



Esterasa leucocitaria e interleucina 1 beta en fluido crevicular gingival

Como marcadores de enfermedad periodontal

Leukocyte Esterase and Interleukin 1 beta in gingival crevicular fluid as mark predictors in periodontal disease

M.C. David Ávila Arizmendi

Unidad Académica de Odontología. Universidad Autónoma de Guerrero. Acapulco, Guerrero, México.

M.C. Eduardo Martínez Sandoval

PhD. Saúl López Silva

PhD Adakatia Armenta Solís

Unidad Académica de Medicina. Universidad Autónoma de Guerrero. Acapulco, Guerrero, México.

PhD. Ricardo Mejía Zepeda

Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F, México.

MCD. Ariel Cruz León

Clínica de Especialización en Endoperiodontología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F, México.

Resumen

Objetivo. Valorar la utilidad de la esterasa leucocitaria (EL) y de la Interleucina 1 beta (IL-1 β) como marcadores de progresión de periodontitis. **Material y métodos.** Entre agosto 2005 y febrero 2006 con estudio de casos y controles en clínica de endoperiodontología, en Tlalnepantla, Estado de México, considerando caso a pacientes con periodontitis confirmada. Se recolectaron muestras a 290 pacientes colocando puntas de papel en surco gingival. Se midieron niveles de EL e IL-1 β en fluido crevicular gingival (FCG). La EL se midió semicuantitativamente con tiras reactivas, y cuantitativamente mediante espectrofotometría a 400 nm, calculando un factor de absorción que se expresó en leucocitos/L. Se cuantificó la IL-1 β mediante prueba de ELISA. Se evaluaron factores de riesgo asociados, profundidad de sondeo, resorción ósea e índice de placa bacteriana obtenidos del expediente clínico. Se estimaron razones de momios. **Resultados.** La EL semicuantitativa fue positiva en los casos, la cuantitativa mostró de 11 - 80 leucocitos/L para casos y de 0- 10 en controles. La IL-1 β en los casos reportó niveles mayores de 5.2 ng/ml. Las pruebas enzimáticas tuvieron asociación positiva con sondeo mayor de 6 mm. y pérdida ósea mayor de 4 mm. e índice de placa bacteriana mayor de 70%. **Conclusiones.** La progresión de la periodontitis puede estimarse por los niveles de EL y de IL-1 β encontrados en FCG.

Palabras clave: *periodontitis; esterasa leucocitaria; citocinas; marcadores de inflamación; diagnóstico rápido;*

Abstract

Purpose. To value the utility of the leukocyte esterase (LE) and Interleukin 1 beta (IL-1 β) as mark predictors of progresión of periodontal disease. **Material and methods.** A case control study was made between august 2005 and february 2006 in endo-periodontology clinic in Tlalnepantla, Estado de México. Cases were patients with confirmed periodontal disease diagnosis. Samples from 290 patients were collected with paper points in the gingival sulcus. Levels of LE and IL-1 β in gingival crevicular fluid (GCF) was measured. The semiquantification of LE was measured with reactive strips and quantification with spectrofotometer at 400 nm calculating an absorbent factor expressed in leukocytes/:L. The IL-1 β was quantified with an ELISA test. Associated risk factors were evaluated, deep probing, bone resorption and plax index obtained from the clinic file. Odds Ratio were estimated. **Results.** The semiquantification LE was positive in cases and the quantification showed from 11 to 80 leukocytes/:L for cases and from 0 to 10 in controls. The IL-1 β in cases reported levels up to 5.2 ng/ml. The enzymatic tests had positive asociation with deep probing up to 6 mm and bone resorption up to 4 mm. and plax index higher than 70%. **Conclusions.** The progresión of periodontal disease can be estimated by the levels of LE and IL-1 β founded in GCF.

Key words: *periodontal disease; Leukocyte esterase; citokynes; mark predictors ; Point of cure testing*

Introducción

La enfermedad periodontal o periodontitis se caracteriza por la pérdida de la unión del tejido conectivo y su inserción al hueso alrededor del diente, así como por la formación de bolsas debido a la migración apical del epitelio de unión.¹⁻⁴ Al estar asociada con enfermedades crónico degenerativas desarrolla condiciones que agravan y aumentan las concentraciones de enzimas catabólicas -como las esterases y las citocinas- en el fluido crevicular gingival. En procesos agudos, los niveles de glucosa se elevan, se altera la microflora bacteriana, disminuye la respuesta inmunológica y aparecen pequeñas lesiones vasculares que trastornan el metabolismo del colágeno. Cuando se incrementa el número de bacterias en la placa dental comienza la liberación activa de componentes celulares como linfocitos, monocitos y macrófagos que se infiltran a los tejidos para liberar citocinas y prostaglandinas que exacerban la respuesta inflamatoria. Como respuesta a la agresión, se liberan proteínas de fase aguda, linfocitos T y B y células plasmáticas, así como anticuerpos, los cuales pueden causar una reacción cruzada con los tejidos del huésped.⁵

Actualmente el clínico valora solamente el estado del paciente a través del sondeo periodontal, o el control radiográfico. El fluido crevicular gingival -producto de la filtración capilar de los vasos sanguíneos, linfáticos y epitelio de unión del surco, trasudado en condiciones basales o exudado en inflamatorias- contiene elementos bioquímicos que se ofrecen como marcadores de diagnóstico o pronóstico de la periodontitis. Así pues, complementar el análisis del fluido crevicular gingival puede ser útil para determinar el estado periodontal de forma rápida y precisa, mediante la detección de metabolitos que identifican la progresión de la enfermedad.⁶

Entre los metabolitos del fluido crevicular gingival encontramos a la esterasa leucocitaria (EL); esta enzima se encuentra en los gránulos de los neutrófilos, hidroliza los enlaces éster, y está presente en cuadros inflamatorios relacionados con procesos bacterianos infecciosos como la periodontitis. Para medir su actividad se han desarrollado métodos in vitro empleando un sustrato convencional como el p-nitrofenil acetato (p-NFA), el cual es una molécula con un enlace éster en su estructura que al hidrolizarse desarrolla color,

Cuadro 1. Mediciones clínicas periodontales de casos y controles por diagnóstico preliminar.

Parametros clínicos	CONTROLES Subtotal n=145 (50%) Sin periodontitis	CASOS n=145 (50%) Con Periodontitis			Subtotal Casos(%)	Total N=290 (100%)
		LEVE	MODERADA	SEVERA		
NDICE DE PLACA	145(50%)	55(18.9)	46(15.8)	44(15.2)	145(50%)	290(100%)
BACTERIANA						
0-20%	35(12.1)	8(2.8)	6(2.0)	5(1.7)	19(6.5)	54 (18.6)
21-50%	68(23.4)	24(8.3)	19(6.6)	11(3.8)	54(18.6)	122(42.1)
51-70%	21 (7.2)	6(2.0)	13(4.5)	13(4.5)	32 (11.1)	53(18.2)
71-100%	21(7.2)	17(5.8)	8(2.7)	15(5.2)	40 (13.8)	61 (21.1)
X=47.3+27.9						
SONDEO						
1- 3 mm	134 (46.3)	11(3.8)	2(0.6)	0(0)	13(4.4)	147 (50.7)
4- 5 mm	11 (3.8)	32(11.0)	16(5.5)	1(0.3)	49 (16.9)	60 (20.7)
6- 7 mm	0 (0)	8(2.8)	16(5.5)	5(1.7)	29 (10.0)	29 (10.0)
8-mas mm	0 (0)	4(1.3)	12(4.1)	38(13.1)	54 (18.6)	54 (18.6)
X= 4.2 +2.9						
PÉRDIDA ÓSEA						
0	mm	134 (46.2)	1(0.3)	0(0)	0(0)	1 (0.3)
0.5-3 mm	11 (3.8)	54(18.6)	7(2.4)	0(0)	61(21.1)	122(42.1)
4- 6 mm	0(0)	0(0)	39(13.4)	4(1.3)	43(14.8)	53(18.2)
7-mas mm	0(0)	0(0)	0(0)	40(13.8)	40 (13.8)	61 (21.1)
X=2.06 +2.6						

* Clínica Endoperiodontología- FESI / UNAM Tlalneantla Edo. De México

y puede ser monitoreado a una longitud de onda de 400 nm.^{7,8}

Otro metabolito, la Interleucina 1 beta (IL-1 β), es una citocina de respuesta temprana producida por monocitos, macrófagos y células que activan los linfocitos T potencializando la respuesta inmune. Interviene en una gama de eventos proinflamatorios y sus niveles elevados están relacionados con periodontitis crónica. Junto con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) conforma uno de los ejes mayores de citocinas proinflamatorias como respuesta a endotoxinas bacterianas, virus, mitógenos o antígenos, trauma y procesos degenerativos óseos con alta actividad osteoclástica, pudiendo inducir la liberación de citocinas secundarias.⁹

Se han encontrado niveles elevados de IL-1 β con pruebas de ELISA en fluido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y pobre control glicémico en diabetes tipo 2, así como en madres comprometidas periodontalmente con partos prematuros y recién nacidos con bajo peso. Los fibroblastos pueden llegar a producir prostaglandina E2 en respuesta a la IL-1 β .¹⁰

Las pruebas de ELISA son una herramienta útil para determinar los niveles de IL-1 β en el fluido crevicular gingival evidenciando su relación con la progresión de la enfermedad periodontal.¹⁻¹³

La prevalencia de periodontitis se incrementa conforme aumenta la edad. En población estadounidense, en 2005, se reporta una prevalencia de 10% en adolescentes y de 90% pasada la cuarta década de la vida.^{14,15} En México, en un estudio realizado en 2001-2002, en estudiantes de entre 14 a 24 años de edad, del estado de Campeche, se notifica una prevalencia de periodontitis de inicio temprano de 16%.¹⁶ En 2005 se reporta una tasa de incidencia de 445 casos por cada 100 000 habitantes en un grupo de sujetos de entre 25 a 44 años de edad."

El objetivo del presente estudio fue valorar la utilidad de la medición de EL y de IL-1 β en fluido crevicular gingival como marcadores biológicos y como prueba diagnóstica en la progresión de la enfermedad periodontal, estableciendo un paralelismo entre los parámetros clínicos de profundidad de bolsas al sondeo, pérdida ósea y placa dentobacteriana con el incremento de los niveles enzimáticos.

Cuadro II. Pruebas de laboratorio de casos y controles por diagnóstico preliminar.

Prueba enzimática	CONTROLES n=145 (50%) Sin Periodontitis	CASOS n= 145 (50%) Con Periodontitis			Subtotal casos(%)	Total N=290 (100%)
		Leve	Moderada	Severa		
Esterasa	145(50%)	55(18.9)	46(15.8)	44(15.2)	145(50%)	290(100%)
Leucocitaria semicuantitativa						
Trazas	105 (36.2)	0	0	0	0	105 (36.2)
Baja	40 (13.8)	53(18.2)	0	2(0.6)	55 (19.0)	95 (32.8)
Moderada	0(0)	2(0.6)	44(15.1)	1(0.3)	47(16.2)	47 (16.2)
Alta	0(0)	0	2(0.6)	41(14.1)	43(14.8)	43 (14.8)
Esterasa Leucocitaria cuantitativa						
0 -10 leucocitos/ ↔L	145(50)	1 (0.3)	0	01	1(0.3)	146 (50.3)
11-20 leucocitos/ ↔L	0(0)	54(18.6)	0	01	54(18.6)	54 (18.6)
21-50 leucocitos/ ↔L	0(0)	0	46(15.8)	6(2.0)	52(17.9)	52 (17.9)
51-80 leucocitos/ ↔L	0(0)	0	0	38(13.1)	38(13.1)	38 (13.1)
Interleucina 1 β						
0 -2.97 ng/ml	73 (25.1)					
73 (25.1)	0	0 0	0			
2.98-5.17 ng/ml	69 (23.7)	3(1.1)	0 0	3(1.1)	72 (24.8)	
5.18- 7.55 ng/ml	3(1.1)	52(17.9)	17(5.8)	01	69(23.7)	72 (24.8)
7.56 -mas ng/ml	0(0)	0	29(10.0)	44 (15.2)	73 (25.1)	73 (25.1)

Material y métodos

Entre agosto de 2005 y febrero de 2006 se hizo un estudio de casos y controles con 290 pacientes, de 15 y más años de edad, de uno y otro sexo, en la Clínica de Especialización e Investigación en Endoperiodontología en la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Tlanepantla, Estado de México. Los casos fueron definidos por diagnóstico confirmado de periodontitis basado en la profundidad de bolsas al sondeo, pérdida ósea detectada radiográficamente e índice de placa dentobacteriana mayor a 20%, los controles fueron sujetos sin enfermedad periodontal. Todos los participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado.

Valoración clínica. Con base en el expediente clínico se analizaron los factores de riesgo asociados, a saber: demográficos (edad y sexo), patológicos (diabetes, hipertensión

arterial, tabaquismo, medicamentos) e higiénico dietéticos (cepillado e índice de masa corporal). Todos los pacientes con diagnóstico confirmado de hipertensión arterial y diabetes mellitus refirieron estar bajo control médico antes de ser admitidos a la clínica de endoperiodontología.

Valoración periodontal. Para el diagnóstico de enfermedad periodontal se consideró el nivel de inserción epitelial a través del sondeo, el nivel de pérdida ósea valorada radiográficamente y el índice de placa dentobacteriana. Obtenidos todos los datos del expediente clínico.

Recolección de muestra de fluido crevicular gingival. Previo aislado del campo con rollos de algodón y secado con corriente de aire por 15 segundos en la zona más comprometida periodontalmente de los primeros molares o incisivos centrales, se insertaron puntas de papel absorbente estandarizadas de 0.45 mm (Hygienic®) dentro del surco gingival, por 2

Cuadro III. Resumen del análisis de regresión logística múltiple -de la Semicuantificación de Esterasa leucocitaria semicuantitativa (EL sc) Cuantitativa (EL c) y de Interleucina 1 D con parámetros clínicos.**

Pruebas de Laboratorio	PARAMETROS CLINICOS I		REGRESION LOGISTICA		
SONDEO	PERDIDA OSEA	INDICE DE PLACA BACTERIANA	RM ®	IC 95%	"p"†
EL sc Baja 1-5 mm			1.0		
Moderado >6-7 mm			5.0	(3.2-7.7)	<0.0001
Alto > 8 mm			20.4	(9.4 - 44.4)	<0.0001
I					
EL c Normal < 6 mm			1.0		
0- 20		<50%			
leucocitos/↔L Medio >6-7 mm			6.6	(4.0-10.7)	<0.0001
21-50		(51-70%)	0.9	(0.6- 1.4)	0.804
leucocitos/ ↔L Alto > 8 mm			55.3	(17.0-179.2)	<0.0001
51-80		>70%	2.2	(1.11- 4.2)	0.019
leucocitos/ ↔L					
IL-1D**					
<5.2 ng/ml <6 mm	<4 mm		1.0		
>5.2 ng/ml >6 mm			23.7	(5.13-95.9)	<0.0001
>5.2ng/ml	>4 mm		85.5	(19-7-371.4)	<0.0001

-Clínica Endoperiodontología Facultad de Estudios Superiores Iztacala -Tlanepantla, Edo. De México
 RLM • Regresión Logística múltiple
 ® Razón de momios
 IC 95% Intervalo de confianza al 95%
 † Nivel de Significancia
 ** Punto de corte de riesgo para IL-1 B 5.18 ng/ml y mas

min, y se absorbió un promedio de 2.5 :L de fluido crevicular gingival. Las puntas de papel se introdujeron en un tubo eppendorf con 150 :L de agua estéril, y la dilución de fluido crevicular gingival se transportó a un vial de plástico y congeló a -70 °C.

Valoración semicuantitativa de esterasa leucocitaria en fluido crevicular gingival. De la dilución anterior se tomaron 20 :L y se colocaron en una tira reactiva para urianálisis (Multistix-10SG ®) en el lugar marcado para leucocitos, por 2 min. De acuerdo con la reacción colorimétrica, el resultado se categorizó en: trazas, baja, moderada y alta presencia de EL. No se tomaron en cuenta los cambios de color después de 2 minutos de reacción.

Valoración cuantitativa de esterasa leucocitaria en fluido crevicular gingival. Para cuantificar la EL se utilizó como sustrato cromogénico el p-nitrofenil acetato (p-NFA) 50 mM en dicloro metano (Sigma Aldrich N8130 ®). La mezcla de reacción para medir la actividad de esterases estaba compuesta por: 20 L del sustrato (1 mM concentración final) diluido en Tris-HCl (pH 8.0) 20 mM, NaCl 150 mM y TritonX-100 0.01% M, a la cual se le agregó 40 :L de la muestra del fluido crevicular gingival en una cubeta de cuarzo (Amersham ®). Para realizar la medición de la dilución, se agitó suavemente por 30 segundos y después de 2 min de reacción se leyó en espectrofotómetro (Ultrospec 3300 pro Amersham Biosciences 0) a 400 nm. La absorbancia resultante se expresó en número de leucocitos/ pL utilizando una curva

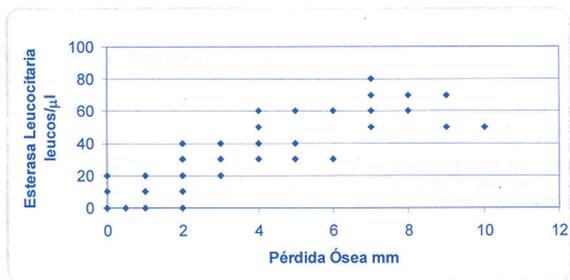


Figura 1. Tendencia progresiva entre la cuantificación de esterasa leucocitaria y la pérdida ósea.

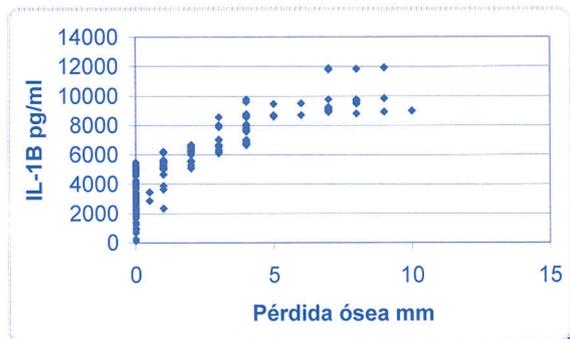


Figura 2. Asociación positiva entre los niveles de interleucina 1 β y la destrucción ósea.

de calibración diseñada para tal fin (anexo 1). Determinación de interleucina 1 beta. Mediante prueba de ELISA con un anticuerpo recombinante anti IL-1(3 y como sistema revelador la Avidina biotina se midió la cantidad de IL-1 R usando un kit de ELISA (Peprotech[®]).¹³ Se siguieron las especificaciones del fabricante y se elaboró una curva de calibración con concentraciones de 0 a 3 ng/ml. Se colocaron 50 pL de la dilución de fluido crevicular gingival a cada pozo. Se permitió el desarrollo de color durante 10 min, se midió la absorbancia a 405 nm en lector de placas de ELISA (multiskan AFCENT V1.24 Termo Labsystems[®]). Los resultados se reportaron en ng/ml de acuerdo con el factor de dilución y las categorías se establecieron por cuartiles.

Análisis estadístico. Con la información del expediente clínico se elaboró una base de datos y se incorporaron las mediciones obtenidas de EL y de IL-1 R. Se utilizó el paquete estadístico STATA v.8. para hacer regresión logística multinomial y obtener razón de momios (RM) crudos y ajustados, con intervalos de confianza de 95% y valor de "p".

Resultados

Se incluyeron 290 personas, 145 casos con diagnóstico preliminar de periodontitis y 145 controles. El intervalo de edad de la población estudiada fue de 15 a 90 años con media

de 43.8±14.3, la edad media de casos fue de 45.3±12, el sexo femenino representó el 68%. Se identificó por entrevista que 11% padecía diabetes mellitus, 19% hipertensión arterial y 14% fumaba. Se observó aumento en la profundidad de bolsas al sondeo periodontal de 6 y más mm conforme aumentaba la severidad de la lesión en los casos, comparados con los controles. De manera similar se encontró incremento en la pérdida ósea entre los casos por arriba de 4 mm (cuadro I).

La semicuantificación de EL mostró una tendencia ascendente conforme aumentaba la progresión de la enfermedad. La reacción colorimétrica fue poco perceptible en los controles, mientras que en los casos se pudo observar mayor variedad en la reacción colorimétrica, traduciendo desde baja hasta alta presencia de EL (cuadro II).

La medición cuantitativa de EL mostró para los controles 0 a 10 leucocitos/pL, mientras que en los casos fue de 11 a 20 leucocitos/pL para periodontitis leve, 21 a 50 leucocitos/pL para la periodontitis moderada y 51 a 80 leucocitos/pL para la periodontitis severa (cuadro II y Figura 1).

Con las pruebas de ELISA se observaron niveles de IL-1B incrementados proporcionalmente a la progresión de la enfermedad. En los controles se observaron rangos de 0 a 5.2 ng/ml y los casos mostraron rangos de 5.2 ng/ml a más. De acuerdo con los niveles de IL-1(3 los casos concordaban con los diagnósticos de periodontitis moderada y severa mientras que los niveles por debajo de 5.2.ng/ml comprendieron los pacientes control o con diagnóstico de periodontitis leve (cuadro II).

Regresión logística. El primer modelo de análisis de regresión logística politómica de la semicuantificación de EL mostró que los casos en que la profundidad de bolsas al sondeo era de 6 a 7 mm tuvieron cinco veces el riesgo de presentar niveles moderados de esterasa leucocitaria (RM=5.04 IC95% 3.2 - 7.7). Cuando la profundidad de bolsas al sondeo fue mayor de 8 y más mm presentaron hasta 20 veces el riesgo de padecer niveles altos de EL (RM=20.4 IC95% 9.4 - 44.4). También se observó que ser diabético confirió tres veces el riesgo de desarrollar niveles altos de esterasa leucocitaria (RM=3.2 IC95 0.7 - 14.2), sin embargo, no fue estadísticamente significativo (cuadro III). El segundo modelo de regresión logística politómica para la cuantificación de EL mostró que la profundidad de bolsas al sondeo de 6

Protocolo de calibración para obtener el factor de absorbancia en pruebas de esterasa leucocitaria en fluido crevicular gingival

Recuento de leucocitos. Se procedió a recolectar una muestra de contenido purulento de un absceso periodontal de un paciente afectado y se colectó en un tubo eppendorf con 2 ml de solución fisiológica estéril. Posteriormente se centrifugó y se desechó el sobrenadante existente. Se añadieron otros 2 ml de solución fisiológica estéril, volviéndose a centrifugar, repitiendo el mismo procedimiento hasta obtener una dilución tal que permitiera contar en una cámara de Neubauer una suspensión de 2000 leucocitos/ \rightarrow L Una vez hecho el recuento de leucocitos, se prepararon una serie de 7 tubos con diferentes diluciones a partir de la solución madre .

Diluciones a partir de la solución madre de 2000 leucocitos/ \leftrightarrow l

Tubo	Concentración final	Sol. fisiológica	Susp madre de 2000 leucocitos/ \rightarrow l
0	~l	200 \rightarrow l	0
2	100 / \rightarrow l	190 \rightarrow l	10 \rightarrow l
	200 / \rightarrow l	180 / \rightarrow l	20 \rightarrow l
	400 / \rightarrow l	160/ \rightarrow l	40 \rightarrow l
5	800/ \rightarrow l	120/ \rightarrow l	80l
6	1600 / \rightarrow l	40/ \rightarrow l	160 \rightarrow l
7	2000 / \rightarrow l	0	200 \rightarrow l

Posteriormente se numeraron los tubos a diferentes concentraciones.

Concentraciones leucocitarias para medir la actividad de p-NFA

T ^o h ^o	Concen t.	Blanco (l)	2	3	4	5	7
0 / \rightarrow l		20		-	-		

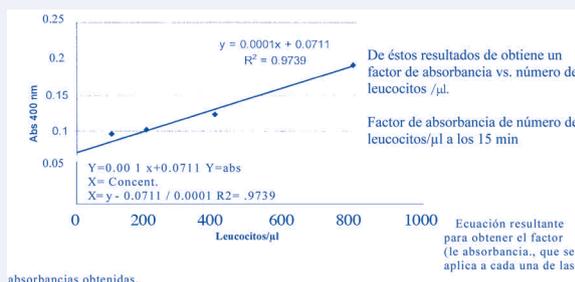


Figura 3. Desarrollo de color en diluciones de 2000 a 100 leucocitos/ \rightarrow l en 15 minutos.

100 / \rightarrow l	-	20	-				
200/ \rightarrow l	-		20				
400 / \rightarrow l	-			20			-
800/ \rightarrow l	-				20		
1600 / \rightarrow l	-					20	
2000 / \rightarrow l	-						20
p-NFA 1mM	1 ml						

Se agitaron los tubos en el vórtex y se dejan reposar por 2 minutos, para ser leídos posteriormente en el espectrofotómetro a una absorbancia de 400 nm. Con éstas lecturas se procede a sacar el factor de absorbancia confrontado vs. el número de leucocitos / \rightarrow l.

Absorbancias resultantes en diluciones de 2000 leucocitos/ \rightarrow l

2000 LeucosFil	O F 1	Absorbancias a 400 nm					
		100/ FJ	200/ \rightarrow l	400 / \rightarrow l	800 /JA	1600/ FJ	2000/ \rightarrow l
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6	7
0	0.039	0.076	0.043	0.079	0.13	0.068	0.31
1	0.04	0.076	0.048	0.08	0.135	0.075	0.439
2	0.042	0.079	0.051	0.082	0.136	0.079	0.455
3	0.045	0.079	0.053	0.083	0.14	0.083	0.469
4	0.044	0.081	0.058	0.085	0.146	0.075	0.491
5	0.047	0.085	0.061	0.089	0.149	0.082	0.539
6	0.048	0.086	0.062	0.092	0.153	0.087	0.557
7	0.05	0.088	0.064	0.094	0.156	0.092	0.559
8	0.051	0.087	0.065	0.097	0.16	0.096	0.586
9	0.058	0.093	0.079	0.109	0.179	0.139	0.669
10	0.063	0.099	0.098	0.117	0.193	0.178	0.706
15	0.064	0.095	0.102	0.124	0.189	0.199	0.724



a 7 mm tuvo casi siete veces la probabilidad de asociación con niveles de 21 a 50 leucocitos/PL, correspondientes con un nivel medio de EL (RM=6.6 IC95% 4.0 - 10.7), y cuando la profundidad de bolsas al sondeo era de 8 y más mm (RM=55.3 IC95% 17.0 - 179.2) confirió 55 veces el riesgo de alcanzar niveles de 51 a 80 leucocitos/↔L (nivel alto de EL). La presencia de altos índices de placa dentobacteriana por arriba del 70% incrementó dos veces el riesgo de alcanzar niveles altos de EL (RM=2.2 IC95% 1.1 - 4.2) y si se era diabético el riesgo fue hasta cuatro veces mayor (RM=3.8 IC95% 0.7 - 20.4), pero no tuvo significancia estadística al 95% (cuadro III).

Para el tercer modelo de regresión logística múltiple con un punto de corte de riesgo para IL-1 β con valores de 5.2 y más ng/ml se observó que pacientes con profundidad de bolsas al sondeo por arriba de 6 mm tuvieron 24 veces el riesgo de desarrollar niveles de IL-1 β superiores a 5.2 ng/ml (RM=23.7 IC95% 5.8 -95.9) y con una pérdida ósea mayor a 4 mm mostraron 85 veces el riesgo de desarrollar niveles de IL-1 β superiores a 5.2 ng/ml (RM=85.5 IC95% 19.7 - 371.4; cuadro III). No se encontró asociación positiva entre la periodontitis y los factores de riesgo como edad, frecuencia de cepillado, hilo dental, niveles de glucosa, índice de masa corporal, hipertensión y tabaquismo.

Discusión y conclusiones

Se propuso medir la esterasa leucocitaria en forma semicuantitativa y cuantitativa así como la Interleucina 1 beta en fluido crevicular gingival, para determinar la progresión de la enfermedad periodontal, con la hipótesis de que la severidad de la lesión periodontal medida a través de la profundidad de bolsas al sondeo, la pérdida ósea y el aumento de la placa bacteriana están asociados con un aumento en los niveles de estas enzimas.

Nuestro estudio mostró que niveles moderados de EL medida semicuantitativamente tuvieron una asociación positiva con la profundidad de bolsas al sondeo de 6 a 7 mm y niveles altos tuvieron relación directa con profundidad de bolsas al sondeo superiores a 8 mm.

Un estudio refiere el uso de tiras reactivas para medir de forma semicuantitativa la EL en saliva de pacientes pediátricos valorando niveles moderados a severos de enfermedad periodontal.¹⁸

Diversos estudios sobre la EL medida de forma semicuantitativa en saliva, esputo u otros fluidos corporales han establecido su utilidad al evaluar la progresión en diversos procesos patológicos, entre ellos la periodontitis;^{19, 28} pero, no se encontraron publicaciones que refieran la medición de EL en forma semicuantitativa en fluido crevicular gingival para medir progresión de periodontitis.

Se encontró que la medición cuantitativa de EL mostró que los niveles de 21 a 50 leucocitos/↔L se incrementaron cuando la profundidad de bolsas al sondeo fue de 6 a 7 mm, y niveles de 51 a 80 leucocitos/↔L aumentaron cuando la profundidad de bolsas al sondeo fue mayor a 8 mm. De manera similar, nuestro estudio mostró que los niveles de EL se incrementan con altos índices de placa dentobacteriana en pacientes con periodontitis severa. Tratando de buscar la consistencia de estos datos con los de otras publicaciones hicimos una búsqueda en las bases de datos Medline y Liliacs, de 1996 a la fecha, con los descriptores esterasa leucocitaria, periodontitis y fluido crevicular gingival y no se reportan estudios sobre la progresión de periodontitis asociada con niveles de EL medida de esta manera. Este trabajo parece ser el primero en mostrar dicha asociación.

Se mostró que niveles de IL-1 β superiores a 5.2 ng/ml estaban relacionados directamente con el incremento de profundidad de bolsas al sondeo superior a 6 mm y pérdida ósea superior a 4 mm. Estos resultados mostraron una tendencia similar con lo publicado por Stashenko²⁹ donde reporta niveles en casos de 8 a 11.7 ng/ml y en controles 2 a 5 ng/ml estableciendo la correlación de niveles elevados de esta citocina con enfermedad periodontal crónica y procesos degenerativos óseos.

Otro estudio de casos y controles efectuado por Faizuddin³⁰ reporta niveles de IL1 β en sujetos con periodontitis de 890 pg/ml y en sujetos sanos de 9 a 18 pg/ml. Sin embargo, estos resultados son diferentes a los nuestros porque el método es diferente, se reportan en otras unidades de medición y fueron elaborados con otro kit comercial diferente al que nosotros usamos.

En la interpretación de resultados de la IL-1 β debemos considerar otros procesos patológicos que pueden modificar los datos, pues aunque los mediadores inflamatorios comparten actividad similar pudieran ser el producto de actividad proteolítica diferente.³¹⁻³⁷ Aún así, su

medición puede contribuir para complementar el diagnóstico clínico, aunque actualmente no es accesible por la complejidad de la técnica en el laboratorio.

Nuestro estudio no encontró asociación positiva entre la periodontitis y los factores de riesgo como edad, sexo, frecuencia de cepillado e hilo dental, niveles de glucosa, índice de masa corporal, hipertensión y tabaquismo, lo cual podría deberse al tamaño de muestra.

Una de las posibles limitantes en el estudio podría ser la introducción de sesgos de selección al incluir conjuntamente casos incidentes y prevalentes. La selección de controles podría originar sesgos por falta de homogeneidad debido a que la inclusión de controles sin enfermedad periodontal no descartó que pudieran tener algún otro padecimiento odontológico que alterara la condición periodontal o la respuesta inmune.^{38,39}

El diseño metodológico del estudio de casos y controles requiere un tipo de muestreo que permita identificar la asociación entre los parámetros clínicos que identifican a la periodontitis y las pruebas enzimáticas en la progresión de la enfermedad. En este estudio, a través de un muestreo por conveniencia se obtuvieron datos de diagnóstico preliminar de periodontitis que no permitieron establecer la precisión del parámetro clínico, ni distinguir entre casos prevalentes e incidentes, pero donde la prueba enzimática pudo revelar precisión en la interpretación de la progresión de la enfermedad

Se encontró una asociación positiva entre la severidad de la lesión periodontal y los cambios en la EL medida en forma semicuantitativa; por lo tanto, podemos concluir que la medición de la misma es útil para determinar la progresión de la periodontitis usando tiras reactivas y se puede realizar de manera accesible en el consultorio dental.

Existe una relación directa entre la severidad de la enfermedad periodontal medida a través de la profundidad de bolsas al sondeo, el

aumento de placa bacteriana y el incremento de la cuantificación de esterasa leucocitaria. Esta fue una medición más precisa que la EL medida semicuantitativamente; sin embargo, se requiere simplificar el procedimiento para hacerlo de utilidad práctica para el cirujano dentista en el consultorio.

Se encontró que los niveles elevados de IL-1 β estuvieron asociados con el aumento en la profundidad de bolsas al sondeo y una elevada pérdida ósea; sin embargo, en este momento su aplicación es cuestionable para el cirujano dentista en el consultorio por la complejidad del procedimiento.

Con estos resultados podemos concluir que los niveles de EL y de IL-1 β encontrados en muestras de fluido crevicular gingival son una herramienta útil para medir la progresión de la enfermedad periodontal complementando la información de los parámetros clínicos y contribuyendo a la precisión del diagnóstico.

Así pues, se torna factible la elaboración de kits comerciales que faciliten al cirujano dentista el diagnóstico de la progresión de la enfermedad periodontal,

Agradecimientos

Un merecido agradecimiento al Dr. Eduardo Llamosas y personal académico y administrativo de la Clínica de Especialización en Endoperiodontología y al laboratorio de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios superiores de Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a los laboratorios de Diagnóstico Molecular e Investigación Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Referencias bibliográficas

- Ozmeric N. Advances in periodontal markers Clin Chim Acta 2004;343(1-2):1-16.
- Armitage GC. Periodontal diseases: Diagnosis. Ann Periodontol 1996;1(1):372-15.
- Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Periodontal disease activity. J Periodontol Res 1996;175:521-2.
- McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: Principles and implications for diagnosis and therapy. J Periodontol 2002;72:1377-91.
- Scannapieco FA. Periodontal inflammation: From gingivitis to systemic disease. Compend Contin Educ Dent 2004 Jul;25(7 Suppl 1):16-25.
- Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preiser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid markers as predictors of risk for periodontal diseases. Periodontology 2000 2003;31(1):167-80.
- Gilham D, Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. Methods 2005 Jun;36(2):139-47.
- Rover S, Cesura AM, Huguenin P, Kettler R, Szente A. Synthesis and biochemical evaluation of N-(4-phenylthiazol-2-yl)benzenesulfonamides as high affinity inhibitors of kynurenine 3-hydroxylase. J Med Chem 1997 Dec;40(26):4378-85.
- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol 2003 Mar;74(3):391-401.
- Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: Fibroblast biology. J Periodontol 2003;74:103-10.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontology 2000 1997 Jun;14:216-48.
- Deinzer R, Waschul B, Herforth A. Effects of experimental gingivitis on crevicular PGE2 in a split mouth trial. J Clin Periodontol 2004;31(7):501-5.
- Pirog K, Stabinsky Y, Goldmna R. Catálogo Peptotech. Cytokine Index .(2006),93.
- Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Epidemiology of periodontal diseases. Position Paper. Academy Report. J Periodontol 2005;76:1406-19.
- Lindhe J. Periodontología clínica e Implantología odontológica Epidemiología de la enfermedad periodontal Editorial Panamericana. (2003) 69-365.
- Herrera LF, Iliásstigui-Ortueta ZT, Zazueta-Hernández MA. Prevalencia, extensión y severidad de periodontitis de inicio temprano en jóvenes estudiantes. Disponible en: http://www.ucmh.sld.cu/rhab/articulo_rev14/periodontitis.htm. [2007 abril 5].
- Secretaría De Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Incidencia de los casos nuevos de enfermedades por grupo de edad. Boletín Epidemiología . 2006;23:1:35-37
- Bimstein E, Small PA Jr, Magnusson I. Leukocyte esterase and protein levels in saliva, as indicators of gingival and periodontal diseases in children. Pediatr Dent. 2004;26:310-315.
- Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. J Clin Periodontol 2000;27:453-65.
- Igman T, Sorsa T, Konttinen YT, Liede K, Saari H, Lindy O, et al. Salivary collagenase, elastase- and trypsin, like proteases as biochemical markers of periodontal tissue destruction in adult and localized juvenile periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2003;8:298-305.
- Nieminen A, Nordlund L, Uitto VJ. The effect of treatment on the activity of salivary proteases and glycosidases in adults with advance periodontitis. J Periodontol 2003;64:297-301.
- Elgun S, Ozmeric N, Dermatas S. Alanine aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV in saliva: the possible role in periodontal disease. Clin Chim Acta 2000;298:187-191.
- Ozmeric N, Elgun S, Uraz A. Salivary arginase in patients with adult periodontitis. Clin Oral Investig 2000;4:21-4.
- Gossrau R. Peptidases II. Localization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV). Histochemical and biochemical study. Histochemistry 1999;60:231-48.
- Lamster IB, Kaufman E, Grbic JT, Winston LJ, Singer RE. Beta-glucuronidase activity in saliva: relationship to clinical periodontal parameters. J Periodontol 2003;74:353-9.
- Igman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. J Clin Periodontol 1996;23:1127-32.
- Van Steijn GJ, Amerogen AV, Veerman EC, Kasaanmoentalib S, Overdijk B. Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients. J Periodontal Res 2002;37:245-9.
- Cruz-Romero G, Mantilla J. Detección de Porphyromonas endodontalis en saliva total por PCR. Colombia Médica 2004;36: supl 1:39-47.
- Stashenko et al, Bone resorption and profile of body cytokines in periodontal disease. J Periodontol 1994;1;62:504-509.
- Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini N. Estimation of Interleukin-1(3 levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. J Periodont Res. 2003;38;111-114.
- Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. Periodontology 2000 2004;36:14-26
- Delima A, Vand Dyke T. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. Periodontology 2000 2003;31:55-76.
- Groenink J, Walgreen Weterings E, Nazmi K, Bolscher JG, Veerman EC, van Winkelhoff AJ, et al. Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. J Clin Periodontol 2001;26:269-275.
- Ebersole J. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. Periodontology 2000 2003; 31:135-166
- Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster J. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. J Periodontol. 2004 Sep;75(9):1203-1208.
- Eley B, Cox S. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. Periodontology 2000 2003;31:105-124
- Velli-Jukka U. Gingival crevice fluid: an introduction. Periodontology 2000 2003; 31: 9-11.
- Page RC, Kornman KS. The Pathogenesis of human periodontitis: an introduction. 1997;14: 9-11.
- Have mouse-Poulsen A, Korsbaek-Sorensen L, Stoltzer K, Bendtzer K, Holmstrup P. Cytokine profiles in peripheral blood and whole blood associated with aggressive periodontitis, Juvenile Idiopathic Arthritis and Rheumatoid Arthritis J Periodontol 2005; 76; 2276-2285.
- Alugupalli K, Kalfas S, Edwardsson S, Naidu A, Lactoferrin interaction with Actinobacillus actinomycetemcomitans. Oral Microbiol Immunol 2005;10:35-41.
- Guerrero F, Torres M. Identificación de factores de riesgo asociado a enfermedad periodontal y enfermedades sistémicas. ADM 2004;3:92-96
- López-Corre A. Asociación de enfermedad periodontal con enfermedades cardiovasculares. Colombia Médica 2004;36: supl 12:17-22.
- Sukugawa F. Factores de riesgo para enfermedades gingivo periodontales. Colombia Médica 2004 ; 37 supl1 :25-31.
- Jin L, Yu C, Corbett EF. Granulocyte elastase activity in state and flow gingival crevicular fluid. J Periodontol Res;2003;38;303-310.
- Suomalainen K, Saxen L, Vilja P, Tenovuo J, Perixidases, lactoferrin and lysozyme in peripheral blood neutrophils, gingival crevicular fluid and whole saliva of patients with localized juvenile periodontitis. Oral Dis 2003;2:29-34. 46) Arce RM. Terapia periodontal del futuro. Colombia Médica 2004;35: supl 1:40-47.
- Miyasaki KT, Nisengard RJ, Haake SK. Immunity and inflammation; basic concepts. In: MG Newman, HH Takei, FA Carranza, editors. Carranza's Clinical Periodontology, 9th edition. W.B. Saunders 2001 Philadelphia, PA. P. 113-32.
- Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1 beta profiles in periodontal disease. J Clin Periodontol. 2002 Jan;29(1):48-53.
- Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1R and Interleukin 18; Regulation and activity in local inflammation. Periodontology 2000;2004;35:42-52.
- Konopka T, Rutkowska M, Hirnle L, Kopec W. IL-1beta and PGE2 production in whole blood and gingival fluid in women with periodontitis and preterm low birth weight. Ginekol Pol. 2004 May;75(5):352-60.
- Loos B. Systemic markers of inflammation in periodontitis. J Periodontol 2005; 76: 2106-2115
- Davis E, Scott A, Macckey & Howard T, Mac Donald T. Systemic disease and periodontitis manifestations of neutrophil dysfunction. Periodontology 2000;2003;32:82-104.
- Sinem E, Sahingur & Cohen R. Analysis of host response and risk of disease progression. Periodontology 2000;2004;34:57-83.