

# IL-1 y TNF $\alpha$ como biomarcadores salivares de enfermedad periodontal

Baudo Judith, Tosti Sonia, Mazzeo Dominga, Cecho Analía, Allegretti Patricia

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

Director | Allegretti P - drabaudo@yahoo.com.ar

Fuente de apoyo financiero | UNLP

“Sin conflicto de interés”

## Resumen

La enfermedad periodontal es una infección crónica de origen bacteriano. La IL-1 y el TNF- $\alpha$  son potentes estimuladores de reabsorción ósea. El objetivo del trabajo es la identificación de IL-1 y TNF- $\alpha$  en saliva de pacientes con enfermedad periodontal, en fase preoperatoria correlacionando su concentración con parámetros clínicos. Se tomó una muestra de 60 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- $\alpha$ . El índice de placa fue moderado en el 75% (45) y severo en el 25% (15). Movilidad dentaria grado 1 en el 25% (15) con bolsas de 4 mm y sangrado al sondaje y grado 2 en el 75% (45) con bolsas mayores de 4 mm y sangrado al sondaje. El estudio de la saliva recolectada en los pacientes fue analizado por cromatografía gaseosa, los niveles de IL-1 y TNF- $\alpha$  fueron: IL-1  $825,17 \pm 83,7$  pg/mL y el TNF- $\alpha$   $96,52$  pg/mL. Sólo estudios bien diseñados en poblaciones humanas que generen niveles de evidencia científica aceptable, podrán llegar a cambiar los modelos actuales del tratamiento de la enfermedad periodontal.

**Palabras Clave | Enfermedad periodontal – Saliva – Biomarcadores**

## Summary

Periodontal disease is a chronic infection of bacterial origin. IL-1 and TNF- $\alpha$  are potent stimulators of bone resorption. The objective of the study is the identification of IL-1 and TNF- $\alpha$  in saliva of patients with periodontal disease, during preoperative correlating its concentration with clinical parameters. A sample of 60 periodontal diseased individuals was taken. He was history, serial periapical, plaque index and measurement of the depth of the periodontal pocket. Samples of saliva, which were studied by gas chromatography identifying levels of IL-1 and TNF- $\alpha$ , were collected. Plaque index was moderated in 75% (45) and severe in 25% (15). Tooth mobility grade 1 in 25% (15) bags of 4 mm and bleeding after probing and grade 2 in 75% (45) with bags of 4 mm and bleeding on probing. The study of saliva collected in patients was analysed by gas chromatography, levels of IL-1 and TNF- $\alpha$  were IL-1  $825,17 \pm 83,7$  pg/mL and TNF- $\alpha$   $96,52$  pg/mL. Only well designed studies in human populations that generate levels of acceptable scientific evidence, can reach change current models of treatment of periodontal disease.

**Key words | Enfermedad periodontal – Saliva – Biomarcadores**

## Introducción

La enfermedad periodontal es un trastorno que afecta las estructuras de inserción del diente y se caracteriza por una exposición bacteriana que puede fomentar una respuesta destructiva del huésped, lo que lleva a la pérdida de inserción periodontal, ósea y por último la posible pérdida de los dientes. La presencia de esta comunidad de bacterias adheridas a los tejidos duros, como pueden ser los dientes, recibe el término de biofilm. La acumulación de bacterias en la superficie limpia de los dientes, induce de manera reproducible una respuesta inflamatoria en los tejidos gingivales asociados. Esa inflamación local se mantiene en el tiempo, mientras continúe presente el biofilm. La eliminación de la placa bacteriana, conduce a la desaparición de los signos clínicos de inflamación. Por tanto, la gingivitis es un estado clínico no destructivo de la enfermedad periodontal.

El concepto actual de la etiología multifactorial de la enfermedad periodontal establece que ésta es producida por una interacción de un agente microbiano único o múltiple considerado como el factor etiológico primario necesario pero no suficiente, un huésped más o menos susceptible y unos factores de riesgo que influyen sobre ambos. Entre éstos se encuentran los biológicos que engloban a las enfermedades sistémicas tales como enfermedades cardiovasculares, pulmonares, diabetes, obesidad, enfermedades óseas, embarazo, etc. Otro grupo de factores de riesgo, son los basados en los comportamientos humanos o ambientales como la higiene oral, el estrés y/o el tabaco.

Otros factores de riesgo son los genéticos que se relacionan con la susceptibilidad del individuo para desarrollar la enfermedad. Los estudios de las variaciones hereditarias del sistema inmune son muy complejas, y el fenotipo observado es frecuentemente el resultado de múltiples influencias genéticas y medioambientales. Esto se observa especialmente en la respuesta del hospedador frente a bacterias Gram negativas y lipopolisacáridos, en la cual diferentes factores celulares y moleculares entran en juego. Existen determinados polimorfismos genéticos para dichos factores inmunoinflamatorios. Estos afectan tanto la respuesta cuantitativa (defectos estructurales de los genes) como la cualitativa inmunológica del hospedador (polimorfismos regulatorios). La IL-1, junto a otros productos bioquímicos, son los compuestos encargados de iniciar la destrucción en los tejidos de inserción del diente. Por tal motivo, la síntesis de IL-1 está notablemente relacionada con la severidad y progresión de la enfermedad periodontal.

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), citoquina producida por macrófagos, células B y células del epitelio escamoso, es un importante mediador inmunitario. Se asocia con la activación severa de las metaloproteinasas de la matriz extracelular que promueve la pérdida de los tejidos de sostén del diente. Mejora la producción de linfocinas, entre ellas el factor de crecimiento de células T (IL-2) y el factor activador de osteoclastos. Induce reacción de fase aguda y la activación y reconocimiento por parte de linfocitos T y macrófagos del lugar donde se desarrolla la respuesta inmunitaria. Actúa junto con el TNF en la inmunidad innata y la inflamación. Estas moléculas son liberadas en pequeñas cantidades y tienen diversas acciones sobre las células que llevan el receptor específico para las citoquinas. Estas sustancias son numerosas, tienen funciones que se superponen y están ligadas entre sí formando una red activa que controla la respuesta del huésped. El control de la liberación y acción de las citoquinas es complejo y depende de inhibidores y receptores. Muchas citoquinas son capaces de actuar sobre la célula que las produce (función autocrina), de manera que autoestimulan su propia producción y la producción de otras citoquinas. Otras son las paracrinas que se fijan a células próximas, mientras que también existen las endocrinas capaces de unirse a células distantes.

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-alfa) es una citoquina proinflamatoria e inmunomoduladora, es producido por macrófagos después de la estimulación ocasionada por elementos bacterianos gramnegativos, monocitos, linfocitos B y T, células NK, así como células no pertenecientes al sistema inmune como fibroblastos y queratinocitos. La liberación de TNF- $\alpha$  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 la diferenciación de osteoclastos, la resorción ósea y tiene actividad sinérgica con IL-1. Las funciones del TNF se deben a su unión a 2 receptores celulares diferentes que se localizan en diferentes células como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Su incremento ha sido detectado en localizaciones de pacientes con periodontitis, y está asociado a la destrucción y reabsorción ósea. TNF- beta, antes conocido como linfotoxina, es producido de

manera primaria por los linfocitos. 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- $\alpha$  en las fases preoperatorias, 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 60 individuos con enfermedad periodontal. 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 periodo 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 Löe 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.

■ El tratamiento periodontal de los pacientes estuvo a cargo del personal de la Asignatura de Periodoncia de la FOUNLP.

■ 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 50  $\mu$ l 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  $\mu$ m; 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. Estos avances científicos encierran grandes promesas para el desarrollo de la salud oral y sistémica. (1) (3) Las principales ventajas de la cromatografía de gases son: alta resolución, velocidad, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos. (López Valencia JP Estandarización de la técnica de cromatografía

de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos. 2008)

La identificación y caracterización de las proteínas es crucial en biología y hasta hace unos años era difícil por la falta de métodos analíticos rápidos y sensibles lo que limitaba los estudios relacionados con la biología molecular o la genómica. Se utilizaban técnicas fisicoquímicas o enzimáticas detectando los productos de reacción por espectrofotometría UV o fluorimetría, pero no resolvían satisfactoriamente el problema analítico. En los años noventa la incorporación de la MS permitió ir perfeccionando la información y en nuestros días, esta técnica tiene un papel trascendental en la identificación y caracterización de proteínas siendo actualmente la técnica de elección para el análisis de proteínas complejas.

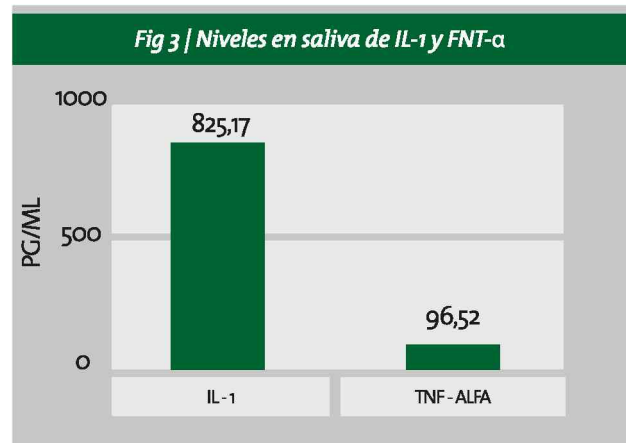
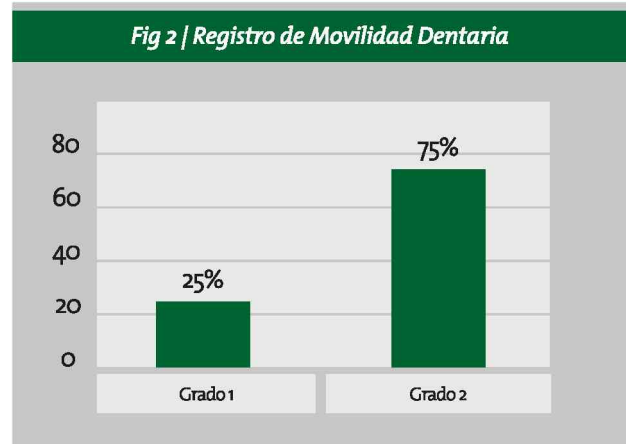
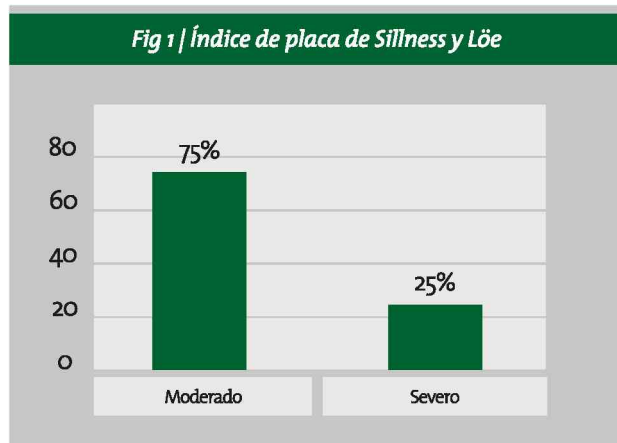
Las técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas, en combinación con la MS, son las herramientas fundamentales que actualmente se utilizan en la investigación de proteínas, o en proteómica, así como en otros campos relacionados con las «ómicas» (Martín Gómez MC, Ballesteros González M. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores 2010).

## Resultados

- En la muestra estudiada el índice de placa fue moderado en el 75% (45) y severo en el 25% (15). (Fig 1).

- Registro de movilidad dentaria grado 1 en el 25% (15) con bolsas de 4 mm, y sangrado al sondaje y grado 2 en el 75% (45) con bolsas mayores de 4 mm y sangrado al sondaje. (Fig. 2).

- El estudio de la saliva recolectada en los pacientes en etapa preoperatoria fue analizado por cromatografía gaseosa, los niveles de IL-1 y TNF- $\alpha$  fueron: IL-1  $825,17 \pm 83,7$  pg/mL y el TNF- $\alpha$   $96,52$  pg/mL (Fig. 3)



## 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-alfa 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- $\alpha$ . 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. Esto coincidió con los hallazgos reportados por Chiappelli y otros (5) en donde se detectaron niveles de citoquinas proinflamatorias en muestras de sangre y saliva de individuos normales. Esto se puede explicar, debido a que las citoquinas son mediadores solubles que controlan muchas funciones fisiológicas como la inflamación, entre otros procesos biológicos. En cuanto al TNF- $\alpha$ , 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.

Los niveles observados de IL-1 salival en las muestras evaluadas coinciden con lo reportado por Ulker y otros (6) quienes estudiaron los niveles de IL-1, en muestras de saliva en pacientes con gingivitis.

## Conclusiones

Es un hecho que los conocimientos generados en las tres últimas décadas con respecto a la etiopatogénesis de la enfermedad periodontal han contribuido a generar teorías, biológicamente plausibles, de cómo descubrir y controlar los estadios de enfermedad periodontal activa. Aunque son importantes estos esfuerzos para controlar la causa de la enfermedad también es necesario entender cómo el cuerpo humano reacciona ante este reto bacteriano. De esta respuesta pueden surgir varias alternativas de tratamiento con el fin de evitar un estadio inflamatorio prolongado que produzca la pérdida de sostén. Sólo estudios bien diseñados en poblaciones humanas que generen niveles de evidencia científica aceptable, podrán llegar a cambiar los modelos actuales del tratamiento de la enfermedad periodontal.

Los resultados de este proyecto, con muestra de saliva total, podrían formar parte de las estrategias de prevención de diagnóstico para el plan de tratamiento de patología bucal, pudiéndose emplear en hospitales y consultorios convencionales a través de marcadores biológicos, constituyéndose de esta manera en los nuevos paradigmas de tratamiento futuro de las enfermedades de la cavidad bucal.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 - 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
- 2 - Botero J, Bedoya E. Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Revista Clínica Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.* 2010; 3(2): 94-99
- 3 - Rotemberg Wif E, Smaisk Frydman K. Manifestaciones periodontales de los estados fisiológicos de la mujer. *Odontoestomatología* vol.11 no.13 Montevideo nov. 2009.
- 4 - 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
- 5 - Chiappelli F, Iribarren EJ, Prolo P. Salivary biomarkers in psychological medicine. *Bioinforma-tion.* 2006; 1(8):331-4.
- 6 - Ulker AE, Tuñunoglu O, Ozmeric N, Can M, Demirtas S. The evaluation of cystatin C, IL-1beta, and TNF-alpha levels in total saliva and gingival crevicular fluid from 11-to 16-year-old children. *J Periodontol.* 2008; 79(5):854-60

