

ENFERMEDAD PERIODONTAL PROGRESIVA: ESTUDIO DE DOS BIOMARCADORES SALIVALES

Baudo Judith, Tosti Sonia, CechoAnalía, Mazzeo Dominga, Allegretti Patricia

Facultad de Odontología – Universidad Nacional de La Plata. 50 e/ 1 y 115 La Plata (1900)

Directora | Prof. Dr. ALEGRETTI Patricia - drabaudo@yahoo.com.ar

“Sin conflicto de interés”

Resumen

La IL-1 y el TNF- α son potentes estimuladores de reabsorción ósea. El objetivo es la identificación de IL-1 y TNF- α en saliva de pacientes con enfermedad periodontal, en fases operatoria y mantenimiento. Se tomó una muestra de 30 individuos enfermos periodontales. Se realizó historia clínica, seriada periapical, índice de placa y medición de la profundidad de la bolsa periodontal. Se recogieron muestras de saliva que se estudiaron por cromatografía gaseosa identificando niveles de IL-1 y TNF- α . Etapa operatoria el índice de placa fue 72% leve y 18% moderado. Los niveles de IL-1 fueron de 618 pg/mL y los niveles del TNF- α 55,29 pg/mL. Etapa de mantenimiento el índice de placa fue 69% leve y 21% moderado. En los 23 pacientes con índice de placa leve y sin sangrado al sondaje los niveles de IL-1 fueron de 583,11 pg/mL y los del TNF- α 47,48 pg/mL. En los 7 pacientes con índice de placa moderado y sangrado al sondaje el nivel de IL-1 fue de 887,36 y los del TNF- α 101 pg/mL y recidiva de la enfermedad. Los resultados obtenidos evidencian el valor de los biomarcadores como factor determinante al momento de establecer su incidencia en la gravedad de la enfermedad periodontal.

Palabras claves: Enfermedad periodontal – Saliva – Biomarcadores

Summary

IL-1 and TNF- α are potent stimulators of bone resorption. The objective is the identification of IL-1 and TNF- α in saliva of patients with disease periodontal, in phases operative and maintenance. A sample of 30 periodontal diseased individuals was taken. Is made history clinical, serial periapical, index of plate and measuring of the depth of the bag periodontal. It collected samples of saliva that is studied by chromatography gas identifying levels of IL-1 and TNF- α . Stage operation the index of plate was 72% mild and 18% moderate. 618 pg/mL and the levels of TNF- α , IL-1 levels were 55,29pg/mL. Stage of maintenance the index of plate was 69% mild and 21% moderate. In those 23 patients with index of plate mild and without bleeding to the probing them levels of IL-1 were of 583,11pg / mL and those of the TNF- α 47,48 pg / mL. In 7 patients with plaque index moderated and bleeding on probing IL-1 level was 887,36 and TNF- α 101 pg/mL and recurrence of the disease. Them results obtained demonstrate the value of them biomarkers as factor determinant to the moment of establish its incidence in the gravity of the disease periodontal.

Keywords: Periodontal disease – Saliva – Biomarkers

Introducción

La periodontitis resulta de la interacción entre bacterias periodontopatógenas organizadas en la biopelícula subgingival y la respuesta inmune e inflamatoria del hospedero, y constituye la infección bacteriana más prevalente a nivel mundial. Algunos estudios revelan que 10-15% de los adultos a nivel mundial tienen periodontitis avanzada. La enfermedad periodontal puede contribuir a una disfunción severa de la salud oral, así como a un aumento de la susceptibilidad frente a otras enfermedades sistémicas. Adicionalmente, la infección e inflamación crónica del periodonto junto al aumento sostenido de los mediadores pro-inflamatorios pueden contribuir al desarrollo y/o progresión de patologías sistémicas, tales como diabetes, parto prematuro y bebés con bajo peso al nacer, enfermedad pulmonar, artritis y enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades periodontales pueden reflejarse en los fluidos orales a través de niveles elevados de enzimas proteolíticas destructivas derivadas de células y tejidos del hospedero, tales como las metaloproteinasas de matriz, elastasa de neutrófilos, mieloperoxidasa; mediadores proinflamatorios, como la proteína C reactiva, interleuquina 1, Factor de Necrosis Tumoral, proteína inflamatoria de macrófagos; y marcadores de remodelación ósea.

Las bacterias del biofilm tienen un protagonismo etiológico primario en la patogénesis de la periodontitis, intervienen en la formación de la bolsa periodontal, la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar. Pero ni su cantidad, ni la variedad de las especies, permiten explicar los diferentes grados de severidad que presenta la periodontitis en la población. Las respuestas inmunitarias a los microorganismos están dirigidas principalmente contra las enzimas y toxinas liberadas extracelularmente. Estas reacciones inmunitarias tienen como resultado una mayor liberación de citoquinas y mediadores proinflamatorios, que a su vez aumentarán la inflamación y de esta manera, serán más nocivos para el huésped. La IL-1 y el TNF-alfa son potentes estimuladores de la reabsorción ósea. Por lo tanto, una sobreproducción de cualquiera de estas dos citoquinas, provocada por la exposición a patógenos periodontales, puede ser uno de los mecanismos responsables de la destrucción del tejido periodontal. La interleuquina 1 (IL-1), controla la progresión y/o supresión de la respuesta inflamatoria. La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los

linfocitos T y B. Induce El TNF-alfa y el beta intervienen en la activación de los osteoclastos, estimulándolos para que causen reabsorción ósea. (1)(2)

Este trabajo tiene como objetivos identificar en muestras de saliva de pacientes con enfermedad periodontal, la presencia de IL-1 y TNF- α en las fases postoperatoria y mantenimiento, correlacionar la concentración en saliva de estos biomarcadores con parámetros clínicos periodontales (sangrado al sondaje, profundidad de la bolsa) y relacionar gravedad de la enfermedad / incremento de los biomarcadores

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio transversal con pacientes que concurren a la Asignatura de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata, con una muestra de 30 individuos con enfermedad periodontal en etapa operatoria y de mantenimiento. Los criterios de inclusión fueron: adultos mayores de 20 años – diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica – pacientes que no hayan recibido tratamiento periodontal – pacientes que tengan al menos un molar y un premolar por cuadrante. Los criterios de exclusión fueron: pacientes que padezcan enfermedades sistémicas – pacientes mujeres embarazadas, en período de lactancia o recibiendo terapia hormonal – pacientes que tomen medicamentos de forma crónica o que estén tomando antibióticos o antiinflamatorios – pacientes que presenten patología oral no relacionada con la enfermedad periodontal – pacientes que abandonen la investigación en la fase preoperatoria y/o postoperatoria.

Se caracterizó la muestra de acuerdo a las variables: sangrado al sondaje y profundidad de la bolsa.

■ A todos los integrantes de la muestra se les hizo conocer y firmar el consentimiento informado, previa aprobación del Comité de Bioética.

■ Se les realizó historia clínica, seriada periapical, índice de placa de Sillness y Loe que se utiliza para registrar la cantidad de placa bacteriana presente en la entrada del surco gingival utilizando un juego clínico y sonda periodontal convencionales. Medición de la profundidad de la bolsa periodontal que es la distancia del margen gingival a la unión epitelial por medio de una sonda de graduación variable.

■ Muestra de saliva: Se solicitó a los pacientes que enjuaguen su boca, que descarten el agua de enjuague y que saliven en un tubo de poliestireno. El enjuague bucal es esencial para prevenir la contaminación severa de la muestra con comida o sangre. Se recolectó 2 a 3 ml. La muestra se preservó de manera segura a temperatura ambiente agregando un biocida para prevenir la contaminación y el crecimiento bacteriano. Los tubos se pre-trataron con azida sódica al 0,1% para preservar la saliva. Se colocó 50ul de la solución de azida sódica con una pipeta en el fondo de los tubos y se dejó evaporar a temperatura ambiente. Una vez en el laboratorio las muestras fueron congeladas.

■ Las muestras fueron extraídas con éter etílico (3x5ml) y secadas sobre sulfato de sodio anhidro. Luego de filtradas se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso HP 5890 series II plus acoplado a un detector de espectrometría de masa HP 5972 bajo las siguientes condiciones: Columna: HP5-MS, 30m x 0,25 mm x 5 µm; Gas Portador: Helio.; Temperatura del inyector: 200° C.; Temperatura del horno: 40°C, 10° C/min., 200° C.; Temperatura de la interfase: 300° C.; Temperatura de la fuente iónica: 185° C.; La presión en el espectrómetro de masa, 10-5 torr, previene reacciones ión-molécula.; Energía del haz de electrones: 70 eV.

■ Cromatografía gaseosa: En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. La cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. Un cromatógrafo de gases consiste en varios módulos básicos ensamblados para: 1) proporcionar un gasto o flujo constante del gas transportador (fase móvil), 2) permitir la introducción de vapores de la muestra en la corriente de gas que fluye, 3) contener la longitud apropiada de fase estacionaria, 4) mantener la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura), 5) detectar los componentes de la muestra conforme eluyen de la columna, y 6) proveer una señal legible proporcional en magnitud a la cantidad de cada componente. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto

cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados. La identificación de proteínas en medios biológicos complejos tales como la saliva también puede realizarse por espectrometría de masas o por electroforesis bidimensional con geles de poliacrilamida. Al evolucionar las tecnologías proteómicas, la habilidad de caracterizar proteínas poco abundantes será mejorada, conduciendo potencialmente a la identificación de biomarcadores proteicos más específicos y sensibles para enfermedades sistémicas y orales. En contraste con las tecnologías anteriores, que se enfocaban en una o dos proteínas seleccionadas como indicadores del estado de la enfermedad, los nuevos alcances incluyen perfiles proteómicos de saliva e investigación de patrones de expresión de biomarcadores. Con el genoma humano completo y la disponibilidad de técnicas de alta capacidad de procesamiento, el uso de transcritos de gen como indicadores del estado de salud o enfermedad permite la evaluación de una variedad de biomarcadores en un período de tiempo relativamente corto. Al avanzar las tecnologías necesarias para la identificación y detección de biomarcadores, el valor funcional de la saliva como fluido para diagnóstico será más aceptado.

Resultados

En la etapa operatoria, en los enfermos periodontales el índice de placa fue 72% (24) leve y 18% (6) moderado (Fig. 1). Los niveles de IL-1 fueron de $618 \pm 76,1$ pg/mL y los niveles del TNF- α 55,29 pg/mL (Fig. 2). En la etapa de mantenimiento el índice de placa fue 69% (23) leve y 21% (7) moderado (Fig. 3). En los 23 pacientes con índice de placa leve y sin sangrado al sondaje los niveles de IL-1 fueron de $583,11 \pm 97,3$ pg/mL y los del TNF- α $47,48 \pm 7$ pg/mL (Fig. 4). En los 7 pacientes con índice de placa moderado y sangrado al sondaje el nivel de IL-1 fue de $887,36 \pm 84,2$ y los del TNF- α 101 pg/mL.

Figura 1 | índice de placa etapa operatoria



Discusión

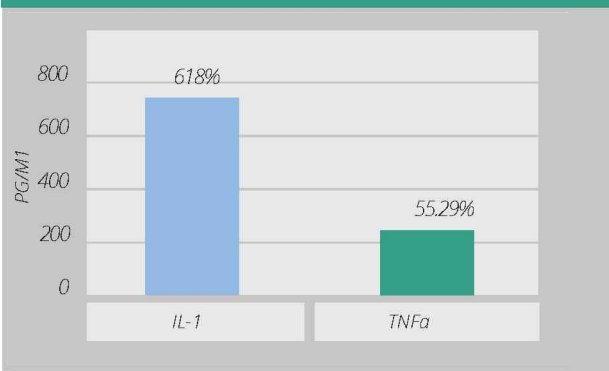
Si bien las bacterias y sus productos son las iniciadoras de la enfermedad periodontal, las citoquinas juegan un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas. La enfermedad periodontal se caracteriza por ser un proceso inflamatorio destructivo que afecta las estructuras de soporte del diente. Las citoquinas proinflamatorias como la IL-1, el TNF- α y el interferón gamma son considerados los principales mediadores de inflamación crónica, incluida la periodontitis. (3)

Los pacientes con enfermedad periodontal presentan un incremento de los niveles séricos de marcadores inflamatorios como la IL-1, la IL-6 y la TNF- α . Estos marcadores se han correlacionado en varios estudios epidemiológicos con un aumento del riesgo cardiovascular. (4)

como la IL-1, la IL-6 y la TNF- α . Estos marcadores se han correlacionado en varios estudios epidemiológicos con un aumento del riesgo cardiovascular. (4)

En el estudio, todos los sujetos evaluados presentaron niveles de citoquinas proinflamatorias en las muestras estudiadas. La IL-1 como mediador de defensa, conglogera a los neutrófilos en el sitio de la inflamación, y cuando existe una sobreproducción de ésta molécula, actúa como un mediador de destrucción de los tejidos por la exacerbación que produce cuando se encuentra en concentraciones elevadas. (5) En cuanto al TNF- α , una correlación significativa fue evidenciada en los resultados de este trabajo, probablemente debido a que esta es la que desencadena la cascada de producción de citoquinas proinflamatorias, involucradas en diversos procesos inflamatorios.

Figura 2 | Biomarcadores salivales en etapa operatoria



Conclusión

Los resultados obtenidos evidencian el valor de los biomarcadores como factor determinante al momento de establecer su incidencia en la gravedad de la enfermedad periodontal. Hemos hallado en este estudio un aumento significativo de los marcadores en el grupo de enfermos periodontales respecto al grupo control. En la etapa de mantenimiento 7 pacientes presentaron niveles altos de los biomarcadores y recidiva de la enfermedad.

Figura 3 | Índice de placa etapa de mantenimiento

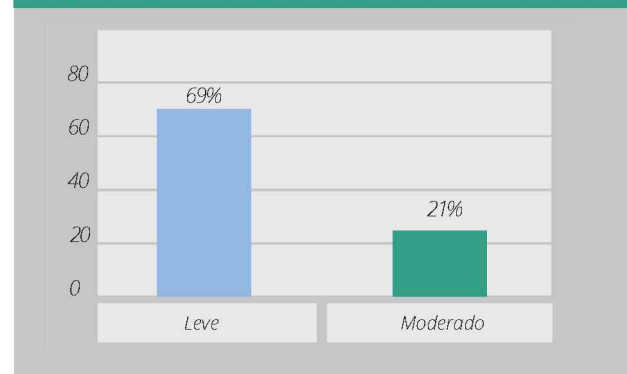
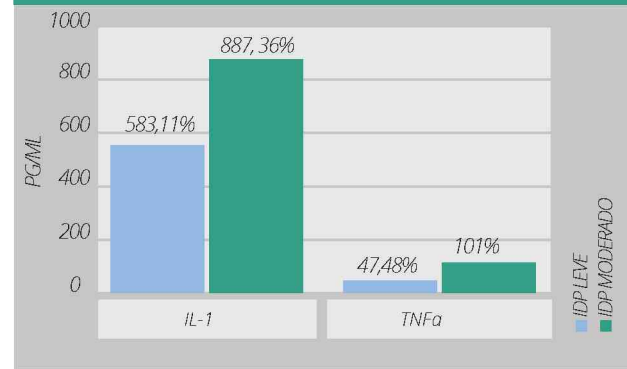


Fig. 4 | Biomarcadores salivales etapa de mantenimiento



Referencias Bibliográficas

- Díaz Caballero A, Arévalo Tovar L, Simancas Pallares M. Proteínas expresadas durante la periodontitis crónica. Revisión de la literatura. Avances en Periodoncia vol.23 no.2 Madrid Ago. 2011
- Botero J, Bedoya E. Determinantes del Diagnóstico Periodontal. Revista Clínica Periodoncia Implantol. Rehab. Oral. 2010; 3(2): 94-99
- García Triana, B.E, et al. Principales proteínas salivales. Revista Habanera de Ciencias Médicas Vol.11 N°4 sep.dic.2012
- Pretel-Tinoco C, Chávez Reátegui B. Enfermedad periodontal como factor de riesgo de condiciones sistémicas. Rev. Estomatol Herediana 2013 Oct-Dic; 23 (4): 223-9
- Ávila A D, Martínez M. E, López S, y Col. Esterasa Leucocitaria e Interleudina 1 beta en Fluido CrevicularGingival. Revista ADM 2009; 155(2):48-59 URL disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2009/od092h.pdf>