

## SALIVA COMO FLUIDO DE DIAGNÓSTICO: MARCADORES DE DESTRUCCIÓN PERIODONTAL

### RESUMEN

*Baudo Judith;  
Tosti Sonia;  
Mazzeo Dominga;  
Cecho Analía;  
Allegretti Patricia;*

Facultad de odontología U.N.L.P.  
Calle 50 e/ 1 y 115. La Plata. CP: 1900.

[drabaudo@yahoo.com.ar](mailto:drabaudo@yahoo.com.ar)

Fuente de apoyo financiero: Universidad Nacional de La Plata

"Sin conflicto de interés".

**PALABRAS CLAVE**  
*Enfermedad periodontal  
Saliva  
Biomarcadores*

**KEYWORDS**  
*Periodontal disease  
Saliva  
Biomarkers*

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 y correlacionar su concentración con parámetros clínicos. Se tomó una muestra de 60 individuos, 30 enfermos periodontales y 30 control, sanos. Se realizó historia clínica, seriada periapical, índice de placa, medición de la profundidad de la bolsa periodontal y graduación de la movilidad dentaria. Se recogieron muestras de saliva que se estudiaron por cromatografía gaseosa identificando los niveles de IL-1 y TNF- $\alpha$ . En el grupo control el índice de placa fue leve en el 80% (24) y 20% (6) moderado. En los enfermos periodontales 30% (9) moderado y severo 70% (21). Movilidad dentaria grado 1 en el 24% (7) y 76% (23) grado 2. En el grupo control los niveles de IL-1 y TNF- $\alpha$  fueron de  $552,36 \pm 75,7$  pg/mL y  $43,56 \pm 6,44$  pg/mL respectivamente. En el grupo de enfermos periodontales IL-1  $876,21 \pm 95,7$  pg/mL y el TNF- $\alpha$   $98,43 \pm 7,31$  pg/mL. Se observaron niveles mayores en el grupo de enfermos periodontales en fase preoperatoria.

### 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, preoperative stage and correlate your concentration with clinical parameters. Took a sample of 60 individuals, 30 sick periodontal and 30 control, healthy itself. Clinical history, serial periapical, plaque index, measuring the depth of the periodontal pocket and tooth mobility graduation took place. Samples of saliva, which were studied by gas chromatography identifying levels of IL-1 and TNF- $\alpha$  were collected. In the control group the plaque index was slight in the 80% (24) and 20% (6) moderate. In the sick periodontal 30% (9) moderate and severe 70% (21). Tooth mobility grade 1 in 24% (7) and 76% (23) grade 2. In the group control levels of IL-1 and TNF- $\alpha$  were  $552,36 \pm 75.7$  pgmL and  $43,56 \pm 6,44$  pgmL respectively. In the group of patients periodontal IL-1  $876,21 \pm 95.7$  pgmL and TNF- $\alpha$   $98,43 \pm 7.31$  pgmL. There were higher levels in the group of periodontal patients in preoperative phase.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una infección de origen bacteriano, que cursa con un proceso inflamatorio de carácter crónico. Este proceso inflamatorio está desencadenado por un conjunto de bacterias presentes en la cavidad oral. 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.

También existen otra serie de factores etiológicos, denominados factores de riesgo, entre los que se encuentran los biológicos. Éstos, engloban a las enfermedades sistémicas tales como enfermedades cardiovasculares, pulmonares, diabetes, obesidad, enfermedades óseas, embarazo, etc. Un tercer grupo de factores de riesgo, son los basados en los comportamientos humanos o ambientales. Dentro de éstos, se encuentran: la higiene oral, el estrés y/o el tabaco. Otros factores de riesgo son los genéticos, los cuales se relacionan con la susceptibilidad del individuo para desarrollar la enfermedad. Se ha demostrado ampliamente, que las bacterias tienen un papel etiológico primario en la patogénesis de la periodontitis, participando en la formación de la bolsa periodontal, la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar. Pero ni la cantidad, ni la variedad de las especies, son capaces de ofrecer una explicación de los diferentes grados de severidad que presenta la periodontitis dentro de la población. Las respuestas inmunitarias a los microorganismos parecen estar 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. Mejora la producción de linfocinas, entre ellas el factor de crecimiento de células T (IL-2) y el factor activador de osteoclastos. La IL-2 estimula también la actividad funcional de macrófagos, modula la función y causa la proliferación de células Natural Killer (NK). Su concentración se ve aumentada en los tejidos periodontales durante la periodontitis. 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. 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 y correlacionar la concentración en saliva de estos biomarcadores con parámetros clínicos periodontales (sangrado al sondaje, profundidad de la bolsa).

## MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio transversal con pacientes que concurren a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata, con una muestra de 60 individuos, divididos en 2 grupos de 30 sujetos: un grupo de enfermos periodontales y otro de control, sanos. Los criterios de inclusión (grupo de enfermos periodontales) 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 - pacientes que participen voluntariamente en el estudio con firma del consentimiento informado. Los criterios de inclusión (grupo control) fueron: ausencia de enfermedad periodontal determinada por ausencia de bolsa, de pérdida de inserción y de reabsorción ósea. Los criterios de exclusión (comunes a los dos grupos) serán: 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, profundidad de la bolsa y movilidad dentaria.***

- A todos los integrantes de la muestra 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. Registro de movilidad dentaria: grado 1: movilidad menor a 1 mm en sentido vestibulo lingual; grado 2: movilidad de 1 a 2 mm en sentido vestibulo lingual; y grado 3: movilidad en sentido vestibulo lingual y ocluso-apical.

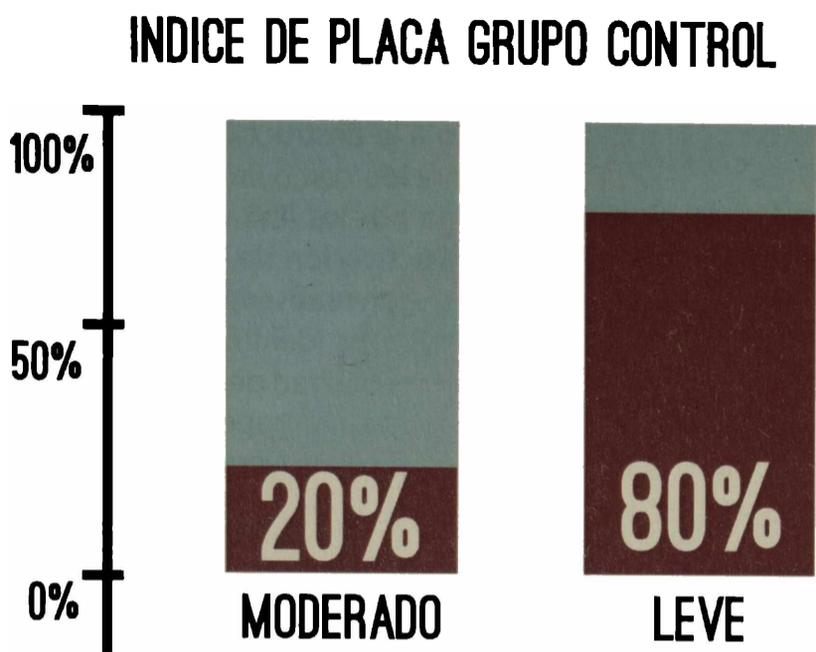


Fig. 1- Índice de placa en el grupo control.

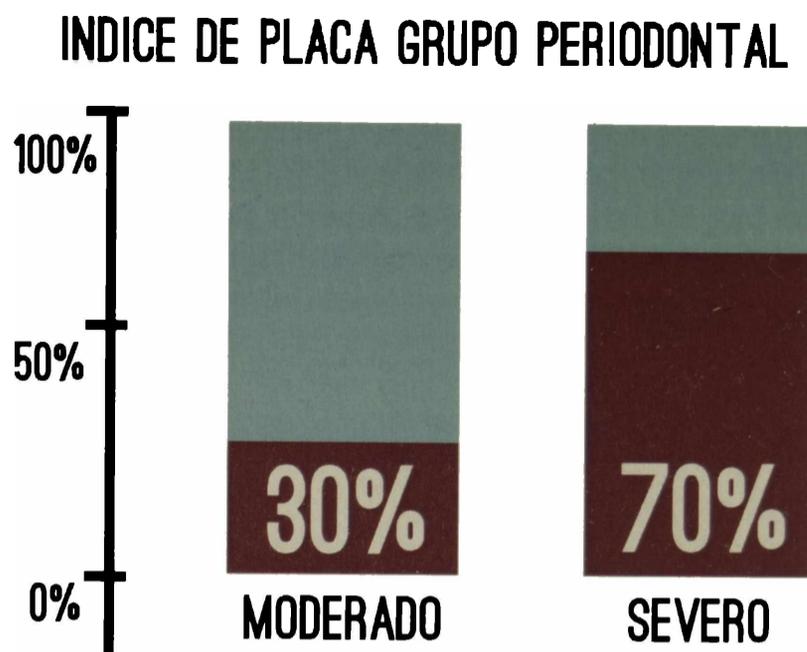


Fig. 2- Índice de placa en el grupo periodontal.

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

- Muestra de saliva: La recolección de muestras de saliva es simple. Se solicita 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 recolecta 2 a 3 ml. La muestra se preserva de manera segura a temperatura ambiente agregando un biocida para prevenir la contaminación y el crecimiento bacteriano. Los tubos se pre-tratan con azida sódica al 0,1% para preservar la saliva. Se coloca 50ul de la solución de azida sódica con una pipeta en el fondo de los tubos y se deja evaporar a temperatura ambiente. Una vez en el laboratorio las muestras deben ser 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 biomar-

## GRADOS DE MOVILIDAD DENTARIA

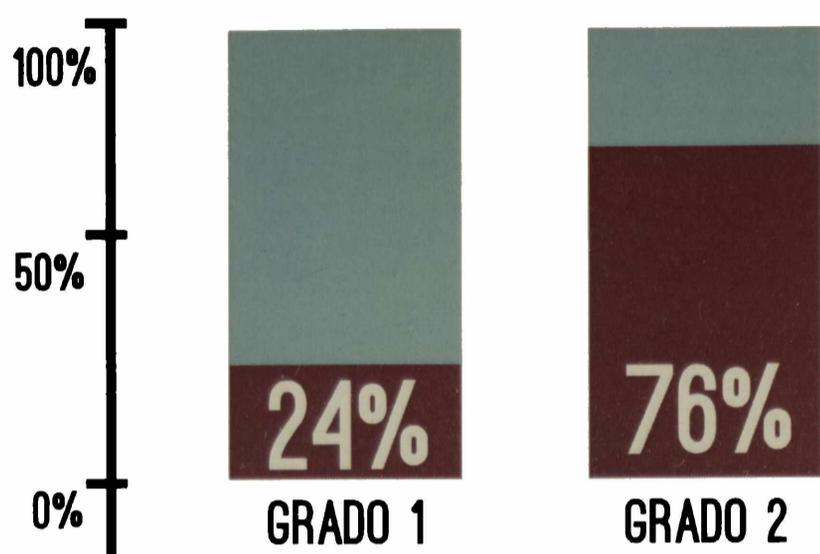


Fig. 3- Grados de movilidad dentaria.

cadores, 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 Gómez1 Mc, Ballesteros González M. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores.

## RESULTADOS

En el grupo control el índice de placa fue leve en el 80%

(24) y en el 20% (6) moderado (Fig. 1). En los enfermos periodontales 30% (9) moderado y severo en el 70% (21) (Fig. 2). Registro de movilidad dentaria grado 1 en el 24% (7) con bolsas de 4 mm y sangrado al sondaje y grado 2 en el 76% (23) con bolsas mayores de 4 mm y sangrado al sondaje (Fig. 3). En el grupo control los niveles de IL-1 y TNF- $\alpha$  fueron de  $552,36 \pm 75,7$  pg/mL y  $43,56 \pm 6,44$  pg/mL respectivamente. En el grupo de enfermos periodontales IL-1  $876,21 \pm 95,7$  pg/mL y el TNF- $\alpha$   $98,43$  pg/mL.

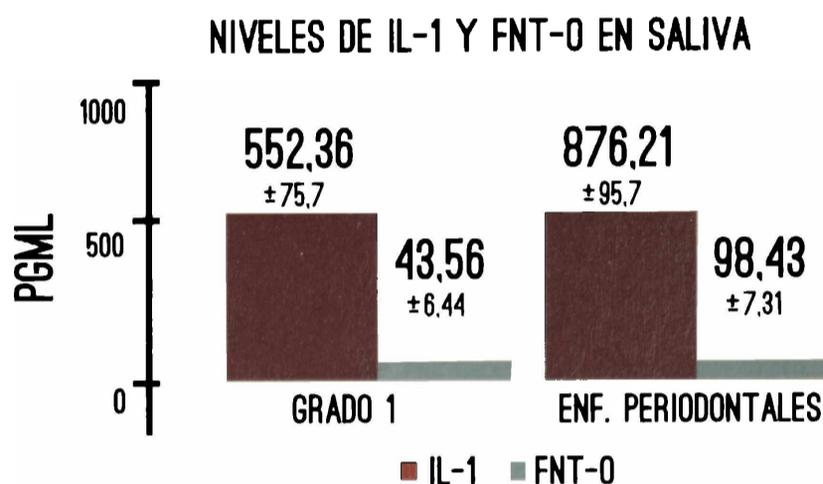


Fig. 4- Niveles en saliva de IL-1 y FNT- $\alpha$ .

## DISCUSIÓN

La saliva provee un medio ideal para la detección de marcadores proinflamatorios de la cavidad bucal de origen granulocítico y mucoso (4) por lo que en este estudio se evidenciaron niveles elevados de TNF- $\alpha$  e IL-1 en muestras salivales de sujetos sanos, tal como lo reportan SahebJamee y otros (5) quienes no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citosinas, entre el grupo control (pacientes sanos) y un grupo de pacientes con carcinoma de células escamosas. Estos hallazgos pudieran estar vinculados con diversos procesos como el recambio dentario y el estado de salud gingival, donde se evidenció la presencia de inflamación grado 1 y grado 2 en 14 de los sujetos evaluados.

En el estudio, todos los sujetos evaluados presentaron niveles de citosinas proinflamatorias en las muestras estudiadas. Esto coincidió con los hallazgos reportados por Chiappelli y otros (6) en donde se detectaron niveles de citosinas proinflamatorias en muestras de sangre y saliva de individuos normales. Esto se puede explicar, debido a que las citosinas son mediadores solubles que controlan muchas funciones fisiológicas como la inflamación, entre otros procesos biológicos. Por otra parte, no se observó en ambos estudios, correlación estadísticamente significativa, para las IL-1. Sin embargo, 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 citosinas proinflamatorias, involucradas en diversos procesos inflamatorios. Los niveles observados de IL-1 salival en las muestras eva-

luadas coinciden con lo reportado por Ulker y otros (3) quienes estudiaron los niveles de IL-1, en muestras de saliva en pacientes con gingivitis.

## CONCLUSIONES

Las actuales técnicas de diagnóstico como el sondeo periodontal (profundidad de la bolsa), la reacción de los tejidos al sondeo periodontal (sangrado) y las radiografías periapicales informan sobre el estado actual del paciente, pero no brindan información de la actividad de la enfermedad. La actividad de la enfermedad sigue siendo uno de los tópicos de mayor investigación en periodoncia ya que es de vital importancia para el clínico saber si el paciente está perdiendo periodonto de una manera progresiva, o si su enfermedad se encuentra en un periodo de estabilidad.

No hay ningún método diagnóstico cien por ciento confiable y disponible como indicador de enfermedad periodontal destructiva activa. Sin embargo, la investigación se ha encaminado a descubrir elementos metabólicos del hospedero que estén implicados en los procesos asociados con la actividad de la enfermedad. Estos elementos metabólicos son los efectores del proceso inflamatorio y los productos resultantes de esta inflamación, y que están implicados en la pérdida de matriz extracelular, células, componente fibrilar y reabsorción ósea, propios de la actividad de la enfermedad.

El fluido salival es considerado como un elemento auxiliar importante en el diagnóstico y el tratamiento preventivo de las enfermedades de la cavidad oral, enfermedades sistémicas, tumorales, endocrinas, entre otras, debido a que se han detectado en su composición moléculas orgánicas de naturaleza proteica, fracciones proteicas, proteínas conjugadas, receptores celulares, glucoproteínas, citocinas, etc. La saliva se convierte en un medio ideal de monitoreo de los cambios ocurridos durante el proceso salud-enfermedad periodontal.

En el campo de la estomatología, el fluido salival está llamado a constituirse en un elemento de diagnóstico auxiliar tanto por la facilidad que brinda la obtención de la muestra salival como el descubrimiento de moléculas orgánicas que anteriormente no se conocían, constituyendo así un aporte importante en el tratamiento preventivo de las enfermedades locales y sistémicas; tumorales; neurológicas; nutricionales y también como parte de estrategias preventivas del futuro de las enfermedades periodontales y la patología oral.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Díaz Caballero A.; Arévalo Tovar L.; Simancas Pallares M. Proteínas expresadas durante la periodontitis crónica. Revisión de la literatura. *Avances en Periodoncia*. 2011. Vol.23 no.2 Madrid Ago.
- 2-Díaz Caballero A, Arévalo Tovar L, Imancas Pallares M. Proteínas expresadas durante la periodontitis crónica. Revisión de la literatura. *Av Periodon Implantol*. 2009. Vol. 21 N° 3
- 3- Ulker AE, Tulunoglu 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
- 4- Winkler O, Hadnagy W, Idel H. Cytokines detectable in saliva of children as appropriate markers of local immunity of the oral cavity an approach for the use in air pollution studies. *Int J Hyg Environ Health*. 2001; 204(2-3):181-4.
- 5- SahebJamee M, Eslami M, AtarbashiMoghadam F, Sarafnejad A. Salivary concentration of TNF-alpha, IL1 alpha, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13(5):292-5.
- 6- Chiappelli F, Iribarren FJ, Prolo P. Salivary biomarkers in psychobiological medicine. *Bioinformation*. 2006;1(8):331-4.
7. Ulker AE, Tulunoglu 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.