

C I E N C I A

ODONTO lógica

Revista arbitrada
de la Facultad de
Odontología
Universidad del Zulia



Vol. 13. No.1
Enero- Junio 2016

Niveles de Hsp60 en saliva y fluido crevicular gingival de pacientes con enfermedad periodontal.

Viera Ninoska¹, Morón-Medina Alejandra², Morales-Rojas Thais³, Carrillo Geiser⁴, Elby Rubio⁵

¹Doctora en Ciencias Mención Inmunología.

²Magister Scientiarum en Biología. Mención Inmunología Básica.

³Doctora en Odontología.

⁴Odontólogo. Estudiante del postgrado de periodoncia.

⁵Especialista en Odontopediatria.

Instituto de Investigaciones. Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia.

E-mail: ninoskaviera@gmail.com, alejandraisamm@gmail.com, moralesrojas@cantv.net, errf15@gmail.com

Resumen

Introducción: Las enfermedades gingivo-periodontales comprenden un conjunto de entidades que afectan a cualquier órgano del periodonto, iniciado por bacterias periodontopatógenas, pero el determinante de la progresión de la enfermedad es la respuesta inmunitaria del huésped. Las toxinas bacterianas estimulan a células defensivas de los tejidos periodontales a que secreten mediadores inflamatorios y productos endógenos como las proteínas de choque térmico (Hsp). **Objetivo:** Comparar los niveles de Hsp60 en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica en muestras de saliva y fluido crevicular gingival. **Materiales y Métodos:** La población de estudio estuvo constituida por 20 pacientes que acudieron al servicio de periodoncia del Hospital Universitario de Maracaibo; 10 pacientes presentaron gingivitis y 10 periodontitis crónica, a los cuales se les tomaron muestras de fluido crevicular gingival y saliva total no estimulada. La Hsp60 se determinó a través del ensayo de ELISA. **Resultados:** Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de Hsp60 de pacientes con gingivitis y periodontitis crónica tanto en saliva como en fluido crevicular gingival. **Conclusiones:** La determinación de Hsp60 podría ser utilizada como biomarcador inflamatorio a nivel de la cavidad bucal, el cual pudiese jugar un papel importante en la cronicidad y destrucción de los tejidos periodontales.

Palabras clave: Gingivitis; periodontitis crónica; Hsp-60; saliva; fluido crevicular gingival.

Hsp60 levels in saliva and gingival crevicular fluid of patients with periodontal disease

Abstract

Introduction: The gingival periodontal diseases comprise a set of entities that affect any organ periodontal initiated by periodontal pathogenic bacteria, but the determinant of the progression of the disease is the immune response of the host. These bacterial toxins stimulate the defense cells of the periodontal tissues to secrete various inflammatory mediators and other endogenous products such as heat shock proteins (Hsp). **Objective:** to compare the levels of Hsp60 in patients with gingivitis and chronic periodontitis in saliva and gingival crevicular fluid. **Materials and methods:** the study population consisted of patients 20 patients who assisted to the service of Periodontics at the University Hospital in Maracaibo; 10 patients with gingivitis and 10 with chronic periodontitis, to which samples were taken from gingival crevicular fluid and whole unstimulated saliva. The Hsp60 was determined through ELISA assay. **Results:** Statistically significant differences were found when comparing the levels of Hsp60 in patients with chronic gingivitis and periodontitis in both saliva and gingival crevicular fluid. **Conclusions:** The determination of Hsp60 could be used as inflammatory biomarker that could play an important role in the chronicity and destruction of periodontal tissues.

Keywords: Gingivitis; chronic periodontitis; Hsp-60; saliva; gingival crevicular fluid.

Introducción

Las enfermedades gingivo-periodontales comprenden un conjunto de entidades que afectan a cualquier órgano del periodonto, las cuales están caracterizadas por un grupo de alteraciones clínicas de etiología infecciosa que producen lesiones inflamatorias con una elevada capacidad destructiva local¹. Dentro de estas alteraciones tenemos la gingivitis y la periodontitis. La gingivitis es la forma más leve de enfermedad periodontal, caracterizada por un proceso inflamatorio que cursa con alteración clínica de la encía en relación al color, forma, tamaño, textura y consistencia, sin alteración de las estructuras de soporte del diente, ésta es ocasionada por el biofilm que se acumula en la superficie dentaria adyacente al tejido gingival².

En tanto que la periodontitis crónica, es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la destrucción progresiva de las

estructuras de sostén del diente, incluyendo ligamento periodontal, cemento y el hueso alveolar, lo que conlleva a la formación de bolsas periodontales o surcos profundizados patológicamente entre la encía y la raíz del diente, que finalmente conduce a la pérdida de dientes. Esta entidad se asocia con una microflora compleja que contiene más de 400 especies diferentes, entre bacterias gram-negativas y gram-positivas³. El mecanismo fisiopatológico por el cual ocurre esta sucesión de fenómenos tiene su explicación en la respuesta inmunitaria del hospedero frente a los microorganismos productores de toxinas (endotoxinas bacterianas) conocidas ampliamente como periodontopatógenos. Estas endotoxinas estimulan a las células de defensa de los tejidos periodontales a que secreten mediadores inflamatorios como citocinas entre las cuales están la citocina IL-1, el factor de necrosis tumoral

alfa (TNF- α) o el receptor activador del factor $\kappa\beta$ ligando (RANKL). En adición a estos mediadores inflamatorios también se liberan otros productos endógenos como las proteínas de choque térmico 60 (Hsp60), proteína C reactiva (PCR), lactoferrina, calprotectina, defensinas, lamininas, proteína quimioatrayente de monocitos, entre otras sustancias potencialmente citotóxicas⁴.

Las proteínas de choque térmico (Hsp) pertenecen a una superfamilia de proteínas, que se encuentran en su mayor parte, en forma constitutiva en todas las células pro y eucariotas. Frente a determinadas agresiones ambientales, los organismos reaccionan con un mecanismo de defensa celular que involucra la sobreexpresión de estas proteínas cuya principal función es minimizar los daños producidos ante cualquier estrés^{5,6}. Una de las Hsp que está fuertemente vinculada con las Hsp respuestas inmunogénicas es la Hsp60, se especula que inicia las enfermedades inflamatorias crónicas en las cuales la respuesta autoinmune a la Hsp60 puede ser central en el proceso patogénico⁷. En este sentido, Tabeta y col.⁵ señalan el papel de la Hsp60 como molécula antigénica expresada durante los procesos periodontales crónicos y ulceración oral.

En otro orden de ideas, el fluido crevicular gingival es un trasudado del suero que circula por los vasos sanguíneos gingivales, modificado por las células y tejidos del área del surco⁸, que luego atraviesa la pared blanda del surco gingival para llegar al espacio crevicular, participa en los mecanismos de defensa mediante su acción de arrastre mecánico, dilución de toxinas bacterianas, componentes antibacterianos y células de defensa como los leucocitos polimorfonucleares⁹.

Por otra parte, en los últimos tiempos la saliva se ha propuesto como un fluido corporal útil para el diagnóstico de diversas enfermedades sistémicas tales como: leucemia, síndrome de Sjogren, SIDA, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus

y enfermedad periodontal, entre otras¹⁰. Varios marcadores inflamatorios y productos derivados del huésped en la saliva tales como IL-1, TNF- α , metaloproteinasas de la matriz, la elastasa de neutrófilos humanos, entre otros, han sido evaluados para su uso como marcadores de actividad de la enfermedad periodontal.

El rol de las Hsp60 en la patogénesis de la enfermedad periodontal no está totalmente dilucidado, razón por la cual la presente investigación tiene por objetivo comparar los niveles de Hsp60 en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica en muestras de saliva y fluido crevicular gingival.

Materiales y Métodos

Pacientes

Grupo experimental

La muestra de estudio estuvo conformada por 10 pacientes con gingivitis y 10 pacientes con periodontitis crónica, en edades comprendidas entre los 20 a 60 años que acudieron al Servicio de Periodoncia del Hospital Universitario de Maracaibo (HUM). Como criterios de inclusión se consideraron: Pacientes con gingivitis según los criterios de la Academia Americana de Periodontología: eritema gingival, edema, sangrado al sondaje, agrandamiento y sensibilidad¹¹, para lo cual se utilizó el índice gingival (IG) de acuerdo a los criterios de Loe & Silness¹² y el índice de placa (IP) según Silness & Loe¹³. Pacientes con periodontitis crónica según los criterios de la Academia Americana de Periodontología: localizada o generalizada en función de si <30% o >30% de los sitios que están involucrados. La gravedad se basa en la cantidad de pérdida de inserción clínica (PIC) y se designa como leve (1-2 mm PIC), moderada (3-4 mm PIC) o grave (> 5 mm PIC)¹¹.

Como criterio de exclusión se consideraron: Sujetos con formas agresivas de enfermedad periodontal, diabéticos, embarazo, VIH, desordenes óseos, necesidades de profilaxis antibiótica

previa, hábitos de cigarrillo y alcoholismo, pacientes que toman drogas que afectan el metabolismo, esteroides, anticonceptivos, antiinflamatorios y aquellos que recibieron tratamiento periodontal en los últimos 6 meses. Piezas con destrucción coronaria, caries y restauración gingival y coronaria total. En caso de ausencia de la pieza dentaria índice o de estar entre los criterios de exclusión, se tomará la pieza del mismo grupo más próxima.

Este proyecto contó con la aprobación del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Maracaibo. Además se incluyó en la historia clínica, el Consentimiento Informado, el cual fue firmado por cada sujeto una vez explicado el propósito de dicho estudio.

Evaluación clínica

La evaluación clínica la realizó un periodoncista, debidamente entrenado en la detección de signos y síntomas de la gingivitis y periodontitis (Coeficiente de kappa intraexaminador = 0.86). Todas las evaluaciones, se llevaron a cabo después de la higiene oral. Los exámenes clínicos se realizaron con los pacientes acostados y se utilizó una lámpara frontal de luz halógena, un espejo bucal plano y una sonda periodontal Williams.

El estado de los tejidos de soporte dentario se evaluó mediante la medición de la profundidad del surco gingival y el nivel de inserción, en seis puntos de cada diente seleccionado (mesial, medio y distal por vestibular y margen gingival palatino-lingual). Para la profundidad del surco se midió la distancia desde el margen gingival hasta la localización de la punta de la sonda periodontal. En relación al nivel de inserción, se midió la distancia desde la base de la bolsa hasta línea amelocementaria.

Examen radiográfico

Se determinó el nivel óseo a través de radiografías panorámicas y periapicales

para evaluar la cresta alveolar con relación a la unión cemento - esmalte de los dientes adyacentes.

Recolección de Muestra de Saliva

Después de realizar el registro de los parámetros clínicos, se recolectaron 2ml de saliva no estimulada en un envase estéril en las primeras horas de la mañana, la cual se transportó en hielo hasta el laboratorio. La muestra fue centrifugada a 300g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo estéril y se almacenó a -70 °C hasta ser procesados.

Recolección de Muestra de Fluido Crevicular Gingival

Previa a la obtención de la muestra, se les indicó a los pacientes no ingerir alimentos durante 1 hora antes. Se obtuvo la muestra, una vez realizado el aislamiento relativo de la zona elegida, la placa bacteriana supragingival fue removida con rollos de algodón con sumo cuidado tratando de no tocar la encía y el secado se llevó a cabo con una suave corriente de aire por 15". Se utilizaron puntas de papel absorbente los cuales se introdujeron en la entrada del surco gingival sin ejercer presión alguna durante 30 segundos en 3 sitios de la cara vestibular de los dientes que presentaban mayor grado de severidad de enfermedad periodontal. Luego las puntas de papel fueron colocadas en un tubo estéril con 180µL de buffer fosfato salino¹⁴. Aquellas tiras visiblemente contaminadas con sangre fueron descartadas. La muestra se centrifugó a 300g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo estéril y se almacenó a -70 °C hasta ser procesados.

Determinación de HSP60

La Hsp60 fue determinada a través del ensayo inmuno enzimático indirecto (ELISA), para lo cual se utilizó un kit comercial. Este permitió determinar cuantitativamente los niveles de Hsp60 presentes en las muestras

de fluido crevicular y saliva. La reacción colorimétrica fue cuantificada en un lector de microplacas (Titertek Multiskan® PLUS).

Análisis Estadístico

La comparación de los resultados obtenidos se realizó utilizando el programa GraphPad InStat versión 3.05 y Graph Pad prisma 5 para la representación gráfica de los datos. Al hacer análisis de las muestras en los dos grupos de estudio se utilizó la prueba de t no pareado, con un límite de significancia $p < 0,05$. Los resultados se expresaron media \pm error estándar.

Resultados

Del total de 20 pacientes evaluados la muestra quedó distribuida de la siguiente manera: el grupo de pacientes con periodontitis estuvo constituido por 7 pacientes femeninos y 3 masculinos, entre 23–60 años de edad ($\bar{X} = 45.8 \pm 11.31$). En relación al grupo de pacientes con gingivitis estuvo constituido por 7 pacientes femeninos y 3 masculinos, entre 20–31 años de edad ($\bar{X} = 26.6 \pm 5.94$).

En cuanto al índice gingival (IG) en los pacientes con periodontitis crónica se observó que el 70% presentó grado ligero y 30% correspondían al grado moderado; mientras que para el índice de placa (IP) el 50% correspondían al grado ligero y 50% al moderado. Para el grupo de pacientes con gingivitis se evidenció un 60% grado ligero, 30% moderado y 10% índice normal para el IG; en relación al IP fue 60% grado ligero y 40% moderado. Es importante mencionar, que el 100% de los pacientes evaluados presentaron cálculo dental.

Al estudio radiográfico 100% de los pacientes examinados con periodontitis crónica presentaron un patrón de pérdida ósea horizontal generalizada y disminución del trabeculado óseo, 70% presentó pérdida de la lámina dura y el 30% presentó un remanente óseo menor del 50%.

En cuanto a los niveles de Hsp60 en el fluido crevicular gingival del grupo de pacientes con periodontitis crónica y gingivitis se obtuvo una media de 15.04 ± 3.93 y 2.89 ± 0.51 , respectivamente; al realizar la comparación entre ambos grupos se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (Fig. 1).

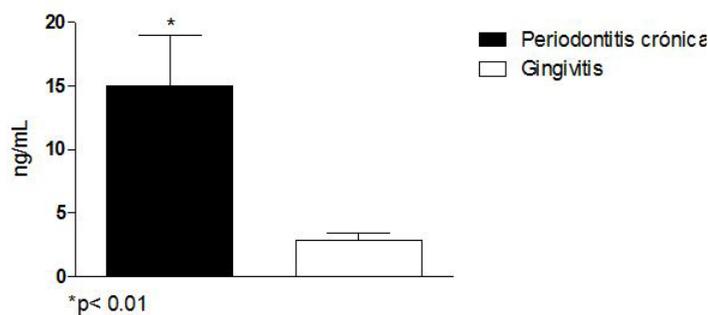


Fig 1. Niveles de Hsp60 en muestras de fluido crevicular gingival en pacientes con periodontitis crónica y gingivitis

En relación a las muestras de saliva total no estimulada los resultados de la determinación de la Hsp60, fueron 13.16 ± 3.95 para periodontitis y 2.94 ± 0.85

para gingivitis, evidenciándose diferencias estadísticamente significativas al realizar la comparación entre ambos grupos ($p < 0.05$) (Fig. 2).



Fig 2. Niveles de Hsp60 en muestras de saliva en pacientes con periodontitis crónica y gingivitis.

Discusión

Se ha demostrado que las bacterias periodontopáticas son los agentes etiológicos principales en la enfermedad periodontal, pero el determinante último de la progresión de la enfermedad es una respuesta inmunitaria aberrante del huésped. La respuesta inmune se activa normalmente a través de la exposición a antígenos bacterianos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), tales como LPS, fimbrias y la proteína membranosa exterior y diversos autoantígenos como la Hsp60¹⁵. Sin embargo, se ha descrito que la expresión de la Hsp60 en la enfermedad periodontal y la presencia de anticuerpos anti-Hsp60, no solo ejercen efectos patogénicos en el sitio de la inflamación, sino que también ejercen una posible contribución en la progresión de la destrucción periodontal¹⁶.

Escasa literatura ha sido publicada con respecto a los niveles de Hsp60 en los fluidos biológicos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad periodontal, sin embargo, en este estudio se observó diferencia estadísticamente significativa al comparar los niveles de esta proteína en muestras de fluido crevicular entre ambos grupos, lo cual pudiera coincidir con lo reportado por Honda y col.⁴, quienes evidenciaron mayores niveles

de Hsp60 en pacientes con periodontitis en comparación con los de gingivitis, sin embargo, este estudio fue realizado en muestras de tejido gingival; lo que sugiere que esta proteína podría tener la capacidad de estimular la reactividad proinflamatoria de las células humanas del sistema inmunitario innato y contribuir con la progresión de la destrucción periodontal a través de la fijación del sistema de complemento, así como también citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos.

En cuanto a los niveles salivales de Hsp60, en este estudio se observó una diferencia significativa al comparar los niveles de Hsp60 de pacientes con periodontitis crónica con los de gingivitis, lo que podría estar vinculado con que a medida que avanza el cuadro inflamatorio de la enfermedad se incrementa el valor de esta proteína y por ende la destrucción periodontal, estos hallazgos difieren con lo reportado Nethrayathy y col¹⁷. quienes observaron diferencias no significativas en los niveles salivales de Hsp60 entre pacientes con periodontitis al compararlo con los sujetos sanos, y al establecer una relación entre la Hsp60 salival y sanguínea, observaron que no existe una correlación entre ambas. Lo cual podría conllevar a que la enfermedad periodontal no contribuye

significativamente a incrementar los niveles de Hsp60 sanguíneos.

Finalmente, los resultados obtenidos sugieren que la Hsp60 desempeña un papel importante en el proceso inflamatorio de la cavidad oral durante la enfermedad periodontal, donde la saliva puede ser considerada como un segundo fluido para el estudio de la enfermedad periodontal, ya que la mayoría de sus constituyentes provienen del fluido crevicular gingival.

Todos estos hallazgos demuestran, que estudios futuros deberían ser llevados a

cabo con un mayor número de sujetos que permitan corroborar la posibilidad de utilizar la Hsp60 para el diagnóstico y progresión de la enfermedad periodontal.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. CONDES. Universidad del Zulia, por su aporte financiero, al servicio de periodoncia del Hospital de Universitario de Maracaibo (HUM) estado Zulia-Venezuela por el valioso aporte proporcionado para la realización de la presente investigación.

Referencias

1. Zerón A. "Nueva clasificación de las enfermedades periodontales". Rev ADM 2001;LVIII (1):16- 20.
2. Ramoz JH, Contreras A. ¿Se debe considerar a la enfermedad periodontal un problema de salud en Colombia? Colomb Med 2007; 38(3):181-182.
3. Daniluk T, Tokajuk G, Cylwik-Rokicka D, Rożkiewicz D, Zaremba ML, Stokowska W. Aerobic and anaerobic bacteria in subgingival and supragingival plaques of adult patients with periodontal disease. Adv Med Sci 2006; 51 Suppl 1:81-5.
4. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, K Yamazaki. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. Clin Exp Immunol 2006.;44(1): 35-40.
5. Tabeta K., Yamazaki K., Hotokezaka H., Yoshie H. & Hara K. Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. Clin Exp Immunol 2000; 120 (2):285-93.
6. Coronato S, Di Girolamo W, Salas M, Spinelli O, Laguens G. Biology of heat shock proteins. Medicina (B Aires) 1999; 59(5 Pt 1):477-486.
7. Chung WO, Hansen SR, Rao D, Dale BA. Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. J Immunol 2004;173 (8): 5165-70.
8. Lamster I.B. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic test. Ann Periodontol 1997;2 (1):123-137.
9. Arce RM. Terapia Periodontal del Futuro. Colomb Med 2004. 35(3): 40-47.
10. Bosch JA. El uso de saliva marcadores en psicobiología: mecanismos y métodos. Monogr Oral Sci 2014; 24: 99-108.
11. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology—an update. J Can Dent Assoc 2000; 66(11):594-7.
12. Loe H, Silness J. Periodontal Disease in pregnancy. Act Odont Scand 1963; 21:533-51.
13. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. Acta Odontol Scand 1964; 22:121-35.

14. Ueki K, KTabeta, Yoshie H, K. Yamazaki. Self-heat shock protein 60 induces tumour necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 2002; 127 (1): 72 -7.
15. Yamazaki K, Ohsawa Y, Yoshie H. Elevated proportion of natural killer T cells in periodontitis lesions: A common feature of chronic inflammatory diseases. *Am J Pathol* 2001;158 (4):1391-8.
16. Díaz A, Arévalo L, Simancas M. Proteínas expresadas durante la periodontitis crónica. Revisión de la literatura. *Av Periodon Implantol* 2011; 23(2): 113-122.
17. Nethravathy RR, Alamelu S, Arun K, Kumar TS . Evaluation of circulatory and salivary levels of heat shock protein 60 in periodontal health and disease. *Indian J Dent Res* 2014. 25(3): 300-304.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

Ciencia Odontológica

Revista arbitrada de la Facultad de Odontología



Vol. 13 N° 1, January - June 2016

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en junio de 2016, por el Fondo Editorial Serbiluz,
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve