

# Correlación de hallazgos serológicos y compuestos orgánicos en saliva en el Síndrome de Sjögren

B. Busamia<sup>1</sup>, C. Gobbi<sup>3,4</sup>, M. Demarchi<sup>2</sup>, E. Albiero<sup>3</sup>, A. Finkelberg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Odontología U.N.C.

<sup>2</sup>Servicio de Laboratorio. Hospital Córdoba.

<sup>3</sup>Unidad de Reumatología del Hospital Córdoba y del Sanatorio Allende.

<sup>4</sup>Cátedra de Medicina II UHMI N°3. Facultad de Cs Médicas U.N.C.

## Resumen

**Introducción:** El objetivo del presente trabajo es evaluar los cambios en flujo y composición orgánica en saliva, así como la presencia de anticuerpos anti Ro/SSA y La/SSB séricos y salivales y su implicancia en el diagnóstico no invasivo del SS.

**Diseño del estudio:** Estudio de corte transversal, de 73 pacientes distribuidos en los siguientes grupos experimentales: Síndrome de Sjögren primario (SSp) (n = 15), SS secundario (SSs) (n = 17), boca seca y ojo seco sin Síndrome de Sjögren (BO) (n = 20), y controles sanos (C) (n = 21). Se realizó una determinación del flujo salival basal y una toma de muestras de saliva para la medición de proteínas totales, IgA, urea y anticuerpos. Se determinaron anticuerpos anti Ro/SSA y La/SSB en muestras de suero y saliva.

**Resultados:** El flujo salival en SSp, SSs, BO fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) comparado con C. La composición salival de SS mostró modificaciones de componentes estudiados. Los anticuerpos anti Ro/SSA y anti La/SSB aparecieron con mayor frecuencia en suero y saliva en pacientes con SS en comparación con BO y C, siendo la frecuencia de positividad superior en suero en comparación con saliva.

**Conclusión:** La determinación de anticuerpos Ro/SSA en saliva podrían ayudar a diagnosticar a pacientes con xerostomía como el Síndrome de Sjögren.

**Palabras clave:** Síndrome de Sjögren, anticuerpos Ro y La, xerostomía.

## Summary

**Introduction:** The aim of this study was to evaluate changes in flow and organic composition in saliva, the presence of anti Ro/SSA and La/SSB antibodies in serum and saliva and its implication in the noninvasive diagnosis of SS.

**Study Design:** Cross sectional study, 73 patients divided into four experimental groups: Primary Sjögren's syndrome (pSS) (n = 15), secondary SS (sSS) (n = 17), dry eye and dry mouth syndrome without Sjögren's (DEMS) (n = 20) and healthy controls (C) (n = 21). We performed a determination of basal salivary flow and saliva sampling for measurement of total protein, IgA, urea and antibodies. We determined anti Ro/SSA and La/SSB in serum and saliva.

**Results:** The salivary flow in pSS, sSS, DEMS patients was significantly lower ( $p < 0.001$ ) compared with C. The composition of SS salivary components studied showed changes. The anti Ro/SSA and anti La/SSB occurred more frequently in serum and saliva in SS patients compared with DEMS and C, the frequency of positivity was higher in serum than in saliva.

**Conclusion:** The determination in saliva of antibodies Ro/SSA may help diagnose patients with xerostomy as Sjögren's Syndrome.

**Key words:** Sjögren's Syndrome, anti Ro and La, xerostomy.

## Correspondencia

E-mail: beabusamia@hotmail.com

## Introducción

La saliva es un líquido de vital importancia para el mantenimiento de la salud oral, por lo que la disminución de su secreción constituye un problema importante de salud de los tejidos bucales por sus implicancias<sup>1</sup>. Gracias a su función inmunológica, se ha demostrado que la saliva es capaz de controlar infecciones como el herpes oral<sup>2</sup>, interviniendo además en una adecuada deglución, masticación, fonación, percepción del gusto, etc.<sup>3</sup>

La xerostomía es uno de los síntomas estomatológicos más frecuentes<sup>4</sup> y entre sus consecuencias están la producción de insomnio, irritabilidad, depresión y afectación de la calidad de vida del paciente. La sequedad bucal puede ser de origen unifactorial o multifactorial interviniendo en su aparición alteraciones hormonales, enfermedades autoinmunes, ingesta de fármacos, carencias nutricionales, procesos inflamatorios, edad avanzada, etc.<sup>5</sup>

Una de las causas más relevantes de xerostomía es el Síndrome de Sjögren (SS), caracterizado por un trastorno crónico que causa sequedad de las mucosas, principalmente bucal y ocular, debido a un desorden en el tejido conectivo con disminución o ausencia de secreciones glandulares<sup>6,7</sup>.

En la actualidad, uno de los criterios que conducen al diagnóstico certero de la enfermedad, se obtiene a través de biopsia de glándulas salivales menores lo que constituye una técnica invasiva<sup>7</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue analizar y determinar flujo salival y tasas de componentes orgánicos salivales. Se estudió la frecuencia de positividad de anticuerpos anti Ro/SSA y La/SSB en pacientes con xerostomía de diferente etiología, y evaluamos la misma como método de diagnóstico de Síndrome de Sjögren.

## Material y métodos

### *Pacientes*

Se analizaron un total de 73 pacientes, apareados por sexo y edad, 32 con SS (15 presentaron SS primario –SSp–) y 17 SS secundario (SSs), 20 pacientes con boca y ojo seco, con colagenopatía sin criterios de SS (sicca) y 21 controles sanos (C). Todos fueron atendidos en la Unidad de Reumatología del Sanatorio Allende y Hospital Córdoba entre enero del 2005 y enero del 2007. Para el diagnóstico del SS primario y secundario, se emplearon los criterios de consenso del grupo Europeo Americano de Reumatología<sup>8</sup>. Se establecieron como criterios de exclusión pacientes que estuvieran sometidos a quimioterapia o radioterapia en la región cra-

neofacial, con tumores en región de cabeza y cuello, con desórdenes psiquiátricos, con alteraciones metabólicas o ingesta de fármacos, o con Hepatitis C. Se les realizó historias clínicas completas y una exploración de la cavidad oral. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Sanatorio Allende (CIEIS), siguiendo los lineamientos de la Asociación Médica Internacional. En todo el estudio se respetaron las normas de ética para las investigaciones en humanos delineadas por la Declaración de Nüremberg, Helsinki, Tokio y de la Asociación Médica Mundial.

### *Métodos*

En todos los pacientes, previo enjuague con agua destilada, se recogieron por la mañana en ayunas, muestras de saliva basal, durante 10 minutos, que fueron pesadas en balanza de precisión (Metler), determinándose un valor de flujo mediante la fórmula miligramo equivalente a mililitro por minuto, dividiéndose este valor por 10 y obteniéndose así el flujo en ml por minuto. Las muestras se conservaron a 4°C. Se realizó el análisis bioquímico de los compuestos orgánicos: proteínas totales por determinación colorimétrica de Folin Ciocalteu, IgA secretoria por inmunodifusión radial en agar y urea por cuantificación espectrofotométrica<sup>9</sup>.

Se practicó una extracción de sangre venosa para la determinación de anticuerpos anti-Ro/SSA y La/SSB, también evaluados en saliva. La detección de estos anticuerpos se realizó por enzimo-inmunoensayo de origen comercial (Orgentec de procedencia Alemania). Se utilizaron placas previamente inmunizadas con los antígenos SS-A y SS-B. Las muestras fueron diluidas 1:100 en buffer Tris, NaN<sup>3</sup> (0,1% (w/w) e incubadas con el antígeno. Posteriormente, los componentes séricos inespecíficos se eliminaron mediante lavado (PBS, NaN<sup>3</sup>:0,1% w/w). Se utilizaron anticuerpos anti IgG Ro y anti IgA La humanos conjugados con peroxidasa; la medición se realizó en un lector de ELISA. Las muestras de los pacientes con valores de densidad óptica mayor a la de los estándares fueron consideradas positivas (el promedio de las densidades ópticas de las salivas normales + 2 desviaciones estándar establece el valor tope por arriba del cual una saliva problema se considera positiva).

Del total de pacientes con xerostomía, se les practicó biopsias a 31 pacientes de los cuales 10 fueron negativas.

### *Análisis estadísticos*

El análisis estadístico se realizó mediante Test "T" de Student para datos independientes, estableciéndose un valor

de  $p < 0,05$  para la consideración de una comparación como estadísticamente significativa. Para valorar concordancia entre grados de biopsia y anticuerpos en saliva y suero se utilizó el estadístico Tau-b de Kendall (por ser las variables cualitativas ordinales).

## Resultados

Del total de pacientes, 86% fueron mujeres, la edad promedio fue de 53 años y la evolución media de la enfermedad de 9 años. Al comparar los grupos estudiados, los valores del flujo salival fueron de  $0,36 \pm 0,05$  ml/min en el grupo sicca,  $0,22 \pm 0,003$  en SSP,  $0,32 \pm 0,05$  en SSs y  $1,04 \pm 0,1$  en el grupo C (Tabla 1). Se observa una significativa disminución ( $p < 0,001$ ) del flujo basal de los pacientes con sicca, SSP y SSs en relación al grupo C (Figura 1). El análisis de los compuestos orgánicos reveló un aumento en las proteínas totales en sicca, SSP y SSs ( $p < 0,001$ ) en relación a C. Los niveles de urea se comportaron diferentes, observándose una disminución en SSs en relación a los demás grupos de estudio. La IgA secretoria mostró un incremento significativo sólo en SSs (Tabla 2).

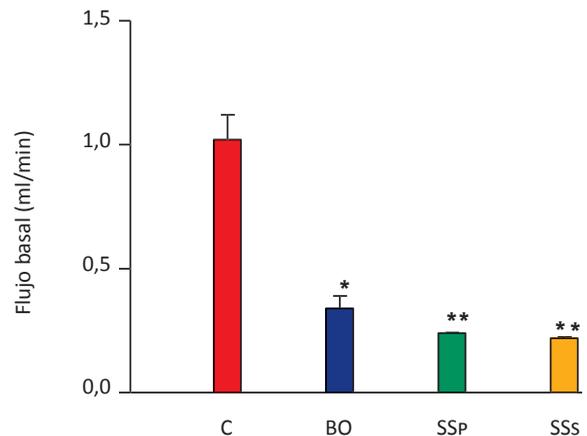
En la Tabla 3 se recoge el porcentaje de casos positivos para anticuerpos anti Ro/SSA y La/SSB en suero y saliva en los diferentes grupos de estudio.

Por otra parte, al realizar las comparaciones estadísticas entre los diferentes grupos, en función de la positividad para los anticuerpos anti Ro/SSA y La/SSB, medidos en suero y saliva, se observaron diferencias altamente significativas para el anticuerpo Ro, entre los pacientes con SS en relación a controles ( $p < 0,0001$ ). Igualmente estas diferencias se observaron para el anticuerpo La ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 3).

Se realizaron las pruebas de especificidad y sensibilidad, tomando la biopsia como parámetro de referencia. Encontramos que al evaluar la sensibilidad y especificidad del anticuerpo Ro en suero en relación con biopsia (Gold Standard), existe una alta especificidad (1) y una sensibilidad aceptable (0,71). Al evaluar la sensibilidad y especificidad del anticuerpo Ro en saliva en relación a biopsia, se observa que la misma no es específica (0) y presenta una sensibilidad

Grupo	Flujo basal (ml/min) media $\pm$ ES
Control	$1,02 \pm 0,1$
BO	$0,30 \pm 0,05$
SSp	$0,20 \pm 0,003$
SSs	$0,20 \pm 0,005$

**Tabla 1.** Flujo basal en los distintos grupos de estudio. Valores medios de flujo salival. Test no paramétrico de Wilcoxon.



**Figura 1.** Valores de flujo basal en diferentes grupos de estudio. Flujo basal en los diferentes grupos de estudio. C: control; BO: boca y ojo seco; SSP: Síndrome de Sjögren primario; SSs: Síndrome de Sjögren secundario.  $p < 0,05$ : BO vs. C;  $p < 0,01$ : SSP y SSs vs. C.

Grupo	Proteínas (mOsm/ml)	Urea (mOsm/ml)	IgA (mOsm/dl)
Control	$91 \pm 19$	$52 \pm 29$	$18 \pm 6$
BO	$143 \pm 45$	$39 \pm 18$	$20 \pm 11$
SSp	$163 \pm 35$	$36 \pm 19$	$24 \pm 12$
SSs	$177 \pm 43$	$17 \pm 3$	$38 \pm 43$

**Tabla 2.** Valores medios (error estándar) de cada compuesto orgánico estudiado.

Valores medios en los distintos grupos de estudio. C: control; BO: boca y ojo seco; SSP: Síndrome de Sjögren primario; SSs: Síndrome de Sjögren secundario.

Grupo	Origen	Suero		Saliva	
		Ro/SSB %	La/SSB %	Ro/SSA %	La/SSB %
SSp (n=17)		78	70	55	46
SSs (n=15)		70	65	48	40
BO (n=21)		10	5	0	0
C (n=20)		0	0	0	0

**Tabla 3.** Porcentaje de muestras que presentó positividad para los anticuerpos Ro y La en suero y saliva.

SSp: Síndrome de Sjögren primario; SSs: Síndrome de Sjögren secundario, BO: boca y ojo seco; C: control.

dad baja (0,59). El anticuerpo Ro en saliva en relación a suero obtiene una especificidad (0,90) y sensibilidad (0,87).

## Discusión

Es razonable creer que los cambios en la secreción salival así como las modificaciones en su composición proteica pro-

mueven el crecimiento de los microorganismos asociados a las condiciones más frecuentes encontradas en cavidad bucal (caries, gingivitis, infecciones de mucosas)<sup>10-12</sup>. Es sabido que los electrolitos son secretados dentro de la boca por las glándulas salivales, aunque la exudación de suero desde la mucosa oral injuriada también contribuye a las concentraciones de componentes orgánicos encontradas en la saliva. En los pacientes con SS se ha documentado un incremento en la tasa de albúmina salival debido a la inflamación de las glándulas salivales y al escape de suero a través de las membranas de mucosas fácilmente lesionadas por las agresiones mecánicas; éste podría constituir de igual forma el mecanismo que favorece las alteraciones electrolíticas salivares en el SS<sup>13,14</sup>.

En nuestro grupo control, la concentración de los componentes estudiados estuvo dentro de los límites normales. Por el contrario, en los otros grupos de pacientes se observaron modificaciones notables. Estudios previos<sup>15</sup> han documentado un incremento de las concentraciones orgánicas en saliva, nosotros detectamos aumentos significativos de proteínas totales analizadas de pacientes con xerostomía. Este aumento proteico se correlaciona con la disminución de urea encontrada sobre todo en SSs. Si bien en este estudio no se realizó electroforesis de saliva que permitiera evaluar cuáles proteínas estaban elevadas, es factible que ocurra una situación similar a la hipergammaglobulinemia policlonal encontrada en suero, reflejo directo de la hiperactividad linfocitaria característica de la enfermedad<sup>16,17,18</sup>.

La inmunoglobulina A secretoria mostró un aumento significativo en SSs. Algunos estudios en pacientes con SS demuestran aumentos en saliva de IgA, lisozima, lactoferrina que actuarían como marcadores de inflamación glandular<sup>18</sup>. Se ha demostrado que la IgA tiene un papel importante en la etiopatogenia del SS<sup>19</sup>. En el caso de SS podría interpretarse que, a pesar del daño glandular a nivel de conductos, los acinos permanecerían intactos para su función de secreción de proteínas en la saliva primaria.

En general, nuestros hallazgos en la concentración salival de componentes orgánicos analizados ponen en manifiesto que los trastornos son más acentuados en SSp, y

SSs en comparación con los controles y con el grupo BO. Esto podría conferir un valor a la determinación sialoquímica en saliva como marcadores de SS.

En relación al estudio del perfil de anticuerpos anti Ro/SSA y La/SSB, hemos observado un notable incremento de la positividad para anticuerpos tanto en suero como en saliva en SSp y en SSs en comparación con controles y con el grupo de pacientes con hiposalivación no relacionado con SS. El diagnóstico definitivo del SS se realiza por una biopsia de glándula salival menor en el labio<sup>19,20</sup>.

Al comparar la medición del anticuerpo Ro en saliva en relación a Ro suero se obtiene una especificidad (0,90) y sensibilidad (0,87) aceptable para determinar que el Ro en saliva podría ser una prueba diagnóstica, por lo tanto nuestros resultados apuntarían hacia nuevas herramientas, como la determinación de anticuerpos Ro/SSA en saliva, que podrían ayudar a diagnosticar a pacientes con xerostomía como el Síndrome de Sjögren evitando las técnicas invasivas como las biopsias. Se necesitarían realizar mayor cantidad de determinaciones salivales de anticuerpos para confirmar nuestros estudios.

## Bibliografía

1. Amerongen AV, Veerman EC. Saliva- the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*. 2000; 8:12-22.
2. Cohen-Brown G, Ship JA. Diagnosis and treatment of salivary gland disorders. *Quintessence Int*. 2004; 35:108-23.
3. Atkinson JC, Grisius M, Massey W. Salivary Hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment. *Dent Clin North Am*. 2005; 49:309-26.
4. Per SR, Scully C, Hegarty AM. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol & Endod*. 2004; 97:28-46.
5. Ghezzi EM, Wagner Lange LA, Schork MA, Metter EJ, Baum BJ, Streckfus CF et al. Longitudinal influence of age, menopause, hormona replacement therapy, and other medications on parotid flow rates in healthy women. *Journal of gerontology. Medical Sciences*. 2000; 55:34-42.
6. Garcia-Carrasco M, Fuentes-Alexandro S, Escarcega RO, Salgado G, Riebeling C, Cervera R. Pathophysiology of Sjögren's Syndrome. *Arch Med Res*. 2006; 37:921-32.
7. Mavragani CP, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM The management of Sjögren's syndrome. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006; 2:252-61.
8. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Carsons SE, et al. Classification criteria for

Anticuerpo	Muestra	Gold Standard	Especificidad	Sensibilidad
RO	Suero	Biopsia	1,00	0,71
	Saliva	Biopsia	0,00	0,59
		Ro suero	0,90	0,87
LA	Suero	Biopsia	0,00	0,57
	Saliva	Biopsia	0,00	0,61
		La suero	0,71	0,65

**Tabla 4.** Pruebas de sensibilidad y especificidad.

- Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61:76-85.
9. Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med*. 1990; 19:119-25.
  10. Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res*. 1998; 32:456-62.
  11. Brown LR, Dreizen S, Daly TE, Drane JB, Handler S, Riggan LJ, et al. Interrelations of oral microorganisms, immunoglobulins, and dental caries following radiotherapy. *J Dent Res*. 1978; 57:882-93.
  12. Cowman RA, Baron SS, Glassman AH, Davis ME, Strosberg AM. Changes in protein composition of saliva from radiation induced xerostomia patients and its effect on growth of oral streptococci. *J Dent Res*. 1983; 62:336-40.
  13. Almstål A, Wikström M, Groenink J. Lactoferrin amylase and MUC5B and their relation to the oral microflora at hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol*. 2001; 16:345-52.
  14. Sewon LA, Karjalainen SM, Soderling E, Lapinleimu H, Simell O.M Associations between salivary calcium and oral health. *J Clin Periodontol*. 1998; 25:915-9.
  15. Margaix-Muñoz M, Bagán JV, Poveda R, Jiménez Y, Sarrión G. Sjögren's syndrome of the oral cavity. Review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; 14:325-30.
  16. Skopouli F, Dafni U, Ionnidis, et al. Clinical evolution, and morbidity and mortality of Primary Sjögren's Syndrome. *Semin Arthritis Rheum*. 2000; 29:296-304.
  17. Malaviya AN, Kaushik P, Budhiraja S, et al. Hypergammaglobulinemic purpura of Waldenström: Report of 3 cases with a short review. *Clin Exp Rheumatol*. 2000; 18:518-22.
  18. Ramos – Casals, Fernandez M, Garcia-Carrasco C. Prevalencia y significado clínico de la hipergammaglobulinemia en pacientes con SSP. *Rev Esp Reumatol*. 2001; 8 (supple):147.
  19. Sule Y, Ebru T, Muge B, Ronca M, Sezen F. Comparative Analysis of Autoantibodies against alpha fodrin in Serum, Tear Fluid, and Saliva from Patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2006; 33:289-92.
  20. Margaix-Muñoz M, Bagán JV, Poveda R, Jiménez Y, Sarrión G. Sjögren's syndrome of the oral cavity. Review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; 14:E325-30.