



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

**“ESTERASA LEUCOCITARIA E INTERLEUCINA 1
BETA EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL COMO
MARCADORES DE ENFERMEDAD PERIODONTAL”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

C.D. DAVID ANTONIO AVILA

ARIZMENDI

DIRECTOR DE TESIS: M en C. EDUARDO MARTINEZ SANDOVAL

CHILPANCINGO, GRO. NOVIEMBRE DE 2006.

**ESTERASA LEUCOCITARIA E INTERLEUCINA 1
BETA EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL COMO
MARCADORES DE ENFERMEDAD PERIODONTAL**

Este trabajo se realizó en la Clínica de Especialización e Investigación de Endoperiodontología y la Unidad de Biomedicina en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Tlanepantla Edo. de México, en los laboratorios de diagnóstico molecular e Investigación Clínica de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de

M en C., Dr. Eduardo Martínez Sandoval y

la asesoría de:

Dr. Saúl López Silva

Dra. Adakatia Armenta Solís

M en C. Adolfo Román Román

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Dr. Alejandro Millán Vega

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C.D. David Antonio Avila Arizmendi recibió beca del CONACYT. (No. de becario 204857)

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco profundamente al Dr. Eduardo Martínez Sandoval por todo el apoyo científico dedicado a mi formación profesional, a su gran calidad humana y sus palabras de aliento siempre con sabiduría y con un gran corazón.

A mis asesores Dr. Saúl López Silva y Dra Adakatia Armenta Solís, con todo cariño y alta estima, por su amistad, paciencia y gran enseñanza en todo momento, por su apoyo incondicional y su fé en mí.

Al M en C Adolfo Román Román por su gran habilidad y conocimientos aplicados en pro de éste trabajo de investigación, siempre con discernimiento y gran profesionalismo.

Al Dr. Ricardo Mejía Zepeda por sus valiosas aportaciones, sugerencias y sobre todo paciencia al tiempo invertido en la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Ariel Cruz que sin cuya aportación clínica y científica, no hubiera sido posible la estructuración de éste trabajo.

Al Dr. Eduardo Llamosas y al personal docente y administrativo en la clínica de endoperiodontología de la FES Iztacala UNAM por su aceptación, apoyo y confianza en un servidor.

Al Dr. Alejandro Millán Vega por su empuje hacia mi formación profesional.

Al Dr. Marco Antonio Leyva y Dra. Berenice Illades Aguiar por su fé y confianza en mí.

Al Dr. Alfonso Bernabé Carreño por su amistad, apoyo y amistad en todo momento.

A todo el personal académico y administrativo de la maestría en Ciencias Biomédicas y de la facultad de medicina de la UAG.

A mis compañeros de la maestría con quien compartí buenos momentos.

Esterasa Leucocitaria e Interleucina 1 beta en el diagnóstico de periodontitis

A mi Señor con todo mi corazón.....

A ti Zully por tu apoyo incondicional, en todo momento. Con todo mi amor.

A mis hijos; Aldo , Pablo e Imanoll

A ustedes mis hermanos Héctor y Mateo por alimentar mi ánimo

A la memoria de mis padres q.e.p.d.

INDICE

	Página
Abreviaturas	i
Indice de Figuras	ii
Indice de Cuadros	iii
Resumen	iv
Abstract	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	6
III. RESULTADOS	9
IV. DISCUSIÓN	21
V. CONCLUSIONES	24
VI. REFERENCIAS	25
ANEXOS	
1. Definición operacional de las variables	28
2. Carta de consentimiento informado	32
3. Reporte de resultados	34
4. Historia clínica de endoperiodontología FES Iztacala UNAM	36
5. Instructivo y guía de color de reacción de tiras reactivas MULTISTIX-10SG.	37
6. Protocolo de calibración para obtener el factor de absorbancia en pruebas de esterasa leucocitaria en fluido crevicular gingival.	39
7. Técnica de ELISA para Interleucina 1 Beta.	43

ABREVIATURAS

EL	esterasa leucocitaria
ELsc	esterasa leucocitaria en forma semicuantitativa
ELc	esterasa leucocitaria en forma Cuantitativa
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EP	enfermedad periodontal
FCG	fluído crevicular gingival
IDPB	Indice de placa dentobacteriana
IMC	Indice de masa corporal
IL-1 β	Interleucina- 1 Beta
PGE2	prostaglandina E2
<i>p</i> -NFA	<i>para</i> –nitrofenil acetato
PMN	leucocitos polimorfonucleares
PM	periodontitis moderada
PS	periodontitis severa
PL	periodontitis leve
PLA2	fosfolipasa A2
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
FESI	Facultad de Estudios Superiores Iztacala
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
RLP	Regresión Logística Politémica
RLM	Regresión Logística Múltiple
RM	Razón de Momios
IC _{95%}	Intervalo de Confianza al 95%

FIGURAS

	Página
Figura 1. Componentes celulares que intervienen en el desarrollo de la Periodontitis	3
Figura 2. Tendencia progresiva entre la cuantificación de Esterasa leucocitaria y la pérdida ósea.	13
Figura 3. Asociación positiva entre la Interleucina 1 β y la destrucción ósea.	14

CUADROS

	Página
Cuadro I. Características de la población de casos y controles.	10
Cuadro II. Mediciones clínicas periodontales de casos y controles por diagnóstico preliminar.	11
Cuadro III. Pruebas de laboratorio de casos y controles por diagnóstico preliminar.	12
Cuadro IV. Relación de parámetros clínicos de casos y controles asociados con diagnóstico de periodontitis por razón de momios e intervalos de confianza al 95%.	15
Cuadro V. Análisis de Regresión Logística Politómica de semicuantificación de esterasa leucocitaria con sondeo y diabetes mellitus para el diagnóstico de periodontitis.	17
Cuadro VI. Análisis de Regresión Logística Politómica para la cuantificación de esterasa leucocitaria elevada para el diagnóstico de periodontitis con factores de riesgo	19
Cuadro VII. Análisis de regresión logística múltiple de Interleucina 1 β con sondeo y pérdida ósea.	20

RESUMEN

OBJETIVO. Valorar la utilidad de la medición de la esterasa leucocitaria y la Interleucina 1 beta en fluido crevicular gingival como marcadores biológicos de la progresión de periodontitis. **MATERIAL Y METODOS.** Se efectuó un estudio con un diseño de casos y controles entre Agosto 2005 a Febrero 2006, definiendo como casos a pacientes con diagnóstico de periodontitis confirmada y controles a pacientes sin periodontitis. Se recolectaron muestras de 290 pacientes colocando puntas de papel estandarizadas dentro del surco gingival. Se midieron niveles de esterasa leucocitaria de forma cuantitativa y semicuantitativa ,también IL-1 β por ELISA en fluído crevicular gingival. Para la medición semicuantitativa de esterasa leucocitaria se utilizaron tiras reactivas Multistix-10SG. Para la cuantificación de la misma se midió espectrofotométricamente a 400 nm. Se calculó un factor de absorción y se reportó en número de leucocitos/ μ l. Se cuantificó la IL-1 β a través de una prueba de ELISA por medio del kit comercial marca Peprotech. Se evaluaron factores de riesgo asociados, profundidad de sondeo, resorción ósea e índice de placa bacteriana obtenidos del expediente clínico. **RESULTADOS** . La esterasa leucocitaria semicuantitativa mostró cambios de color en tiras reactivas con los casos y negativo en los controles. Los niveles de esterasa leucocitaria cuantitativa para casos fueron de 11 a 80 leucocitos/ μ l y en controles de 0 a 10 leucocitos/ μ l . Los niveles de IL-1 β para casos mostraron niveles mayores de 5.2 ng/ml y para controles menores 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 del 70%. **CONCLUSIONES.** La progresión de la enfermedad periodontal puede ser medida a través de los niveles de esterasa leucocitaria y de IL-1 β encontradas en fluído crevicular gingival.

Palabras clave: Periodontitis, Citocinas, Marcadores de inflamación, Diagnóstico rápido.

ABSTRACT

PURPOSE: To value the useful measurement of the leukocyte esterase and Interleukin -1beta in gingival crevicular fluid as a biologic mark predictor in the progresión of periodontal disease. **METHODS:** In a case-control study between August 2005 and February 2006 defining as cases patients with confirmed diagnosis of periodontal disease and controls patients with no periodontal disease. Samples from 290 patients was collected with standarized paper points positioned in the gingival sulcus. The quantification and semi-quantification of the leukocyte esterase levels and IL-1 β with an ELISA assay in gingival crevicular fluid was performed.. The semiquantification of the leukocyte esterase used Multistix -10SG strips. The quantification was measured at 400 nm wave length spectrum. An absorbance factor was calculated trough leucocytes/ μ l. An ELISA assay was performed to get the quantification of IL-1 β through a commercial ELISA Kit (Peprotech). The associated risk factors , deep probing, bone resortion and plaque index was got from the clinic data file. **RESULTS:** The leukocyte esterase semiquantification color developed was evident in cases but negative in controls. Leukocyte esterase quantification dropped in cases 11-80 leucocytes / μ l and in controls 0-10 leucocytes / μ l . IL-1 β levels got cases over 5.2 ng/ml and controls less than 5.2 ng/ml. Enzymatic tests had positive association with over 6 mm deep probing, over 4 mm bone resortion and over 70% plaque index. **CONCLUSIONS.** The progresión of periodontal disease can be measured through the levels of leukocyte esterase and IL-1 β collected from the gingival crevicular fluid.

Keywords: Periodontitis, Cytokines, Inflammation markers, Point of cure testing.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal se caracteriza por la pérdida de la unión del tejido conectivo y su inserción al hueso alrededor del diente así como la formación de bolsas debido a la migración apical del epitelio de unión.¹⁻⁴

Esta enfermedad en 2005 reporta en estudios de prevalencia, un aumento de 10% en la adolescencia a 90% en los 40 años y, pasada la cuarta década, la gran mayoría de la población muestra algún signo de periodontitis.^{5,6} En México en el mismo año se reporta una tasa de incidencia de gingivitis y enfermedad periodontal de 445 casos por cada 100,000 habitantes en un grupo de 25 a 44 de edad. En el estado de Guerrero durante el mismo período de tiempo en un estudio sin especificar grupos de edad se han reportado 11,000 casos de enfermedad periodontal en el total de la población.⁷

La etiología bacteriana de la enfermedad periodontal comprende tres bacterias: *Porphyromona gingivallis*, *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola*.

La placa dentobacteriana es el factor predisponente principal, sin embargo existen múltiples factores que agravan la permanencia o evolución de la enfermedad periodontal. La complejidad de la microflora asociada y el papel inmunológico que juega el huésped, la susceptibilidad genética y su respuesta metabólica, determinan la progresión de la enfermedad causando trastornos no solamente a nivel local sino sistémico.⁸⁻¹²

Existen diversos factores de riesgo asociados a la periodontitis como la diabetes mellitus, cuyos sujetos que la padecen tienen 3 veces la probabilidad de sufrir pérdida de inserción periodontal,¹³ el tabaquismo que implica 2.82 veces un riesgo de gravedad de complicar la condición periodontal,¹⁴ las cardiopatías, cuyos sujetos que padecen periodontitis tienen un 25% más de riesgo de complicar padecimientos coronarios,¹⁵ cambios hormonales como el embarazo, pubertad y menopausia que agravan las condiciones de los tejidos de soporte periodontal hasta un 18% más que aquellas personas sin trastornos hormonales.¹⁶ Otros factores implicados en menor proporción son: enfermedades virales como SIDA, herpes, candidiasis cuya seropositividad en

combinación con la edad confiere un aumento de hasta 2 veces el riesgo de pérdida de inserción,¹⁷⁻¹⁸ y factores genéticos como los polimorfismos del gen de Interleucina 1 beta relacionados con enfermedad periodontal severa en adultos.¹⁹ Estos factores están asociados con la destrucción de tejidos, infiltración de marcadores de inflamación crónica, mediadores de respuesta biológica y secreción de productos causantes de lisis celular y demás reacciones catabólicas que traen consigo trastornos a nivel sistémico.²⁰

La periodontitis, al estar asociada con enfermedades crónico degenerativas; desarrolla condiciones que agravan y aumentan las concentraciones de enzimas catabólicas en el fluido cervical gingival en pacientes con diabetes no controlada y con trastornos cardiovasculares comparado con aquellos que no la padecen. En la enfermedad periodontal aguda, los niveles de glucosa se elevan, se altera la microflora bacteriana, disminuye la respuesta inmunológica y aparecen pequeñas lesiones vasculares trastornando el metabolismo del colágeno. Al incrementarse el número de bacterias en la placa dental comienza la liberación activa de componentes celulares que incrementan la respuesta inflamatoria, así como el aumento de linfocitos, monocitos y macrófagos que se infiltran a los tejidos para liberar citocinas y prostaglandinas que exacerbaban la respuesta inflamatoria. Se liberan proteínas de fase aguda, linfocitos T y B y células plasmáticas así como anticuerpos en contra de microorganismos pudiendo causar una reacción cruzada con los tejidos del huésped.²¹ (Figura 1)

El criterio utilizado para el diagnóstico en la enfermedad periodontal es limitado para determinar el estadio del daño cuando se requiere conocer la actividad de la proteólisis, ya que se necesitan marcadores específicos que identifiquen fases o episodios de dicha actividad. Estudios han demostrado que la determinación de mediadores en fluidos biológicos son buenos indicadores de la actividad inflamatoria. Otros estudios relacionan la patogénesis de enfermedades periodontales identificando marcadores bioquímicos o inmunológicos en saliva y fluido crevicular reflejando la extensión de destrucción periodontal y prediciendo la progresión futura de la enfermedad.²³

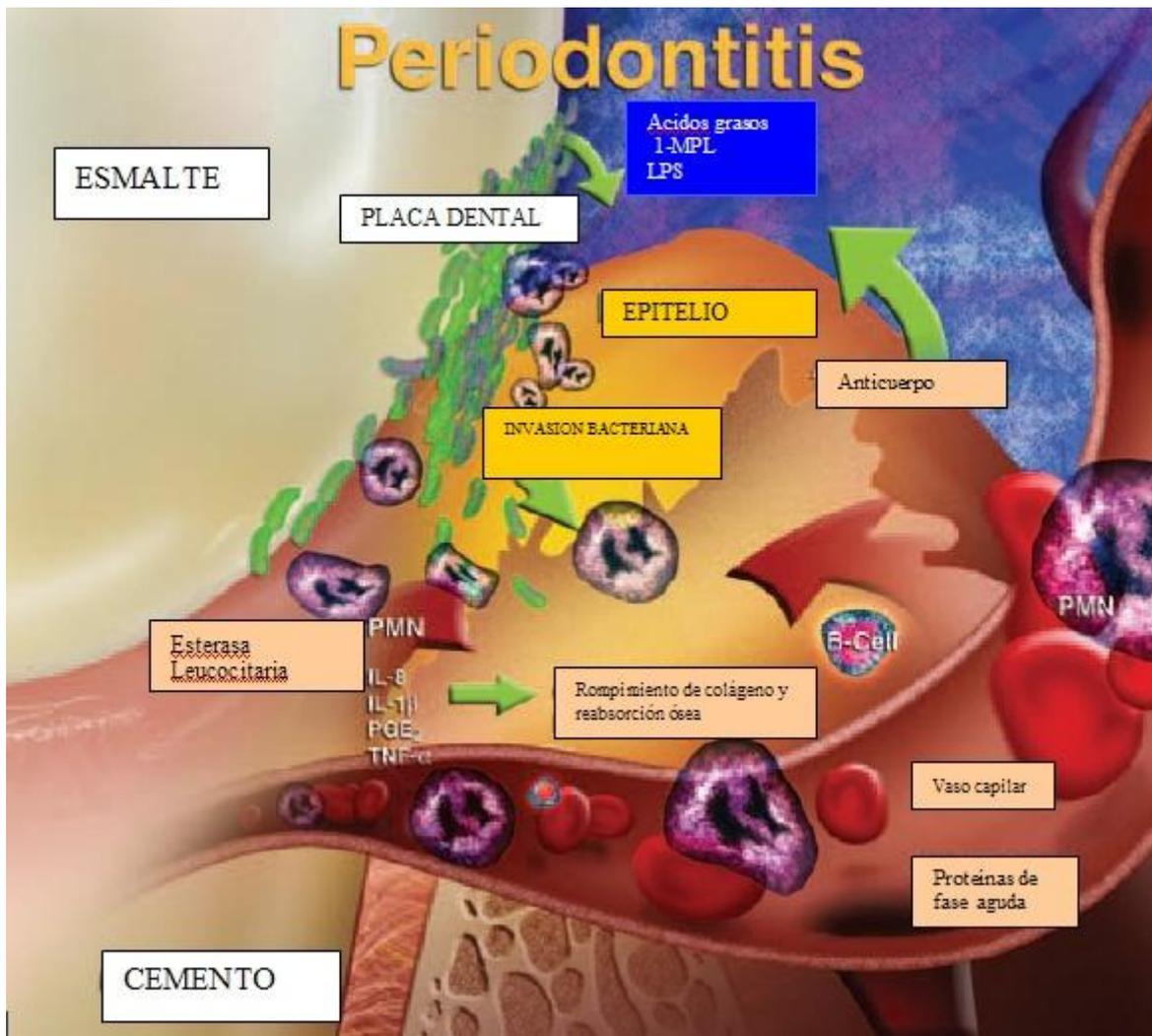


Figura 1. Componentes celulares que intervienen en el desarrollo de la Periodontitis.

Adaptado de Gin Compendium. Julio 2004 /Vol 25, No 7, Supl1.

Actualmente el clínico valora solamente el estado del paciente a través del sondeo periodontal, el control radiográfico y modelos de estudio. No se usa el análisis del fluido crevicular gingival (FCG), que puede ser útil para determinar el estado periodontal de forma rápida y precisa y donde se pueden hacer mediciones detectando metabolitos para determinar la progresión de la enfermedad. El fluido crevicular gingival es el producto de la filtración capilar de los vasos sanguíneos, linfáticos y epitelio de unión y sulcular principalmente, transudado en condiciones basales o inflamatorias, conteniendo elementos bioquímicos que se ofrecen como marcadores de diagnóstico o pronóstico de la periodontitis.²⁴⁻²⁵

Las esterases leucocitarias son enzimas que hidrolizan los enlaces éster; se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, en bacterias, hongos y animales. Están contenidas en los gránulos de los neutrófilos, están presentes en cuadros inflamatorios correlacionados con procesos bacterianos infecciosos como la periodontitis. Para medir su actividad, se han desarrollado métodos *in vitro* empleando un sustrato convencional para detectar su actividad como el *p*-nitrofenil acetato (*p*-NFA), el cual es una molécula con un enlace éster en su estructura que al hidrolizarse desarrolla color, y puede ser monitoreado a una longitud de onda de 400 nm.²⁶⁻²⁷

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 estrechamente relacionados con procesos de enfermedad periodontal crónica. Junto con el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) conforman uno de los ejes mayores de citocinas proinflamatorias de respuesta a endotoxinas bacterianas, virus, mitógenos o antígenos, trauma y procesos degenerativos óseos con alta actividad osteoclástica, pudiendo inducir la liberación de citocinas secundarias. Su sobreexpresión ha sido encontrada en procesos degenerativos óseo-cartilaginosos como la artritis reumatoide.²⁸

Se han encontrado niveles elevados de Interleucina 1 beta con pruebas de ELISA en fluido crevicular gingival en pacientes con enfermedad periodontal crónica y con pobre control glicémico en diabetes tipo 2; así como en madres comprometidas periodontalmente, con partos prematuros con bajo peso en recién nacidos. Los fibroblastos pueden llegar a producir PGE2 en respuesta a la IL-1 β .

Las pruebas de ELISA son una herramienta útil para determinar los niveles de IL-1 β en el FCG evidenciando su relación con la progresión de la enfermedad periodontal.²⁹⁻³¹

El objetivo del presente estudio fué valorar la utilidad de la medición de esterasa leucocitaria y de Interleucina 1 beta en fluído crevicular gingival como marcadores biológicos y como prueba diagnóstica de la progresión de la enfermedad periodontal comparándolos con los parámetros clínicos de profundidad de bolsas al sondeo, pérdida ósea y placa bacteriana, con la subsecuente estimación de factores asociados.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles con un tamaño de muestra de 290 pacientes con una razón 1:1, de 15 y más años de edad, de uno y otro sexo en la clínica de investigación y especialización en endoperiodontología en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México en Tlanepantla Estado de México, en el período de agosto de 2005 a febrero de 2006. Los Casos fueron definidos por diagnóstico confirmado de enfermedad periodontal basado en la profundidad de sondeo, pérdida ósea detectada radiográficamente e índice de placa dentobacteriana mayor al 20%, los Controles fueron sujetos sin enfermedad periodontal. Todos los participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado. Se excluyeron aquellos pacientes que estuvieron en desacuerdo con el estudio, con alguna discapacidad física que les impidiera trasladarse al lugar del estudio, presentaran alguna enfermedad grave y abandonasen el estudio. (Anexos 1 y 2)

Valoración clínica. Con base en el expediente clínico, se analizaron los factores de riesgo asociados como los 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 (Anexo 3).

Valoración periodontal. Para el diagnóstico de enfermedad periodontal se consideró el nivel de inserción a través del sondeo, el nivel de pérdida ósea valorada radiográficamente y el índice de placa dentobacteriana. (Anexo 4)

Recolección de muestra de fluido crevicular gingival. Se insertaron puntas de papel absorbente estandarizadas de 0.45 mm (Hygienic) dentro del surco gingival por 2 min 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 órganos dentarios primeros molares o incisivos centrales, y se absorbió un promedio de 2.5 μ L de fluido crevicular gingival, se introdujo en un tubo eppendorf con 150 μ L de agua estéril, y se transportó a un vial de plástico y congeló a -70°C.

Valoración semicuantitativa de esterasa leucocitaria en FCG. De la dilución anterior de fluido crevicular gingival se tomaron 20 μ L y se colocaron en una tira reactiva para análisis de orina marca Multistix-10SG en el lugar marcado para leucocitos dando un tiempo de reacción por 2 minutos. El resultado se categorizó de acuerdo a la coloración obtenida en trazas, leve, moderada o severa. No se tomaron en cuenta los cambios de color después de 2 minutos de reacción. (Anexo 5 y)

Valoración cuantitativa de esterasa leucocitaria en FCG. Para cuantificar la esterasa leucocitaria 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 μ L del sustrato (1mM concentración final) diluido en Tris-HCl (pH 8.0) 20 mM, NaCl 150 mM y TritonX-100 0.01% M a la que se le agregó 40 μ L de la muestra del FCG a una cubeta de cuarzo (Amersham) para realizar la medición de la dilución, se agitó suavemente por 30 segundos esperando 2 minutos de reacción procediendo a leer espectrofotométricamente a 400 nm (Ultrospec 3300 pro Amersham Biosciences). La absorbancia resultante se expresó en número de leucocitos/microlitro utilizando una curva de calibración diseñada para tal fin. (Anexo 6)

Determinación de Interleucina -1 Beta. Mediante prueba de ELISA con un anticuerpo recombinante anti IL-1 β y como sistema revelador la Avidina biotina se midió la cantidad de IL-1 β usando un kit comercial de ELISA (PEPROTECH).³²

Se siguieron las especificaciones del fabricante y se elaboró una curva de calibración con concentraciones desde 0 a 3 ng/ml. Se colocaron 50 μ L de la dilución de FCG a cada pozo. Se permitió el desarrollo de color durante 10 minutos, se midió la absorbancia a 405 nm en lector de placas de ELISA marca multiskan AFCENT V1.24 Termo Labsystems. Los resultados se reportaron en ng/ml de acuerdo al factor de dilución. (Anexo 7)

Análisis estadístico. Con la información del expediente clínico se elaboró una base de datos y se incorporaron las mediciones obtenidas de esterasa leucocitaria y de IL-1 β . Se recodificaron las variables, se determinaron las frecuencias simples para las variables cualitativas, media y desviación estándar para las variables cuantitativas simétricas, se utilizó el paquete estadístico STATA v.8. aplicándose una prueba de regresión logística multinomial, calculando la razón de momios (RM) crudos y ajustados con sus respectivos intervalos de confianza al 95%.y valor de “p”. (Cuadros 2-7)

III. RESULTADOS.

Para evaluar la progresión de la enfermedad periodontal se midió la esterasa leucocitaria y la Interleucina 1 beta en fluido crevicular gingival, y se estimaron los factores asociados a la enfermedad periodontal .

Se incluyeron las características de 290 personas, 145 Controles y 145 Casos identificados con diagnóstico preliminar de periodontitis. El rango 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 (cuadro 1).

Se observó aumento en la profundidad de bolsas al sondeo periodontal de 6 y más mm en los casos, 28% diferente a los controles. De manera similar se encontró incremento en la pérdida ósea entre los casos por arriba de 4 mm distinto a los controles, (cuadro 2).

La **semicuantificación** de esterasa leucocitaria mostró una tendencia ascendente conforme aumentaba la progresión de la enfermedad. La reacción colorimétrica mostró cambios perceptibles en los controles y en los casos con periodontitis mostraron niveles moderados a altos (cuadro 3).

La medición **cuantitativa** de esterasa leucocitaria mostró para los controles un rango de 0 a 10 leucocitos/ μ L por microlitro, mientras que en los casos fue de 11 a 20 leucocitos/ μ L para periodontitis leve, 21 a 50 leucocitos/ μ L para la periodontitis moderada y 51 a 80 leucocitos/ μ L para la periodontitis severa (cuadro 3 y Figura 2).

Cuadro I. Características de la población* de casos y controles.

VARIABLES	CONTROLES n=145 (50%) Sin Periodontitis		CASOS n=145 (50%) Con Periodontitis		Subtotal Casos (%)	TOTAL N=290 (100%)
	LEVE	MODERADA	SEVERA			
SEXO	145 (50%)	55 (18.9%)	46(15.8%)	44(15.2%)	145 (50.0)	290(100%)
Femenino	100 (34.4)	38 (13.1)	33 (11.3)	28 (9.6)	99 (34.2)	199 (68.6)
Masculino	45 (15.5)	17 (5.8)	13 (4.4)	16 (5.5)	46 (15.8)	91 (31.3)
EDAD						
15-30	41(14.3)	8(2.7)	5(1.7)	6(2.0)	19 (6.4)	60 (20.7)
31-44	25(8.6)	18 (6.2)	10 (3.4)	14 (4.8)	42(14.4)	67(23.0)
45-60	65 (22.4)	18 (6.2)	26 (9.0)	23 (7.9)	67(23.0)	132 (45.5)
61-74	11 (3.7)	11 (3.7)	4 (1.3)	1 (0.3)	16(5.5)	27(9.3)
75-90	3 (1.0)	0	1 (0.3)	0	1(0.3)	4(1.3)
\bar{X} =43.8 ±14.3	\bar{X} =42.1±16.0	\bar{X} =45.9±13.3	\bar{X} =47.1±11.6	\bar{X} =43.1±11.2	\bar{X} =45.3±12.0	
Niveles de Glucosa						
80 -110 mg/dl	80 (27.5)	19 (6.5)	26 (8.9)	21(7.2)	66(22.7)	146(50.3)
111-130 mg/dl	65 (22.4)	36 (12.4)	20 (6.8)	23 (7.9)	79 (27.2)	144(49.6)
\bar{X} = 109.6 ±10.7						
Diabetes Mellitus						
NO	133 (45.8)	52 (17.9)	39 (13.4)	33 (11.3)	124(42.7)	257(88.6)
SI	12 (4.1)	3 (1.0)	7 (2.4)	11 (3.7)	33(11.4)	33 (11.4)
IMC kg/m2						
<18.5	9 (3.1)	0	0	0	0	9 (3.1)
18.5 - 24.9	45 (15.5)	20 (6.8)	18 (6.2)	18 (6.2)	56 (19.3)	101 (34.8)
>25 y mas	91 (31.3)	35 (12.0)	28 (9.6)	26 (8.9)	89 (30.6)	180 (62.1)
\bar{X} = 26.09 ±4.2						
T.A. Sistólica						
100 - 120 mm	109(37.5)	41 (14.1)	33 (11.3)	33 (11.3)	107 (36.8)	216 (74.5)
121 - 160 mm	36 (12.4)	14 (4.8)	13 (4.4)	11 (3.7)	38 (13.1)	74 (25.5)
\bar{X} = 119.4. ± 7.2						
T.A. Diastólica						
60 - 80 Hg	88 (30.3)	25 (8.6)	26 (8.9)	20 (6.8)	71 (24.4)	159 (54.8)
81 - 110 Hg	57 (19.6)	30 (10.3)	20 (6.8)	24 (8.2)	74 (25.5)	131 (45.2)
\bar{X} = 80.8 ±7.12						
HIPERTENSION						
NO	120(41.3)	44 (15.1)	40 (13.7)	31(10.6)	115 (39.4)	235 (81.1)
SI	25 (8.6)	11 (3.7)	6 (2.0)	13 (4.4)	30 (10.3)	55 (18.9)
TABAQUISMO						
NO	130 (44.8)	44 (15.2)	39 (13.4)	35 (12.0)	110 (37.9)	248 (85.9)
SI	15(5.2)	11 (3.7)	7 (2.4)	9 (3.1)	33 (11.3)	42 (14.1)
FRECUENCIA CEPILLADO						
1 -2 por día	114 (39.3)	46 (15.8)	39 (13.4)	38 (13.1)	123 (42.4)	237 (81.7)
3 y mas por día	31 (10.6)	9 (3.1)	7 (2.4)	6 (2.0)	22 (7.5)	53 (18.3)
FRECUENCIA HILO DENTAL						
No usa	106(36.5)	42 (14.4)	36 (12.4)	40 (13.7)	118 (40.6)	224 (77.2)
1 - 2 por día	38(13.1)	12 (4.1)	10 (3.4)	4 (1.3)	26 (8.9)	64 (22.1)
3 y mas por día	1(0.3)	1 (0.3)	0	0	1 (0.6)	2 (0.6)

-Clínica Endoperiodontología -FESI UNAM , Tlanepantla Edo. De México.

Cuadro II. 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%)	
		SEVERA	LEVE	MODERADA			
INDICE DE PLACA BACTERIANA	145(50%)	55(18.9)	46(15.8)		145 (50%)	290 (100%)	
0- 20%	35(12.1)	44(15.2)	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)	135 (46.5)	
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 Tlalnepantla Edo. De México.

Cuadro III. 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 Leucocitaria semicuantitativa	145 (50%)	55(18.9)	46(15.8)	44(15.2)	145(50%)	290 (100%)
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/ μ L	145 (50)	1 (0.3)	0	0	1 (0.3)	146 (50.3)
11-20 leucocitos/ μ L	0 (0)	54(18.6)	0	0	54(18.6)	54 (18.6)
21-50 leucocitos/ μ L	0 (0)	0	46(15.8)	6(2.0)	52(17.9)	52 (17.9)
51-80 leucocitos/ μ 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)	0	0	0	0	73 (25.1)
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)	0	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)

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

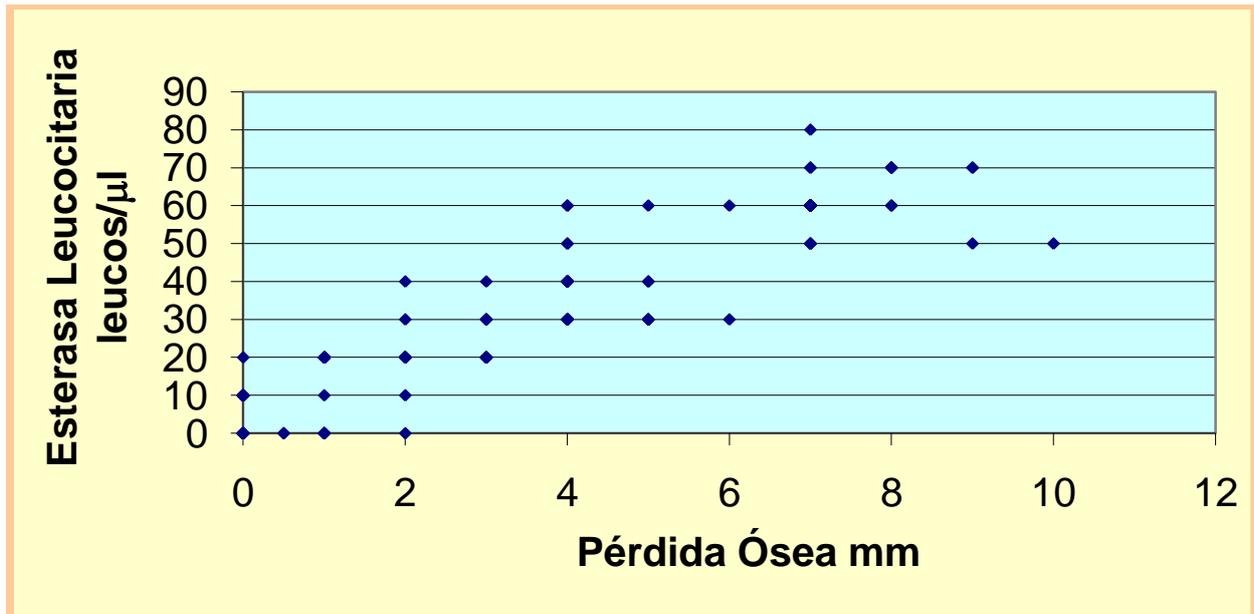


Figura 2. Tendencia progresiva entre la cuantificación de Esterasa leucocitaria y la pérdida ósea.

Con las pruebas de ELISA se observaron niveles de Interleucina 1 beta incrementados en forma directamente proporcional a la progresión de la enfermedad. En los controles se observó rangos de 0 a 5.2 ng/ml y en los casos mostraron rangos de 5.2 ng/ml a más. De acuerdo a los niveles de Interleucina 1-beta 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 3 y figura 3).

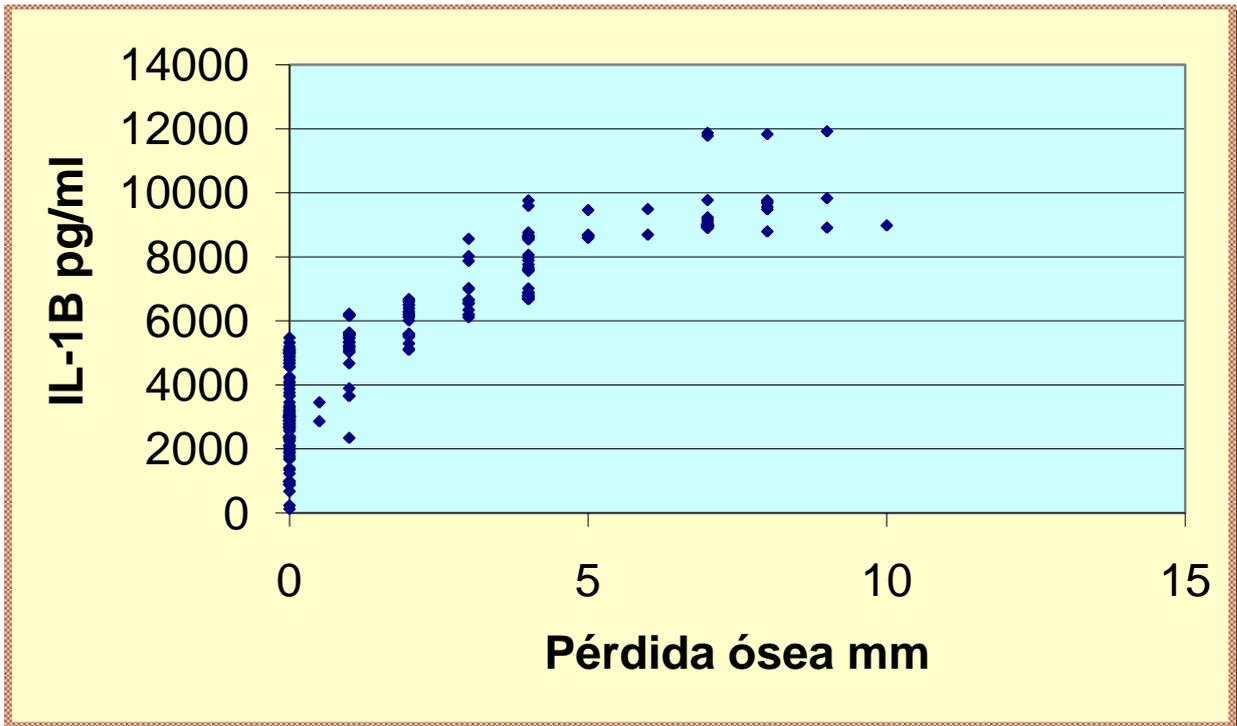


Figura 3. Asociación positiva entre los niveles de Interleucina 1 β y la destrucción ósea.

En un análisis de riesgo crudo que posiblemente contengan algún efecto de confusión mostró que aquellos pacientes con niveles de placa bacteriana por arriba del 50% tienen hasta tres y media veces el riesgo de padecer periodontitis en comparación con aquellos que están por debajo del 50%. (RM 3.5 IC_{95%} 1.5 – 7.8). De manera similar, la profundidad de bolsas al sondeo por arriba de 4 mm tiene 46 veces el riesgo de padecer enfermedad periodontal en comparación con aquellos pacientes con sondeo menor a 4 mm (RM 45.9 IC_{95%} 13.0 – 161.0). La pérdida ósea por arriba de los 4 mm tiene más de 700 veces el riesgo de padecer periodontitis en comparación con aquellos pacientes sin pérdida ósea (RM 743.0 IC_{95%} 10.5 – 5.2 x 10⁴), Cuadro 4.

Cuadro IV. Relación de parámetros clínicos de casos y controles asociados con diagnóstico de periodontitis por razón de momios con intervalo de confianza al 95%

VARIABLE	CONTROLES n (%)	CASOS N (%)	Riesgo crudo RM[®] IC_{95%}	Valor p[†]
INDICE DE PLACA BACTERIANA				
0 - 20 %	35 (12.2)	19 (6.5)	1.0*	
21 - 50 %	68 (23.4)	54 (18.6)	1.4 (0.7 -2.8)	0.2610
51 - 70 %	21 (7.2)	32 (11.1)	2.8 (1.2 -6.3)	0.0094
71 - 100 %	21 (7.2)	40 (13.8)	3.5 (1.5 – 7.8)	0.0012
SONDEO				
1- 3 mm	134 (46.2)	13 (4.4)	1.0*	
4 – 5 mm	11 (3.8)	49 (16.9)	45.9(13.0-161.0)	<0.0001
6 – 7 mm	0 (0)	29 (10.0)	-	<0.0001
8 y mas mm	0 (0)	54 (18.7)	-	<0.0001
PERDIDA OSEA				
0 mm	134 (46.2)	1 (0.3)	1.0*	
0.5 – 3 mm	11 (3.8)	61(21.1)	743.0 (10.5- 5.2 x 10 ⁴)	<0.0001
4 – 6 mm	0 (0)	43 (14.8)	-	<0.0001
7 y mas mm	0 (0)	40 (13.8)	-	<0.0001

-Clínica Endoperiodontología- FESI / UNAM Tlanepantla, Edo. De México.

® Razón de momios

IC_{95%} Intervalo de confianza al 95%

*Valor y categoría de referencia

†Nivel de Significancia

Análisis de Regresión Logística

El primer modelo de análisis de regresión logística politómica de la **semicuantificación** de esterasa leucocitaria, mostró que los casos en que la profundidad de bolsas al sondeo eran de 6 a 7 mm, tienen 5 veces el riesgo de presentar niveles moderados de esterasa leucocitaria (RM=5.04 IC_{95%} 3.2 – 7.7). Cuando la profundidad de bolsas al sondeo es mayor a 8 y mas mm tiene hasta 20 veces el riesgo de padecer niveles altos de esterasa leucocitaria (RM=20.4 IC_{95%} 9.4 - 44.4). También se observó que entre los pacientes diabéticos existe 3 veces el riesgo de desarrollar niveles altos de esterasa leucocitaria (RM=3.2 IC₉₅ 0.7 14.2) sin embargo no es estadísticamente significativo para los niveles convencionales (cuadro 5).

Cuadro V. Análisis de Regresión Logística Politémica de semicuantificación de Esterasa leucocitaria con sondeo y Diabetes mellitus para el diagnóstico de periodontitis.

Variables	Análisis Bivariado crudo	RLP‡		Valor p†
	RM® IC _{95%}	RM®	IC _{95%}	
Esterasa leucocitaria Semicuantitativa BAJA				
SONDEO (1-5 mm)	1.0	1.0*		-
SIN DIABETES	1.0	1.0*		-
Esterasa Leucocitaria Semicuantitativa MODERADA				
SONDEO (6-7 mm)		5.0	(3.2 – 7.7)	<0.0001
CON DIABETES	1.8 (0.8 -3.9)	2.1	(0.6 – 7.3)	0.228
Esterasa leucocitaria Semicuantitativa ALTA				
SONDEO (8 y mas mm)	-	20.4	(9.4 – 44.4)	<0.0001
CON DIABETES	-	3.2	(0.7 – 14.2)	0.123

-Clínica Endoperiodontología –FESI /UNAM *, Tlanepantla Edo de México .

‡ Regresión Logística Politémica

® Razón de momios

IC_{95%} Intervalo de confianza al 95%

*Categoría y valor de referencia

† Nivel de Significancia

El segundo modelo de Regresión logística politémica para la **cuantificación** de esterasa leucocitaria elevada para predecir periodontitis, mostró que la profundidad de bolsas al sondeo de 6 a 7 mm tuvo casi siete veces la probabilidad de asociación con niveles de 21 a 50 leucocitos/ μ L de esterasa leucocitaria (RM=6.6 IC_{95%} 4.0 – 10.7), y 55 veces el riesgo de alcanzar niveles de 51 a 80 leucocitos/ μ L de esterasa leucocitaria cuando la profundidad de bolsas al sondeo es de 8 y mas mm (RM=55.3 IC_{95%} 17.0 – 179.2). La presencia de altos índices de placa dentobacteriana por arriba del 70% incrementa 2 veces el riesgo de alcanzar niveles altos de esterasa leucocitaria (RM=2.2 IC_{95%} 1.1 – 4.2) y si se es diabético el riesgo es de hasta 4 veces mayor (RM=3.8 IC_{95%} 0.7 – 20.4) pero no tuvo significancia estadística al 95% (cuadro 6).

Cuadro VI. Análisis de regresión logística politómica para la cuantificación de esterasa leucocitaria elevada para diagnóstico de periodontitis con factores de riesgo asociados.

VARIABLES	Análisis Bivariado crudo RM® IC _{95%}	RLP‡ RM® IC _{95%}	Valor p†
ESTERASA LEUCOCITARIA NORMAL 0 -20 leucocitos /µL			
SONDEO (<6mm)	1.0	1.0*	
PLACA BACTERIANA (0-50%)	1.0	1.0*	
SIN DIABETES MELLITUS			-
ESTERASA LEUCOCITARIA NIVEL MEDIO 21-50 leucocitos/µL			
SONDEO (6-7 mm)	-	6.6 (4.0 -10.7)	<0.0001
PLACA BACTERIANA (51-70%)	2.8 (1.2 – 6.3)	0.9 (0.6 – 1.4)	0.804
CON DIABETES MELLITUS	1.8 (0.8 – 3.9)	1.3 (0.3 – 5.2)	0.636
ESTERASA LEUCOCITARIA NIVEL ELEVADO 51-80 leucocitos/µL			
SONDEO (8 y mas mm)	-	55.3 (17.0 – 179.2)	<0.0001
PLACA BACTERIANA (70-100%)	3.5 (1.5 – 7.8)	2.2 (1.1 -4.2)	0.019
CON DIABETES MELLITUS	-	3.8 (0.7 – 20.4)	0.120

-Clínica Endoperiodontología –FESI / UNAM , Tlalnepantla Edo de México .

‡ Regresión Logística Politómica

® Razón de momios

IC_{95%} Intervalo de confianza al 95%

*Categoría y valor de referencia

† Nivel de Significancia

Para el tercer modelo de regresión logística múltiple con un punto de corte de riesgo para Interleucina 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 tienen 24 veces el riesgo de desarrollar niveles superiores a 5.2 ng/ml (RM=23.7 IC_{95%} 5.8 -95.9) y con una pérdida ósea mayor a 4 mm tienen 85 veces el riesgo de desarrollar niveles superiores a 5.18 ng/ml (RM=85.5 IC_{95%} 19.7 – 371.4) cuadro 7.

Cuadro VII. Análisis de Regresión Logística múltiple • de Interleucina 1 β ** con sondeo y pérdida ósea

Variables	Análisis Bivariado crudo RM® IC _{95%}	RLM • RM® IC _{95%}	Valor p†
Sondeo			
< 6 mm	1.0	1.0*	-
> 6 mm	-	23.7 (5.8 -95.9)	<0.0001
Pérdida ósea			
< 4 mm	1.0	1.0*	-
> 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%

*Categoría y valor de referencia

† Nivel de Significancia

** Punto de corte de riesgo para IL-1B 5.18 ng/ml y mas

No se 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.

DISCUSIÓN:

En éste trabajo 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 está asociado con un aumento en los niveles de ésta esterasa y de ésta citocina.

Nuestro estudio mostró que niveles moderados de esterasa leucocitaria medida semicuantitativamente tienen una asociación positiva con la profundidad de bolsas al sondeo de 6 a 7 mm (RM=5.0 IC 95% 3.2-7.7) y niveles altos de esterasa leucocitaria tienen relación directa con profundidad de bolsas al sondeo superiores a 8 mm (RM=20.4 IC 95% 9.4 -44.4).

Un estudio refiere el uso de tiras reactivas para medir de forma semicuantitativa la esterasa leucocitaria en saliva de pacientes pediátricos valorando niveles moderados a severos de enfermedad periodontal³³

Las referencias sobre la esterasa leucocitaria medida de forma semicuantitativa entre otras enzimas en estudios efectuados en saliva, esputo u otros fluidos corporales han sido útiles al evaluar la progresión en diversos procesos patológicos, entre ellos la periodontitis³⁴⁻⁴⁴

No se encontraron estudios publicados que refieran la medición de esterasa leucocitaria en forma semicuantitativa en fluido crevicular gingival para medir progresión de periodontitis. Con base en los resultados del estudio, se propone éste método accesible y práctico para su aplicación práctica en el consultorio dental.

Se encontró que la medición cuantitativa de la esterasa leucocitaria mostró que los niveles de 21 a 50 leucocitos/ μ L se incrementaron cuando la profundidad de bolsas al sondeo fué de 6 a 7 mm (RM=6.6 IC 95% 4.0 -10.7), y niveles altos

de 51 a 80 leucocitos / μ L aumentaron cuando la profundidad de bolsas al sondeo fué mayor a 8 mm (RM =55.3 IC 95% 17.0-179.2).

De manera similar, nuestro estudio mostró que los niveles de la medición cuantitativa de esterasa leucocitaria se incrementan con altos índices de placa dentobacteriana en pacientes con periodontitis severa (RM =2.2 IC 95% 1.1 – 4.2).

Después de una búsqueda en las bases de datos Medline y Lilacs de 1996 a la fecha, con los descriptores esterasa leucocitaria, periodontitis y fluido crevicular gingival, no se reportan estudios sobre la progresión de periodontitis asociado con niveles de esterasa leucocitaria medidas de forma cuantitativa.

Este trabajo parece ser el primero en mostrar dicha asociación, sin embargo su accesibilidad al cirujano dentista de práctica general es cuestionable, por la complejidad del método, por lo que se requiere simplificar su procedimiento para volverlo de utilidad práctica.

Se mostró que niveles de IL-1 β superiores a 5.2 ng/ml están relacionados directamente con el incremento de profundidad de bolsas al sondeo superior a 6 mm (RM=23.7 IC 95% 5.8 -95.9) y pérdida ósea superior a 4 mm (RM= 85.5 IC 95% 19.7-371.4). Nuestros resultados mostraron una tendencia similar con lo publicado por Stashenko⁴⁵ donde reporta niveles en casos de 8 a 11.7 ng/ml y controles 2 a 5 ng/ml estableciendo la correlación de niveles elevados de ésta citocina con enfermedad periodontal crónica y procesos degenerativos óseos.

Otro estudio de casos y controles efectuado por Faizuddin⁴⁶ reporta niveles de IL-1 β en sujetos con periodontitis de 890 pg/ml y en sujetos sanos de 9 a 18 pg/ml. Sin embargo éstos 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 Interleucina-1 beta 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.⁴⁷⁻⁴⁹ Aún así, su medición puede contribuir para complementar el diagnóstico clínico, sin embargo no es accesible en éste momento por la complejidad de procesar la técnica en el laboratorio siendo de difícil manipulación para el cirujano dentista de práctica general.

Con éstos resultados, se torna factible la elaboración de kits comerciales que sean prácticos y manipulables que puedan facilitar al cirujano dentista su utilidad contribuyendo al diagnóstico de la progresión de la enfermedad periodontal,

Nuestros 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, Esto podría deberse a que no se encontraron valores estadísticamente significativos en el análisis bivariado, esto podría explicarse debido al tamaño de muestra con el que trabajamos que no permitió establecer una asociación.

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 se descartó que pudiera tener algún otro padecimiento odontológico que alterara la condición periodontal o la respuesta inmune.⁵⁰⁻⁵³

El diseño metodológico y la utilidad del estudio de casos y controles es un tipo de muestreo que permite identificar la asociación existente entre los parámetros clínicos que identifican a la periodontitis y las pruebas enzimáticas en la progresión de la enfermedad periodontal.

CONCLUSIONES:

Se encontró una asociación positiva entre la severidad de la lesión periodontal y los cambios en la esterasa leucocitaria 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 pudiendo realizarse 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. Ésta fue una medición más precisa que la esterasa leucocitaria medida semicuantitativamente, sin embargo se requiere simplificar el procedimiento para hacer accesible su utilidad al cirujano dentista de práctica general 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 éste momento su aplicación es cuestionable para el cirujano dentista de práctica general en el consultorio por la complejidad de manipulación.

Con éstos resultados podemos concluir que los niveles de esterasa leucocitaria 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 .

REFERENCIAS

- 1) Ozmeric N. Advances in Periodontal markers *Clin Chim Acta*. 2004 ;343 : 1-16
- 2) Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol* 1996;11:37-215
- 3) Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Periodontal disease activity. *J Periodontol Res* 1996;175:521-522.
- 4) McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol* 2002;72:1377-1391
- 5) Epidemiology of periodontal diseases. Position Paper. Academy Report. *J Periodontol* 2005;76:140-1419.
- 6) Lindhe J. *Periodontología clínica e Implantología odontológica* Epidemiología de la enfermedad periodontal Editorial Panamericana. (2003) 69-365.
- 7) 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
- 8) Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology 2000* 2004;36:14-26
- 9) Delima A, Vand Dyke T. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000* 2003;31:55-76.
- 10) 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.
- 11) Alugupalli K, Kalfas S, Edwardsson S, Naidu A, Lactoferrin interaction with Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Oral Microbiol Immunol* 2005;10:35-41.
- 12) Page RC, Kornman KS. The Pathogenesis of human periodontitis: an introduction. 1997;14; 9-11.
- 13) Guerrero F, Torres M. Identificación de factores de riesgo asociado a enfermedad periodontal y enfermedades sistémicas. *ADM* 2004 ;3:92-96
- 14) López-Correa A. Asociación de enfermedad periodontal con enfermedades cardiovasculares. *Colombia Médica* 2004;36: supl 2:17-22.
- 15) Sukugawa F. Factores de riesgo para enfermedades gingivo periodontales. *Colombia Médica* 2004 ; 37 supl 1 :25-31.
- 16) Jin L, Yu C, Corbett EF. Granulocyte elastase activity in state and flow gingival crevicular fluid. *J Periodontol Res*;2003;38;303-310.
- 17) Ebersole J. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontology 2000* 2003; 31:135-166
- 18) Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster 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.
- 19) 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
- 20) Velli-Jukka U. Gingival crevice fluid: an introduction. *Periodontology 2000* 2003; 31: 9-11.
- 21) Scappone F. Periodontal inflammation: From gingivitis to systemic disease. *Gin Compendium*. Julio 2004 /Vol 25, No 7, Supl 1:16-25
- 22) Suomalainen K, Saxen L, Vilja P, Tenovou J, Peroxidases, 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.
- 23) Arce RM. Terapia periodontal del futuro. *Colombia Médica* 2004;35: supl 1:40-47.
- 24) 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;31:167-80.
- 25) Gilham D, Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* 2005;36:139-147
- 26) Rover S, Cesura A, M, Huguenin P, Kettler R, Szente A. Synthesis and Biochemical

- evaluation of N-(4 Phenylthiazol-2-yl)benzenesulfonamides as High affinity Inhibitors of Kyneurinine 3-Hidroxiylase, *J.Med Chem*,1997 ,40,4378-4385.
- 27) Graves D, Cochran D. The Contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401.
 - 28) Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: Fibroblast biology. *J Periodontol* 2003;7; 103-110
 - 29) Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the patogénesis of peridodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periododontolgy* 2000 2001; 14:216-248.
 - 30) Deinzer R, Waschul B, Hersforth A. Effects of experimental gingivitis on crevicular PGE2 in a split mouth trial. *J Clin Periodontol* .2004;31;501-505.
 - 31) Catálogo Peptotech. Cytokine Index .2004
 - 32) 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.
 - 33) Miyasaki KT, Nisengard RJ, Haake SK. Immunity and inflammation; basic concepts. In: MG Newman, HH Takei, FA Carranza, editors. *Caranza's Clinical Periodontology*, 9th edition. W.B. Saunders 2001 Philadelphia. PA. P. 113-32.
 - 34) Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol* 2000;27:453-65.
 - 35) 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.
 - 36) Nieminen A, Nordlund L, Uitto VJ. The effect of treatment on the activity of salivary proteases and glycosidasis in adults with advance periodontitis. *J Periodontol* 2003;64:297-301.
 - 37) 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.
 - 38) Ozmeric N, Elgun S, Uraz A. Salivary arginase in patients with adult periodontitis. *Clin Oral Investig* 2000;4:21-4.
 - 39) Gossrau R. Peptidases II. Localization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV). Histochemical and biochemical study. *Histochemistry* 1999;60:231-48.
 - 40) 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.
 - 41) Igman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitirs in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127-32.
 - 42) Van Steijn GJ, Amerogen AV, Veerman EC, Kasanmoentalib 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.
 - 43) Cruz-Romero G, Mantilla J. Detección de Porphyromonas endodontalis en saliva total por PCR. *Colombia Médica* 2004;36: supl 1:39-47.
 - 44) Stashenko et al, Bone resortion and profile of body cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 2001;62;504-509
 - 45) Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini N. Estimation of Interleukin-1 β levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *J Periodont Res*. 2003;38;111-114.
 - 46) Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2002 Jan;29(1):48-53.
 - 47) Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 β and Interleukin 18; Regulation and activity in local inflammation. *Periodontology* 2000:2004;35:42-52.
 - 49) 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.
 - 50) Loos B. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontal* 2005; 76; 2106-2115
 - 51) Davis E. Scott A, Macckey & Howard T, Mac Donald T. Systemic disease and periodontitis manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology* 2000;2003;32;82-104.

- 52) Sinem E, Sahingur & Cohen R. Analysis of host response and risk of disease progression. *Periodontology 2000*;2004;34;57-83.
- 53) Havemose-Poulsen A, Korsbaek-Sorensen L, Stoltzer K, Bendtzer K, Holmstrup P. Cytokine profiles in peripheral blood and whole blood cells associated with aggressive periodontitis, Juvenile Idiopathic Arthritis and Rheumatoid Arthritis. *J Periodontol* 2005; 76; 2276-2285.

ANEXO 1

Definición operacional de las variables

DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

VARIABLE DE RESPUESTA	DEFINICIÓN TEÓRICA	DEFINICIÓN OPERATORIA	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR
Enfermedad periodontal	Pérdida de la unión del tejido conectivo y su inserción al hueso alrededor del diente y en conjunción con la formación de bolsas periodontales debido a la migración apical del epitelio de unión (inserción epitelial)	Sonda periodontal Fox Williams milimetrada, para medir profundidad de bolsas	Cuantitativa ordinal	milímetros
		Valoración radiográfica de pérdida ósea	Semicuantitativa ordinal	Pérdida ósea en mm por Niveles 1)Leve (2 - 3) 2)Moderado (4 - 6) 3)Severo (7 a +)
		Indice de placa dentobacteriana	Cuantitativa ordinal	Porcentaje
Identificación de fase clínica a través de la detección de Esterasa Leucocitaria	Enzimas de los Neutròfilos presentes en fluído crevicular gingival en procesos inflamatorios correlacionados con procesos bacterianos infecciosos	Valoración a través de tira reactiva	Semicuantitativa Ordinal	Presencia en niveles 1) Trazas 2) BajoLeve 3) Moderado 4) Alto
		Valoración a través de Espectrofotometría	Cuantitativa Ordinal	Leucocitos/ µl
Identificación de IL-1β	Citocina proinflamatoria	Identificación de citocina en prueba de Elisa	Cuantitativa	ng/ml

Esterasa Leucocitaria e Interleucina 1 beta en el diagnóstico de periodontitis

Variable de Exposición	Definición Teórica	Definición Operativa	Escala de Medición	Indicador
GRUPO 1	DEMOGRAFICOS			
Edad	Período cronológico de tiempo de años de vida cumplidos	Aplicación de respuesta en número de los años cumplidos al momento.	Cuantitativa Ordinal	Años cumplidos
Sexo	Conjunto de características anatómo-fisiológicas que distinguen al hombre de la mujer entre los individuos de una misma especie	Aplicación a la respuesta de selección en Masculino o Femenino	Cualitativa Nominal	1) Masculino 0) Femenino
GRUPO 2	PATOLOGICOS			
Diabetes	Hiperglicemia crónica por deficiencia en la producción de Insulina, afectando el metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y grasas. Y cuyos niveles de Glucosa en sangre se encuentren por arriba de 110 mg/dl	Aplicación de prueba ACUTREND con tira reactiva . Dato aportado por el expediente clínico	Cuantitativa nominal	1) Hasta 110 mg/dl 2) Arriba de 110 mg/dl
Antecedentes Heredo-familiares de Diabetes Mellitus.	Todo historial familiar de Diabetes Mellitus incluyendo abuelos, padres, hermanos, tíos.	Aplicación de respuesta en el cuestionario	Cualitativa Nominal	1) SI 0) NO
Tensión Arterial	Cifra que dé como resultado la toma de la tensión arterial	Medición con baumanometro digital considerándose el primer ruido presión sistólica y el segundo como diastólica, y cuyos valores normales oscilen entre 120/80 mm/hg. Dato aportado del expediente clínico.	Cuantitativa de Razón	1) Hasta 130/90 mm/Hg 2) Arriba de 130/90 mm/Hg
Antecedentes Heredo-Familiares de Hipertensión Arterial	Todo historial familiar de Hipertensión arterial incluyendo abuelos, padres, hermanos, tíos.	Aplicación de respuesta en el cuestionario	Cualitativa Nominal	1) SI 0) NO
Medicamentos	Agente terapéutico prescrito por médico tratante para control de enfermedad o estabilidad hormonal	Mención de aquellos medicamentos que se ingieren para control de enfermedades por prescripción médica	Cualitativa nominal	1) Antihipertensivos 2) Hipoglucemiantes orales 3) Anticonceptivos orales 4) Analgésicos, antiinflamatorios

Variable de Exposición	Definición Teórica	Definición Operativa	Escala de Medición	Indicador
GRUPO 3	HIGIENICO-DIETETICOS			
Placa Dentobacteriana	Masa gelatinosa compuesta por colonias de bacterias que se adhiere tenazmente a la superficie dentaria y estructuras adyacentes	Presencia de superficies pigmentadas a través del contacto con tabletas reveladoras en comparación con las superficies no pigmentadas de los órganos dentarios presentes , mediante la obtención de una regla de tres simple.	Cuantitativa ordinal	Porcentaje
Frecuencia de cepillado	Remoción mecánica de Placa Dentobacteriana por el cepillado dental	Número de veces con que acostumbra cepillarse el paciente, Aplicación de respuesta al cuestionario	Cuantitativa Ordinal Continua	Número de veces que se cepilla en el día
Frecuencia de uso de Hilo Dental	Remoción mecánica de Placa dentobacteriana de superficies interproximales por el hilo dental	Número de veces con que acostumbra pasar el hilo dental . Aplicación de respuesta al cuestionario	Cuantitativa Ordinal	Número de veces que utiliza el hilo dental x día
Tabaquismo	Intoxicación crónica debido a la ingesta por tabaco a través de cigarros o puros de manera voluntaria	Aplicación de respuesta a cuestionario	Cualitativa Nominal Dicotómica	1) Si 0) No
Frecuencia de Tabaquismo	Número de cigarrillos fumados por día	Aplicación de respuesta a cuestionario	Cuantitativa Ordinal Continua	Número de cigarrillos que consume al día.
Indice de Masa Corporal	Indice de peso de una persona en relación con su altura	Peso en Kilos entre talla en metros al cuadrado	Cuantitativa de Proporción	Kg/m ²

ANEXO 2

Carta de consentimiento informado

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUERRERO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD ACADEMICA DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
UNIDAD ACADEMICA FACULTAD DE MEDICINA ESPECIALIZACIÓN EN ENDOPERIODONTOLOGIA
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

FOLIO

--	--	--	--

México, D.F. a ___ de _____ del año 200__

El que suscribe: C. _____ de ___ años de edad, con

Domicilio en _____

Declaro bajo protesta de decir verdad, que autorizo a los médicos, odontólogos y químicos de la Clínica de Endoperiodontología de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala en la Cd. De México D.F. al Laboratorio de Biomedicina ubicado en la misma Facultad en Los Reyes Iztacala s/n. y a la Maestría en Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Guerrero cuyo representante es el C.D. David Antonio Avila Arizmendi; para brindar información necesaria y formar parte del Proyecto de Investigación: **Medición de esterasa leucocitaria e Interleucina 1 beta en fluido crevicular gingival como marcadores de enfermedad periodontal.**

Entiendo que la entrevista se llevara a cabo en los lugares antes mencionados en los horarios que se me indiquen o que así se convengan, durante la entrevista se realizara una historia clínica que se incluirá preguntas familiares, personales y de salud, además de mediciones y signos vitales (presión arterial y glucosa e Índice de masa corporal); se tomaran muestras así como estudios, se realizaran de forma gratuita con la finalidad de evaluar mi estado de salud. Así mismo; cada vez que se efectúen los estudios me proporcionaran los resultados de los análisis y estudios de gabinete realizados.

Estoy enterado (a) que la entrevista será breve no más de 30 minutos y que el entrevistador (a) se pondrá en contacto para obtener mas información posteriormente. Estoy de acuerdo en participar en este proyecto y enterado (a) de que las respuestas a mis preguntas y demás información no serán reveladas a nadie y será confidencial. Reconozco que he recibido información amplia y precisa, con un lenguaje claro y sencillo, por ello manifiesto que estoy satisfecho (a) con la información recibida y que comprendo el alcance de los riesgos del procedimiento y tratamiento.

Del mismo modo designo

a: _____

Parentesco: _____ para que mi nombre y representación reciba información sobre el estado de salud, diagnóstico, tratamiento y pronóstico; Así mismo autorice los procedimientos médicos de diagnóstico y/o terapéuticos, en el caso de que me encuentre con incapacidad física o mental.

Entiendo que el responsable de la investigación Dr. David A. Ávila Arizmendi, será la persona a quien debo buscar en los lugares arriba mencionados, o en el teléfono celular: 7441-23-92-22 o en el correo electrónico: davilariz@yahoo.com.mx, en caso de que tenga alguna pregunta acerca del estudio.

Firmo este consentimiento por mi libre voluntad, en presencia de un testigo y sin haber estado sujeto (a) a ningún tipo de presión o coerción para hacerlo. Con el derecho a revocar en cualquier momento este consentimiento con el entendimiento del alcance y consecuencias que pueden generarse.

Acepto

Nombre y firma del paciente

Testigo

Nombre y firma del testigo

Entrevistador

Nombre y firma del entrevistador (a)

ANEXO 3

Reporte de resultados

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

U ACADEMICA DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
UNIDAD ACADEMICA FACULTAD DE MEDICINA ESPECIALIZACIÓN EN ENDOPERIODONTOLOGIA

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

REPORTE DE RESULTADOS

Folio: _____ Nombre: _____
Expediente: _____

CLAVE: CASO A CONTROL B

MEDICIONES CLINICAS

SONDEO _____ mm
PERDIDA OSEA _____ mm
INDICE PDB _____ %

PARÁMETROS QUÍMICOS

EL SC _____ Nivel
EL C _____ leucocitos / μ l
IL-1 β _____ ng/ml

FACTORES DEMOGRÁFICOS

EDAD _____ Años
SEXO _____

FACTORES PATOLÓGICOS

DIABETES _____ 1 (SI), 2 (NO)
ANTECEDENTES HF _____ 1 (SI), 2 (NO) Quién: _____
HIPERTENSIÓN ART _____ 1 (SI), 2 (NO)
ANTECEDENTES HF _____ 1 (SI), 2 (NO) Quién: _____
MEDICAMENTOS _____ 1 (Antihipertensivos), 2(Hipoglucemiantes), 3(Anticonceptivos orales),
4(Analgésicos, antiinflamatorios; 5(Antibióticos) 6 (Otros)

FACTORES HIGIENICO DIETÉTICOS

FRECUENCIA DE CEPILLADO _____ No. De veces x día
FRECUENCIA DE HILO DENTAL _____ No. De veces x día
TABAQUISMO _____ 1 (SI) 2 (NO)
FRECUENCIA TABAQUISMO _____ No. De cigarrillos x día
IMC _____ kg/m²

OTRAS OBSERVACIONES

ELABORO: C.D.. DAVID A. AVILA ARIZMENDI

ANEXO 4

**Historia clínica de endoperiodontología
FES Iztacala UNAM**

ANEXO 5

Instructivo y colorímetro de Tiras reactivas MULTISTIX-10SG

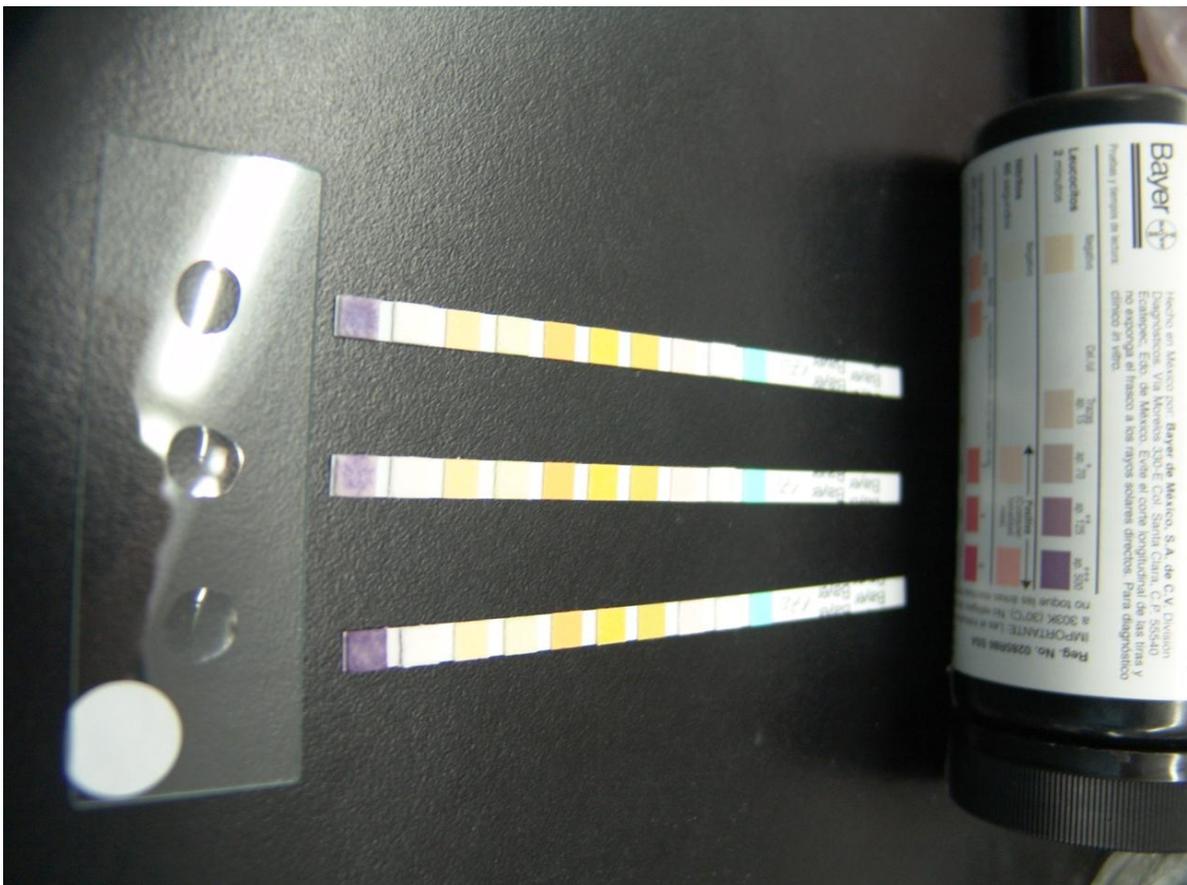
Esterasa Leucocitaria e Interleucina 1 beta en el diagnóstico de periodontitis

Bayer  Hecho en México por: Bayer de México, S.A. de C.V. Diagnósticos. Vía Morelos 330-E Col. Santa Clara, C. Ecatepec, Edo. de México. Evite el corte longitudinal no exponga el frasco a los rayos solares directos. Para clínico *in vitro*.

Pruebas y tiempos de lectura:

	Negativo	Cel./ul	Trazas ap. 15	ap. 70	ap. 125	ap. 500
Leucocitos 2 minutos						

Guía de color de tiras reactivas Multistix 10 SG.



Reacción colorimétrica.

ANEXO 6

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

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/ μ 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/ μ l

Tubo	Concentración final	Sol. fisiológica	Susp madre de 2000 leucocitos/ μ l
1	0 / μ l	200 μ l	0
2	100 / μ l	190 μ l	10 μ l
3	200 / μ l	180 / μ l	20 μ l
4	400 / μ l	160 / μ l	40 μ l
5	800 / μ l	120 / μ l	80 μ l
6	1600 / μ l	40 / μ l	160 μ l
7	2000 / μ l	0	200 μ l

Posteriormente se numeraron los tubos a diferentes concentraciones.

Concentraciones leucocitarias para medir la actividad de p-NFA

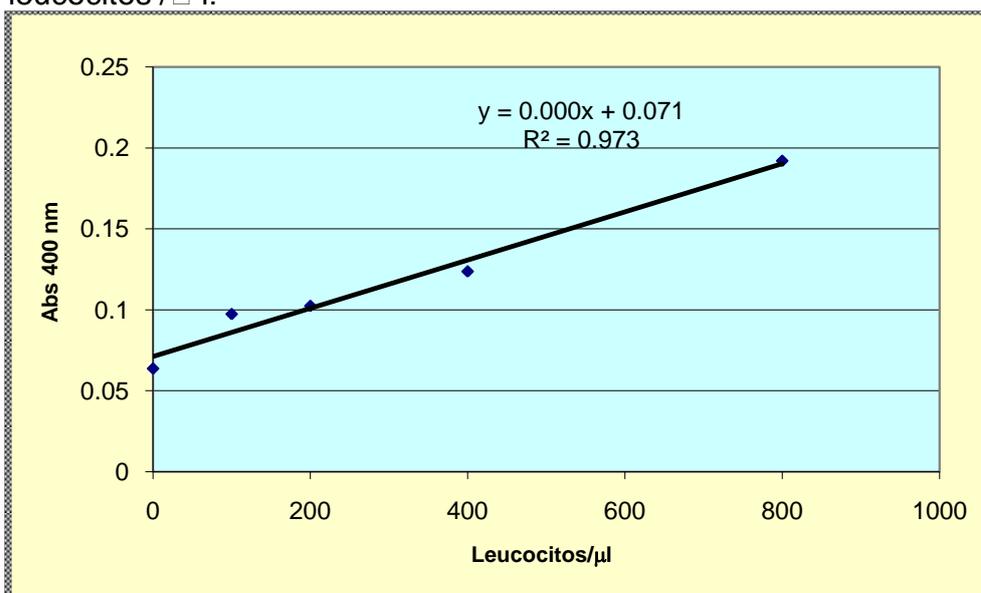
Tubos Concen t.	Blanco (1)	2	3	4	5	6	7
0 / μ l	20	-	-	-	-	-	-
100 / μ l	-	20	-	-	-	-	-
200 / μ l	-	-	20	-	-	-	-
400 / μ l	-	-	-	20	-	-	-
800 / μ l	-	-	-	-	20	-	-
1600 / μ l	-	-	-	-	-	20	-
2000 / μ l	-	-	-	-	-	-	20
p-NFA 1mM	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

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 / μ l.

Absorbancias resultantes en diluciones de 2000 leucocitos/μl

		Absorbancias a 400 nm					
2000 Leucos/□ l	0□ □ l	100/□ □ l	200/□ □ l	400□ □ □ l	800□ □ □ l	1600/□ □ l	2000/□ □ 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

De éstos resultados se obtiene un factor de absorbancia vs. número de leucocitos /□ l.



Factor de absorbancia de número de leucocitos/μl a los 15 min

$Y = 0.001x + 0.0711$

Y=abs

X= Concent.

$X = \frac{y - 0.0711}{0.0001}$

$R^2 = .9739$

Ecuación resultante para obtener el factor de absorbancia., que se aplica a cada una de las absorbancias obtenidas.

Esterasa Leucocitaria e Interleucina 1 beta en el diagnóstico de periodontitis



Desarrollo de color en diluciones de 2000 a 100 leucocitos/ μ l en 15 minutos.

ANEXO 7

Técnica de ELISA para Interleucina 1 Beta

Técnica de ELISA de IL-1 beta (Peprotech).

Descripción:

Este kit sirve para cuantificar IL-1 β natural o recombinante en un sándwich de ELISA en un rango de 16 a 3000 pg/ml. Suficiente para 1000 placas de ELISA.

ALMACENAMIENTO Y RECONSTITUCIÓN:

Anticuerpo de captura:

100 μ g de antígeno afín purificado de cabra anti hIL-1Beta. Reconstituir en 1 ml de agua estéril para una concentración de 100 μ g/ml. Hacer 10 alícuotas de 100 μ l.

Anticuerpo de detección:

100 μ g de antígeno biotinilado purificado de cabra anti hIL-1 β Reconstituir en 1 ml de agua estéril para una concentración de 100 μ g/ml. Hacer 10 alícuotas de 100 μ l

Standard IL-1 β humana: 1 μ g de hIL-1 B recombinante. Reconstituir en 1 ml de agua estéril para una concentración de 1 μ g/ml . Hacer 10 alícuotas de 100 μ l

Nota: Las soluciones reconstituidas del anticuerpo de captura y de detección deben ser guardados a 4-8 $^{\circ}$ C por mas de 2 meses o alícuotados y guardados en congelación a -20 $^{\circ}$ C por 6 meses. Los de la curva standard deben ser guardados a 4-8 $^{\circ}$ C por 1 semana o alícuotados y guardados en congelación a -20 $^{\circ}$ C por 2 meses.

Conjugado de Avidin Peroxidasa: Es un vial de 60 μ l. Debe ser alícuotado en 10 viales de 6 μ l y congelado a -20 $^{\circ}$ C.

MATERIALES RECOMENDADOS:

Placas de ELISA (NUNC Maxisorp pord - 442404);
Tween -20 (Sigma cat - P-7949);
BSA (Sigma Cat -P-7949);
ABTS Solución de sustrato líquido (SIGMA Cat -A3219)
Dulbecco's PBS (10x) (Gibco BRL Cat -14200-075).

SOLUCIONES RECOMENDADAS:

Todas las soluciones deben ser a temperatura ambiente previas a su uso.

PBS : Dilución 10 x PBS a 1 x PBS en agua estéril.

50 ml de PBS en 450 ml de agua estéril

Buffer de lavado : 0.05 % Tween-20 en PBS.

0.05 ml Tween 20 (Solutio) en 99.5 ml de PBS

Buffer de bloqueo 1% BSA en PBS*

0.5 g de BSA en 50 ml PBS

- Filtrado estéril y almacenado a 4 $^{\circ}$ C por arriba de 1 semana.

Diluyente: 0.05% Tween-20, 0.01% BSA en PBS.

0.05 g de BSA + 50 ml (Buffer de lavado))

PREPARACION DE LA PLACA:

- 1) Diluya el anticuerpo de captura con PBS a una concentración de 1 µg/ml. Inmediatamente añada 100 µl. A cada placa de ELISA. Selle la placa e incube toda la noche a temperatura ambiente.
- 2) Aspire la placa y remueva el líquido y lave la placa 4 veces usando 300 µl de Buffer de lavado por placa. Después de el último lavado invierta la placa y remueva el buffer residual y coloque en toalla de papel.
- 3) Añada 300 µl de Buffer de bloqueo a cada placa . Incube por al menos 1 hora a temperatura ambiente.
- 4) Aspire y lave la placa 4 veces.

PROTOCOLO DE ELISA:

Standard/Muestra:

Diluya el standard de 3 ng/ml a 0 en diluyente. Inmediatamente añada 100 µl de standard o de muestra a cada placa en triplicado. Incube a temperatura ambiente por lo menos 2 horas.

Para la colocación en los pozos y facilitar el procedimiento, se hizo una dilución de 15 µl + 235µl de diluyente para hacer una solución total de 250 ml y colocarse 100 µl en los pozos 1 de la posición A y B. Posteriormente se colocan 100 µl de diluyente en todos los 11 pozos restantes . Quedando entonces distribuidos las diluciones de IL-1β de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<u>A</u>	0	3	1.5	0.75	.375	.187	.074	.047	.023	.012	.006
<u>B</u>	0	3	1.5	0.75	.375	.187	.074	.047	.023	.012	.006

Para las muestras se colocan 100 µl en los pozos restantes por duplicado.

Detección: Aspire y lave la placa 4 veces. Diluya el anticuerpo de detección en diluyente a una concentración de 1 µg/ml. Añada 100 µl por pozo. Incube a temperatura ambiente por 2 horas.

Para obtener el llenado de 120 pozos se obtuvo una dilución de 122 µl/ 12.2 ml.

Avidin –Peroxidasa.

Aspire y lave la placa 4 veces. Diluya 1 alicuota de 6 µl de Avidin peroxidasa 1 : 2000 en el diluyente para un volumen total de 12 ml. Para obtener el llenado de 120 pozos se obtuvo una dilución de 8 µl/14 ml. Añada 100 µl por pozo. Incube de 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente. Cúbrase con papel aluminio, protéjase de la luz.

Sustrato Líquido ABTS:

Debe estar a temperatura ambiente previo a su uso. Aspire y lave la placa 4 veces.

Esterasa Leucocitaria e Interleucina 1 beta en el diagnóstico de periodontitis

Se diluyen 100 µl de Peróxido de Hidrógeno al 3%. (450µl de agua + 50 µl de H₂O₂) en 15 ml de ABTS .

Añada 100 µl de la solución del sustrato a cada pozo. Incube a temperatura ambiente para el desarrollo del color. El color del monitor se lee a 405 nm en espectrofotómetro de ELISA marca Multiskan AFCENT VI.24 de Termo Labssystem con el software ELISAKIT V.1.3.1

Nota: Las lecturas D.O. no excederán las 0.2 unidades para las concentraciones de standard cero, o 1.2 unidades para las concentraciones mas altas.. La placa debe ser monitoreada a intervalos de 5-10 minutos

Absorbancias resultantes de Standards de Muestra de IL-1β en diluciones a partir de 3ng/ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.54 4	1.34 4	1052	0.86 4	0.81 9	0.51 2	0.37 5	0.27 9	0.20 3	0.18 8	0.18 3	0.14 3
B	1.45 3	1.21	1.02 1	0.98 7	0.92 6	0.66 6	0.40 3	0.25 8	0.21 6	0.17 4	0.16 7	0.14