estos inhibidores, de los que se han descrito 4 miembros, se unen de un modo reversible y en una proporción 1:1, al sitio catalítico de las formas activadas de las MMPs, provocando su inhibición ⁽²⁹⁾. Esta unión es de baja especificidad pues son capaces de unirse a distintas MMPs, sin embargo se describe que MMP-9 y MMP-2 serían Inhibidas con mayor afinidad por

TIMP 1 y 2 respectivamente ⁽³⁰⁾. El desbalance entre las MMPs y los TIMPs ha sido implicado en la remodelación y degradación tisular patológica de una amplia variedad de enfermedades de origen neoplásico, autoinmune, inflamatorias, etc. ^(31, 32, 33). Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 han sido involucradas en una amplia variedad de condiciones patológicas del adulto como el Síndrome de Sjögren, diabetes mellitus, periodontitis, entre otras ^(24, 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 ^(22,33,35,36, 37,38,39).

Estudios realizados en pacientes que han sido sometidos a irradiación terapéutica del territorio máxilofacial, en los que se produce un estado inflamatorio crónico de las glándulas salivales, establecen que la saliva de estos pacientes presenta MMP-2 y MMP-9 en sus formas activas y latentes y que se produciría un aumento de la actividad MMP-9 salival post-irradiación ⁽⁴⁰⁾. Puesto que la activación de estas metaloproteinasas se produce por la hidrólisis del propéptido, las formas activas presentan un menor tamaño molecular que las formas latentes. (MMP-2 latente y activada: 72 y 66 kDa

respectivamente. MMP-9 latente y activada: 92 y 82 kDa respectivamente). Esta condición permite identificarlas en la zimografía en condiciones experimentales.

En pacientes con Síndrome de Sjögren, patología inflamatoria autoinmune que afecta las glándulas exocrinas, se describe un aumento de la actividad MMP-9 salival y una alteración en la proporción de las concentraciones salivales de MMP-9 / TIMP-1, en relación a sujetos controles sanos ⁽²⁴⁾. Estudios realizados por otros autores, en biopsias de glándula salival menor de pacientes afectados por esta enfermedad, describen alteraciones tisulares coincidentes con las descritas en saliva ⁽³²⁾.

Sin embargo, el análisis de la presencia de estas enzimas en saliva se ha efectuado también en patologías que afectan a otros órganos o sistemas distintos a las glándulas salivales. En trastornos de la cavidad bucal como en la periodontitis del adulto, se reporta mayores niveles salivales de MMP-9 y TIMP-1 que en individuos controles ⁽⁴¹⁾.

En pacientes con desórdenes del gusto, se analiza la presencia de MMP-9 salival y aunque no se describen diferencias entre los sujetos enfermos y los controles, se reporta a esta enzima en la saliva de individuos clínicamente sanos ⁽⁴²⁾. Lo mismo ocurre en el estudio de *Raitio et al*, en que se informa que individuos controles no fumadores presentaron MMP-9 salival en sus formas latente y activa y que los individuos fumadores presentaron mayor concentración salival de MMP-9 latente ⁽⁴³⁾.

También se analizan estas moléculas en condiciones sistémicas, en que por ejemplo, se

describe que la saliva de individuos controles sanos contenía niveles menores de las formas activadas y latentes de MMP-2 y MMP-9 y TIMP-1 y 2 que la saliva de portadores del virus VIH ⁽⁴⁴⁾. Otro estudio describe que la saliva de mujeres controles no embarazadas presentaba MMP-9 en concentraciones inferiores a la saliva de mujeres embarazadas con ruptura prematura de membranas ⁽⁴⁵⁾.

Con la excepción de los estudios de Wu ⁽²²⁾ y Makela ⁽⁴⁶⁾, casi la totalidad de los estudios determinan los niveles de estas moléculas 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. 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 cual es el origen de estas moléculas presentes en saliva. En un intento por dilucidar este problema, Makela ⁽⁴⁶⁾ 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, TIMP-1 y TIMP-2 se encontrarían principalmente en el sistema ductal y ausente del sistema acinar ^(47, 48, 49). Estudios similares en glándula salival labial, describen la presencia de MMP2, MMP-9 y TIMP-1 en las células ductales y en la región basal de las células acinares. ^(32,50). 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 en relación al posible origen de las MMPs y TIMPs salivales, se deduce que para la identificación en saliva de las probables 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. Con este propósito *Morales et al.* diseñó un dispositivo (snail collector), termoformado, desechable, que permite recolectar saliva parotídea de alta pureza ^(51,52) y que permite utilizarse en un número alto de individuos con un relativo bajo costo ⁽⁵⁴⁾.

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). 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. Adicionalmente, 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 ⁽⁵³⁾. Otro estudio reportado por el mismo grupo de investigadores, indica que existe una asociación entre la presencia de metaloproteasas 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 ⁽⁵⁹⁾

Pese a esta evidencia, un problema todavía no abordado en esta patología es determinar si estas metaloproteasas presentes en la saliva de estos pacientes, se encuentran en sus formas latentes o activadas, lo que pudiese entregar información adicional para comprender el mecanismo fisiopatológico involucrado en la destrucción

glandular, tal como ha sido determinado en otros procesos patológicos inflamatorios de la glándula ^(24, 40).

En este trabajo se propone realizar un análisis sobre la relación entre las formas activadas y latentes de metaloproteinasas 2 y 9 en la saliva parotídea de pacientes con PCRI.

HIPÓTESIS

Los pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil presentan en la saliva parotídea secretada por glándulas clínicamente comprometidas, una mayor frecuencia y mayor actividad enzimática de las formas activadas y latentes de MMP-2 y MMP-9 en relación a saliva secretada por glándulas no comprometidas clínicamente.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia y actividad enzimática de las formas activadas y latentes de MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea de glándulas comprometidas y no comprometidas clínicamente de pacientes con Parotiditis Crónica Recurrente Infantil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar la frecuencia y actividad enzimática de las formas activadas y latentes de MMP-2 en la saliva parotídea bilateral de pacientes con PCRI.

- b. Determinar la frecuencia y actividad enzimática de las formas activadas y latentes de MMP-9 en la saliva parotídea bilateral de pacientes con PCRI.
- c. Analizar comparativamente la frecuencia y actividad enzimática de las formas activadas y latentes de MMP-2 y MMP-9 en la saliva parotídea de glándulas comprometidas y no comprometidas clínicamente de pacientes con PCRI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos.

Se conformó un grupo compuesto por 32 pacientes de entre 4 y 14 años de edad, de ambos géneros, con diagnóstico de PCRI que se encuentran en tratamiento en el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital San Juan de Dios. Los criterios de inclusión fueron: a) ausencia de enfermedades sistémicas; b) historia de al menos dos episodios inflamatorios agudos parotídeos en la misma glándula; c) imagen sialográfica parotídea compatible con diagnóstico de PCRI.

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. (54). La recolección fue realizada por un único operador calibrado para esta maniobra. La saliva se recolectó 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. Para cada muestra se registró si

esta provenía de una parótida sana o comprometida según diagnóstico sialográfico.

Concentración de proteínas.

Se aplicó el método de Bramhall ⁽⁵⁵⁾, en forma de micrométodo y con adaptaciones descritas previamente ^(56,57). Alícuotas de 40 µl de saliva y de un estándar de seroalbúmina bovina (10-50 µg) fueron depositados sobre filtros de celulosa. Posteriormente, 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°C y lavados exhaustivamente en ácido acético 7% hasta background claro. Luego se enjuagaron una vez en agua destilada y secados bajo lámpara. El colorante de cada disco fue eluido en metanol 45%-amoníaco 0.25% y leído espectrofotométricamente a 610 nm para determinar su absorbancia. Con este dato, se creó una curva de calibración para determinar en base a los estándares la concentración de proteína de las muestras.

Zimografía:

Las muestras de saliva, fueron mezcladas con buffer de muestra en condiciones no denaturante y separadas electroforéticamente a un voltaje constante de 125 V, en un gel de poliacrilamida-SDS (10%) de acuerdo al procedimiento estandarizado de

Laemmli (Laemmli, 1970) con la excepción que contenía gelatina a una concentración final de 1 mg/ml. Una vez finalizada la separación electroforética, tras 150 minutos, el gel fue incubado en buffer de activación (Tris HCL pH 7,5 10 mM, Triton x100 1,25%, CaCl₂ 5 Mm, ZnCl₂ 1uM) por 18 hrs a 37°C.

Posteriormente, 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 Metaloproteasas 2 y 9.

Confirmación de la Actividad Metaloproteinasas:

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).

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

Determinación de la frecuencia de MMP 2 y 9 activas y latentes.

Se determinó el tamaño molecular de las bandas claras correspondientes a actividad metaloproteínasa, mediante la movilidad relativa de estas enzimas, contrastándola con la de proteínas estándares de tamaño molecular. Se determinó la frecuencia de estas moléculas en la totalidad de las muestras analizadas, registrando si estas provenían de glándulas sanas o comprometidas.

Determinación de la actividad enzimática de las Metaloproteinasas.

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.

Análisis estadístico.

En las muestras provenientes tanto de parótidas sanas como de enfermas, se determinó la frecuencia de bandas zimográficas y 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 . El análisis estadístico se realizó aplicando el test

exacto de Fisher y el test de Wilcoxon según correspondía. La significación estadística fue fijada en $p < 0,05$. Para todo esto, se utilizó el programa estadístico STATA® 9.1.

RESULTADOS

Entre los 32 pacientes con PCRI (edad promedio: 10,7 años \pm 4,42), 16 presentaban un cuadro bilateral y 16 un cuadro unilateral, así se encontraron 16 glándulas parótidas clínicamente sanas y 48 glándulas clínicamente comprometidas según el diagnóstico clínico-sialográfico.

Tras la zimografía, se evidenciaron 4 tipos distintos de bandas correspondientes a actividad gelatinasa que se expresaban en las distintas 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 141.7kDa, 90.5kDa, 75kDa y 61.2kDa por lo que se determinó que dichas bandas son atribuibles a: la forma polimérica de las Metaloproteasas, MMP-9 latente, MMP-9 activa y MMP-2 latente respectivamente. No se detectó actividad atribuible a la MMP-2 activa (Fig1).

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 sana como de la clínicamente

comprometida.

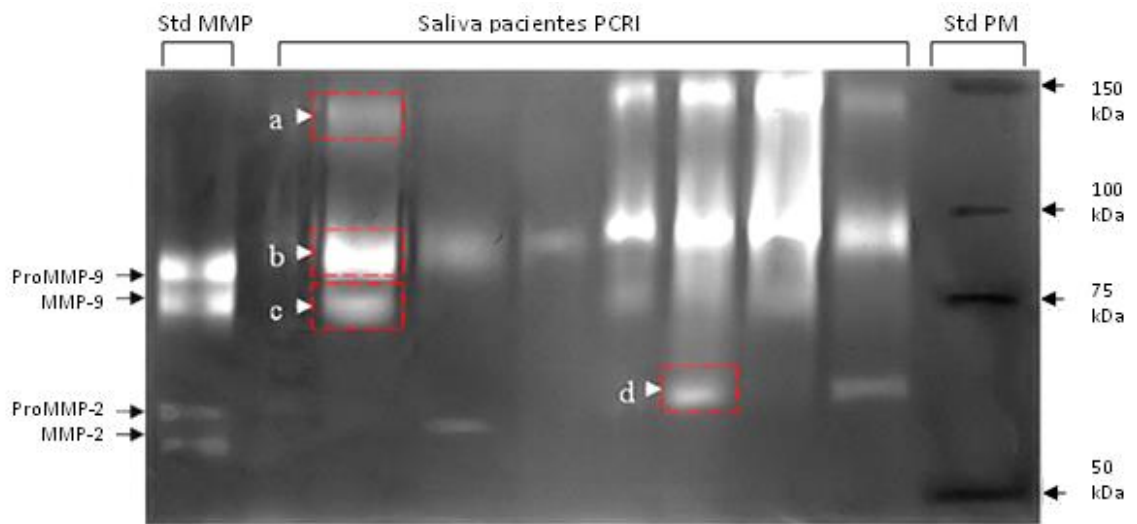


Fig.1 Zimografía representativa para los 4 tipos de bandas con actividad gelatinasa que presentaron las muestras. **a**, MMP Polimérica (142 kDa). **b**, ProMMP-9 (92 kDa). **c**, MMP-9 (72 Kda). **d**, ProMMP-2 (66kDa)

No hubo diferencia estadística entre la frecuencia de las metaloproteasas presentes en la saliva parotídea de las glándulas sanas versus las enfermas (Test exacto de Fisher, $p > 0.05$). Sin embargo, como se puede desprender de la tabla I, las glándulas con PCRI presentan una mayor frecuencia de todas las formas de metaloproteasas analizadas respecto de las glándulas sanas.

Tabla I. Frecuencia de ProMMP-9, MMP-9, ProMMP-2 en saliva parotídea de pacientes con PCRI en relación al compromiso clínico de la glándula.

Glándula	MMP Polim.		ProMMP-9		MMP-9		ProMMP-2	
	Aus.	Pte.	Aus.	Pte.	Aus.	Pte.	Aus.	Pte.
Sana	1	15	1	15	7	9	14	2
PCRI	2	46	2	46	12	36	34	14
Total	3	61	3	61	19	45	48	16

▪ Test exacto de Fisher no mostro diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

La actividad enzimática analizada a partir de las imágenes digitalizadas de los geles y fue expresada en nanogramos de enzima por microgramos de proteína total en cada muestra y en nanogramos de enzima por microlitros de saliva. No hubo diferencia significativa entre la actividad enzimática de las glándulas sanas y las enfermas, a excepción de la concentración de la forma polimérica de las metaloproteasas (Tabla II). A pesar de esto, se observó una mayor actividad enzimática en las glándulas enfermas de la forma polimérica, la ProMMP-9 y MMP-9 respecto de las glándulas sanas y sólo la ProMMP-2 presentó menor actividad enzimática en la glándula enferma (Tabla II).

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

	MMP Polim.		ProMMP-9		MMP-9		ProMMP-2	
	Sana	PCRI	Sana	PCRI	Sana	PCRI	Sana	PCRI
nº	15	46	14	45	9	36	2	14
ng enzima / µg Proteína total	2.0±1.41	6.19±7.92	3.53±3.11	9.81±18.6	2.16±1.93	3.35±3.45	0.99±0.0	0.94±0.3
ng enzima / µl Saliva	1.75±2.37	9.06±23.22 *	3.03±4.08	8.03±13.6	2.05±2.02	3.42±5.15	0.47±0.24	0.6±0.57

- Significación estadística, test de Wilcoxon ($p=0.418$)

DISCUSIÓN

Se ha descrito que la frecuencia de metaloproteinasas 2 y 9 en la saliva parotídea de pacientes con PCRI es significativamente mayor que en pacientes sanos ⁽⁵³⁾. En este estudio, se pudo ver que todos los pacientes con PCRI presentaron actividad metaloproteinasa 2 y/o 9 en ambas glándulas parótidas, independientemente al compromiso clínico-sialográfico de estas. Estudios previos también habían relacionado estas metaloproteinasas con el grado de daño glandular evaluable en sialografías ⁽⁵⁹⁾. En este trabajo determinamos que pese a no haber diferencia significativa entre la frecuencia y actividad enzimática de estas metaloproteinasas en la saliva de glándulas comprometidas y asintomáticas de pacientes con PCRI, existe una tendencia a una mayor frecuencia de estas gelatinasas en glándulas comprometidas clínicamente. Estos resultados sugieren que los pacientes con PCRI unilateral, estarían presentando daño glandular en ambas parótidas y que la glándula no comprometida clínicamente estaría manifestando una modalidad subclínica de la enfermedad. Esta alteración evidenciada por nosotros a nivel molecular en la saliva de las glándulas asintomáticas, es concordante con lo descrito por muchos autores a nivel sialográfico ^(1, 8, 60, 61, 62) y ultrasonográfico ^(1, 62, 63).

Los resultados a nivel molecular obtenidos en este estudio no pueden ser contrastados con análisis a nivel histológico, debido a la falta de evidencia producto de la dificultad

que implica tomar biopsias de la parótida por su relación con el nervio facial. Esto se imposibilita aun más si se considera que no estaría indicado tomar biopsia de la glándula asintomática.

El manejo de los pacientes en Chile incluye terapia antibiótica (amoxicilina, cefalosporinas de primera generación y flucloxacilina) ⁽¹²⁾ con antiinflamatorios no esteroideos y medidas físicas ^(3,12,64). Además, debido al desconocimiento en torno a esta patología, los distintos servicios de salud plantean distintas alternativas terapéutica basados en sus propias experiencias clínicas. Así es el caso del Servicio de Cirugía del Hospital Roberto del Río, donde, basados en los antecedentes que existen sobre los buenos resultados que se han obtenido con el uso de mucolíticos en patologías como S. Sjögren y Xeroftalmia, se utiliza bromhexidina en pacientes con PCRI durante los periodos agudos de la enfermedad, reportando resultados favorables ⁽⁶⁵⁾. En el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Barros Luco, se ha planteado el uso de inyección intraductal de violeta genciana en aquellos casos en que los cuadros agudos no remiten con el esquema regular ⁽⁶⁶⁾. Por otro lado, se ha reportado un posible efecto terapéutico de la sialografía ⁽⁶⁷⁾ cuyo mecanismo de acción aun no ha sido dilucidado y basado en este principio, algunos autores han planteado como terapia, la realización de lavados glandulares periódicos con solución yodada con buenos resultados ⁽⁶⁴⁾. Los pacientes

incluidos en este estudio, recibían este esquema de tratamiento. Los pacientes afectados por PCRI unilateral o bilateral, asisten a controles periódicos en los que se les realiza lavados intraglandulares vía conducto de Stenon con una solución yodada (RELIEV 76®) en los periodos de remisión, en ambas glándulas parótidas y la glándula parótida afectada clínicamente es evaluada sialográficamente una vez al año. Desconocemos si el conjunto de maniobras terapéuticas y de seguimiento pudiesen estar determinando algún estímulo que perpetúe la frecuencia y actividad enzimática de las Metaloproteinasas estudiadas, como también en la ausencia de diferencias en estos parámetros entre glándulas sanas y clínicamente comprometidas observadas en nuestro estudio ^(68, 69).

Varias investigaciones han atribuido a las metaloproteinasas 2 y 9 un rol en el desarrollo y resolución de inflamación como parte de la regulación en la inmunidad innata ⁽⁷⁰⁾. Por otro lado, estudios in vitro han demostrado que mmp2 y mmp9 fragmentan mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas, alterando la función de estas proteínas al generar fragmentos más activos o inactivos de esas. Por lo que hipotéticamente, in vivo, estarían produciendo una regulación en la respuesta inflamatoria ⁽⁷¹⁾.

Además, se ha visto que MMP2 y MMP9 modifican moléculas como las quimioquinas, lo que genera una gradiente de estas, resultando en señales quimiotácticas para líneas

linfocitarias de la respuesta inmune adaptativa ⁽⁷²⁾. Basándonos en lo anterior, la presencia y actividad de metaloproteinasas en las glándulas de los pacientes PCRI descrita en nuestro estudio, podría estar asociada a este rol regulador de inflamación de las metaloproteasas 2 y 9.

Desde nuestra perspectiva el análisis molecular de la saliva de pacientes con PCRI, estaría permitiendo observar aspectos que no son posibles de evidenciar mediante la observación clínica y los exámenes complementarios. Dada la poca invasividad en la maniobra de la toma de muestra de este fluido y la relativa simplicidad en su análisis molecular, este tipo de estudio pudiese ser útil en: a) Comparar la composición molecular de la saliva parotídea de glándulas sintomáticas y asintomáticas al inicio del tratamiento y durante la mantención terapéutica; y b) Comparar la composición molecular de la saliva parotídea de glándulas sintomáticas y asintomáticas de pacientes sometidos a distintos esquemas terapéuticos.

CONCLUSIONES

La saliva parotídea de pacientes con parotiditis crónica recurrente infantil presenta actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 en ambas glándulas, independientemente de si la modalidad clínica de la patología que presentan es unilateral o bilateral.

La frecuencia de las formas activas y latentes de las metaloproteinasas 2 y 9 analizadas en saliva parotídea de pacientes PCRI, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre aquellas muestras tomadas de glándulas asintomáticas y de glándulas comprometidas clínicamente. Asimismo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la actividad enzimática de las metaloproteinasas estudiadas en saliva proveniente de parótidas comprometidas clínicamente y parótidas asintomáticas.

Pese a lo anterior, se observó una tendencia a una mayor frecuencia y actividad enzimática en la saliva de glándulas comprometidas respecto a la saliva de glándulas asintomáticas.

SUGERENCIAS

En base a nuestros resultados, sería interesante determinar si un aumento del universo de pacientes con PCRI unilateral y bilateral pudiese mostrar una diferencia más clara en la frecuencia y actividad enzimática metaloproteasa en la saliva proveniente de glándulas comprometidas *versus* glándulas clínicamente sanas.

Por otra parte, realizar un análisis molecular de la saliva parotídea en pacientes con PCRI al momento del ingreso al Servicio Hospitalario y repetirlo durante los controles de mantención terapéutica, permitiría determinar si existe alguna evolución de la composición molecular de la saliva relacionada al tratamiento recibido.

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

De la misma manera, la realización de un estudio comparativo de la composición molecular de la saliva de pacientes con PCRI que están recibiendo diferentes esquemas terapéuticos, permitiría establecer si las maniobras de mantención se relacionan con la presencia de las moléculas salivales detectadas en nuestro estudio.

RESUMEN

La Parotiditis Crónica Recurrente Infantil (PCRI) es una inflamación recurrente y dolorosa, de etiología aún no dilucidada de la glándula parótida asociada a sialectasia no obstructiva. Generalmente, se inicia alrededor de los 2 años de edad y se mantiene hasta la adolescencia. Estudios anteriores han demostrado la presencia de metaloproteinasas 2 y 9 en la saliva parotídea de pacientes con PCRI. En este estudio, trabajo se propuso analizar la frecuencia y actividad enzimática de las formas activas y latentes de dichas metaloproteinasas.

En 32 pacientes con PCRI de 4 a 13 años, se recolectó saliva parotídea y se analizó mediante cuantificación de proteínas por el método de Bramhall para posteriormente determinar la actividad metaloproteinasa 2 y 9 mediante zimografía en presencia de gelatina. Se registró el compromiso clínico y sialográfico de ambas glándulas parótidas y se les correlacionó con la frecuencia y actividad enzimática de las formas activas y latentes de las metaloproteinasas en cuestión.

La saliva parotídea de los pacientes con PCRI, presentó una tendencia a una mayor frecuencia y actividad enzimática de las metaloproteinasas 2 y 9 de la saliva proveniente de glándulas comprometidas clínica y sialográficamente respecto de la

saliva proveniente de glándulas asintomáticas. Sin embargo, no hubo diferencia estadística entre estos dos tipos de saliva para ninguno de los parámetros medidos.

La presencia de las formas activas y latentes de las metaloproteinasas 2 y 9 en saliva proveniente de glándulas asintomáticas de los pacientes PCRI unilateral, sugiere que existe una modalidad subclínica de esta patología afectando a dichas parótidas.

Estudios posteriores con un número mayor de muestras, realizados en pacientes con distintos esquemas terapéuticos, al inicio y durante el tratamiento, serían interesantes para poder determinar de manera mas clara la diferencia entre la frecuencia y actividad enzimática metaloproteasa en la saliva proveniente de glándulas comprometidas *versus* glándulas clínicamente sanas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Chitre VV., 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 Maxillofac Surg. 2004; 62(8):1010-8.
- 3) 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 2003, 74(3):269-276.
- 4) 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.
- 5) Kolho KL, Saarinen R, Paju A, Stenman J, Stenman UH, Pitkaranta A. New insights into juvenile parotitis. Acta Paediatr. 2005; 94(11):1566-70
- 6) Shkalim V, Monselise Y, Mosseri R, Finkelstein Y, Garty BZ. Recurrent parotitis in selective IgA deficiency. Pediatr Allergy Immunol. 2004;15(3):281-3

- 7) 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.
- 8) Ericson S, Zetterlund B, Ohman J. Recurrent parotitis and sialectasis in childhood. Clinical, radiologic, immunologic, bacteriologic, and histologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1991; 100(7):527-35.
- 9) Nahlieli O., Shacham R., Shlesinger M., Eliav E. Juvenile recurrent parotitis: a new method of diagnosis and treatment. *Pediatrics.* 2004; 114(1):9-12.
- 10) 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.* 1998; 86(5):606-15.
- 11) Ussmuller J, Donath K. Clinical, histopathologic and immunohistochemical studies of chronic sialectatic parotitis in childhood and adolescence. *Klin Padiatr.* 1999; 211(3):165-71.
- 12) Nazar M., Iñiguez F.O., Der M C., Méndez C., García C., Arce J., Díazalesnik E. Parotiditis aguda recurrente en el niño. *Revista Chilena de Pediatría* 2001,72(5):437-442.

- 13) Mandel L, Bijoor R. Imaging (computed tomography, magnetic resonance imaging, ultrasound, sialography) in a case of recurrent parotitis in children. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64(6):984-8.
- 14) Leerdam CM, Martin HC, Isaacs D. Recurrent parotitis of childhood. *J Paediatr Child Health.* 2005; 41(12):631-4
- 15) Encina S, Ernst P, Villanueva J, Pizarro E. Ultrasonography: a complement to sialography in recurrent chronic childhood parotitis *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 1996; 97(5):258-63.
- 16) Rosti3n C.G., Giuliano C., Acosta S. Parotiditis cr3nica recurrente en el ni1o. *Rev. chil. pediatr.* 2004, 75(1):43-47.
- 17) Concheiro A., Bellver E., Garrido R., Garcia F. Chronic recurrent parotitis in childhood. *An Esp Pediatr.* 2000; 53(5):418-21.
- 18) Isaacs D. Recurrent parotitis. *J Paediatr Child Health.* 2002; 38(1):92-4.
- 19) Moody A.B., Avery C.M., Walsh S., Sneddon K., Langdon J.D. Surgical management of chronic parotid disease. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 38(6):620-622.
- 20) 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.

- 21) 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.* 1978; 7(2):91-9.
- 22) Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line.
J Cell Physiol. 1997; 171(2):117-24.
- 23) 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.* 1998; 17(8-9):657-65
- 24) 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.* 2004; 345(1-2):99-104.
- 25) Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries.
J Dent Res. 2006; 85(1):22-32.
- 26) Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.
Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516

- 27) Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 30; 274(31):21491-4.
- 28) Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000.* 2003; 31:77-104
- 29) Nagase H, Brew K. Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res.* 2002; 4 Suppl 3:S51-61.
- 30) Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol.* 1995;248:496-510
- 31) 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
- 32) 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 metalloproteinases 1 ratios. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(9):2751-60.

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.* 2005; 40(3):199-207.

34) 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, 35(5):259-265

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.* 2006; 70(7):1155-8. Epub 2006 Jan 18.

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.* 2004; 113(6):1709-14.

- 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.* 2000; 128(6):585-92
- 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.* 2003; 72(25):2863-76
- 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.* 2004; 55(5):794-801. Epub 2004 Feb 18
- 40) 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
- 41) Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen 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
- 42) Watanabe M, Asatsuma M, Ikui A, Ikeda M, Yamada Y, Nomura S, Igarashi A. Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (MMPs) in saliva from patients with taste disorder. *Chem Senses.* 2005; 30(2):121-5.

- 43) Raitio A, Tuomas H, Kokkonen N, Salo T, Sorsa T, Hanemaaijer R, Oikarinen A. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smokers. *Arch Dermatol Res.* 2005; 297(6):242-8.
- 44) 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
- 45) Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137(3):322-9.
- 46) 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
- 47) Ogbureke KU, Fisher LW. Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands. *J Dent Res.* 2004; 83(9):664-70
- 48) 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.* 2004; 44(3):222-31.

- 49) Teymoortash A, Mandic R, Schrader C, Werner JA. Extracellular matrix molecules in chronic obstructive sialadenitis: an immunocytochemical and Western blot investigation. *J Oral Sci.* 2004; 46(4):227-33.
- 50) 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.* 2000; 43(12):2807-17.
- 51) López-Solís R.O., Morales-Bozo I., Aguilera S. Patrones de difusión de proteínas de la saliva humana. *Rev. Med. de Chile.* 1998; 126 (9):1065 – 1072.
- 52) 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.*
- 53) 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. Submitted to *Pediatrics Research*
- 54) 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* 1998,126(5):538-547.

- 55) Bramhall S., Noack N., Wu M., Loewenberg J.R. A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal. Biochem.* 1969; 31, 146-148.
- 56) 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.
- 57) 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.* 1970; 95. 425-432.
- 58) Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227, 680-685.
- 59) 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.* 2008 Jun 20.
- 60) Geterud A, Lindvall AM, Nylén O. Follow-up study of recurrent parotitis in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988;97(4 pt 1):341-346[Medline].
- 61) Watkin GT, Hobsley M. Natural history of patients with recurrent parotitis and punctate sialectasis. *Br J Surg* 1986;73:745-748.

62) Mandel L, Bijoor R. Imaging (computed tomography, magnetic resonance imaging, ultrasound, sialography) in a case of recurrent parotitis in children. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Jun;64(6):984-8.

63) Nayumi –shimizu, Jürgen Ubmüller, Karl Donath. Sonographic analysis of recurrent parotitis in children. A comparative study with sialographic findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86:606-615

64) Giglio MS, Landaeta M, Pinto ME: Microbiology of recurrent parotitis. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:386-90.

65) Rosti3n C, Giuliano C, Acosta S. Parotiditis Cr3nica Recurrente del Ni3o. *Rev Chil Pediatr* 75 (1); 43-47, 2004.

66) Arregui R, Tamblay N, Esquivel P. Caso cl3nico: Un tratamiento alternativo a la parotiditis cr3nica. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 2008; 68: 43-48

67) Rubaltelli L, Sponga T: Infantile recurrent sialectatic parotitis: the role of sonography and sialography in diagnosis and follow-up. *Br J Radiol* 1987; 60:1211-4

68) D. J. Cockrell and P. G. Rout. An adverse reaction following sialography
Dentomaxillofac. Radiol. 1993 22: 41-42.

69) Ozdemir D, Polat NT, Polat S. Lipiodol UF retention in dental sialography. *Br J Radiol.* 2004 Dec;77(924):1040-1.

70) Overall CM, McQuibban GA, Clark-Lewis I. Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics.

Biol Chem. 2002 Jul-Aug;383(7-8):1059-66.

71) 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. 2006 Nov 15;177(10):7312-21

72) Manicone A , McGuire J. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation.

Semin Cell Dev Biol. 2008 Feb;19(1):34-41