

Receptor tipo toll 2 en fluido crevicular de pacientes con periodontitis crónica.

Morón-Medina Alejandra^{1*}, Viera Ninoska², Morales-Rojas Thais³, Chaparro Neira⁴, Fox Mariela⁵

1 Magister Scientiarum en Biología. Mención: Inmunología Básica. Instituto de Investigaciones. Facultad de odontología. Universidad del Zulia.

2 Doctora en Ciencias. Mención: Inmunología. Instituto de Investigaciones. Facultad de odontología. Universidad del Zulia.

3 Doctora en Odontología. Instituto de Investigaciones. Facultad de odontología. Universidad del Zulia.

4 Doctora en Odontología. Instituto de Investigaciones. Facultad de odontología. Universidad del Zulia.

5 Magister Scientiarum en administración del sector salud. Mención: Epidemiología. Instituto de Investigaciones. Facultad de Odontología. Universidad del Zulia

Correos electrónicos: alejandraisamm@gmail.com, ninoskaviera@gmail.com, thaismorales123@gmail.com, neirach@yahoo.com, mariela.fox@gmail.com

RESUMEN

Objetivo: Correlacionar los niveles del receptor tipo Toll 2 en fluido crevicular de pacientes con periodontitis crónica con los hallazgos clínicos de la enfermedad periodontal. **Materiales y métodos:** Se llevó a cabo un estudio correlacional. La muestra fue de 10 pacientes con periodontitis crónica (PC) y 10 sujetos sanos, a los cuales se les determinaron parámetros clínicos como índice gingival (IG), índice de placa (IP), nivel de inserción (NI) profundidad al sondaje (PS) y evaluación radiográfica. Se tomaron muestras de fluido crevicular gingival para la determinación del receptor tipo Toll 2 (TLR2) a través del ensayo inmunoenzimático indirecto. **Resultados:** Se observaron diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,001$) al comparar los parámetros clínicos de ambos grupos. En relación a los niveles de TLR2, éstos se encontraron ligeramente elevados en los pacientes con PC al compararlos con los sujetos sanos, sin observar diferencias estadísticamente significativas. Al correlacionar los parámetros clínicos con los niveles TLR2 en pacientes con PC, solo se observó correlación positiva entre el IG y TLR2. **Conclusión:** El TLR2 podría desempeñar un rol importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal, debido a su capacidad de activar mediadores inflamatorios que conducen a la cronicidad de los signos que caracterizan a esta entidad.

Palabras clave: periodontitis crónica, receptor tipo toll 2, fluido crevicular gingival.

Autor de Correspondencia: Dirección: Calle 65 equina con Av.19. Edificio Ciencia y Salud. 3er piso. Maracaibo. Zulia. Venezuela. Código postal 400 Teléfono 58-0261-7597346. Fax 58-0261-7597347

Toll-Like Receptor 2 in crevicular fluid of patients with chronic periodontitis.

ABSTRACT

Objective: To correlate Toll 2 receptor levels in crevicular fluid of patients with chronic periodontitis with the clinical findings of periodontal disease. **Materials and Methods:** A correlational study was carried out. The study population consisted of 10 patients with chronic periodontitis and 10 healthy subjects, which were determine the gingival index (GI), plaque index (PI), gingival recession (REC), periodontal probing depth (PPD) and study radiographic. Gingival crevicular fluid samples were taken for the determination of TLR2 through the indirect immunoenzymatic assay (ELISA). **Results:** There were statistically significant differences ($p < 0.001$) when comparing the clinical parameters of both groups. In relation to the levels of TLR2, these were found slightly elevated in patients with chronic periodontitis when compared to healthy subjects, without observing statistically significant differences. When correlating the clinical parameters GI, IP, REC and PPD with TLR2 levels in crevicular fluid in patients with chronic periodontitis, only a positive correlation was observed between the gingival index and TLR2. **Conclusion:** TLR2 may play an important role in the pathogenesis of periodontal disease, due to its ability to activate inflammatory mediators leading to the chronicity of the signs that characterize this entity.

Keywords: chronic periodontitis, Toll-Like Receptor 2, gingival crevicular fluid.

INTRODUCCIÓN

Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de proteínas transmembrana con un dominio extracelular caracterizado por repeticiones ricas en leucina y un dominio intracelular, cuya función es el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)¹.

Moléculas de este tipo, presentes en microorganismos como el *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* importantes en la enfermedad periodontal, pueden desencadenar una respuesta inmunitaria por los receptores tipo Toll², especialmente por TLR2 y/o TLR4. Se ha descrito que el TLR2 interactúa con peptidoglicanos de las bacterias gram (+), así como también con los lipopolisacáridos de bacterias gram (-) como la *P. gingivalis*³.

Las células epiteliales gingivales estimuladas por *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum* o sus productos, responden activando la vía de señalización mediada por TLR2 y TLR4 promoviendo la secreción de citocinas³, estas a su vez estimulan la expresión de moléculas de adhesión,

incrementan la permeabilidad de los capilares gingivales y la quimiotaxis de los polimorfonucleares neutrófilos a través del epitelio de unión y dentro del surco gingival.

En el surco periodontal la mucosa gingival está en contacto permanente con el fluido crevicular⁴, el cual posee componentes del suero y de otros productos derivados de la descomposición de los tejidos como mediadores inflamatorios y anticuerpos, generados localmente en respuesta a los microorganismos orales presentes en el biofilm dental, por lo cual ofrece un gran potencial para reflejar la respuesta generada por las células y tejidos periodontales⁵.

El rol del TLR2 en la patogénesis de la periodontitis crónica aún no está totalmente dilucidado, razón por la cual, la presente investigación tiene por objetivo correlacionar los niveles del receptor tipo Toll 2 en fluido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica con los hallazgos clínicos de la enfermedad periodontal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

La población de estudio estuvo conformada

Ciencia Odontológica

Vol. 15 N° 1 (Enero-Julio 2018), pp. 28-29

por pacientes que acudieron al Servicio de Periodoncia del Hospital Universitario de Maracaibo (HUM), en edades comprendidas entre los 20 a 60 años. La muestra quedó conformada por 20 individuos, la cual fue dividida en un grupo experimental conformado por 10 pacientes con periodontitis crónica y un grupo control constituido por 10 sujetos periodontalmente sanos.

Como criterios de inclusión para el grupo experimental se consideraron los siguientes: Pacientes con periodontitis crónica según los criterios de la Academia Americana de Periodontología: localizada o generalizada⁶.

Como criterio de inclusión para el grupo control se consideraron: Sujetos sistémica y periodontalmente sanos.

Y como criterios de exclusión se consideraron: sujetos con formas agresivas de enfermedad periodontal o alguna otra lesión en mucosa bucal, diabéticos, embarazo, VIH, desordenes óseos, necesidades de profilaxis antibiótica previa, hábitos de cigarrillo y alcoholismo, pacientes que toman drogas que afectan el metabolismo, esteroides, anticonceptivos, antiinflamatorios y aquellos que recibieron tratamiento periodontal en los últimos 6 meses. Piezas con destrucción coronaria, caries o restauraciones que involucren más de 1/3 de la corona. En caso de ausencia de la pieza dentaria índice o de estar entre los criterios de exclusión, se tomó la pieza del mismo grupo más próxima.

Esta investigación contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia. Una vez seleccionado los pacientes, todos firmaron el consentimiento Informado, explicando a cada uno de ellos el propósito del estudio.

Evaluación clínica y radiográfica

La evaluación clínica la realizó un periodoncista, debidamente entrenado en la detección de signos y síntomas de periodontitis (Coeficiente de kappa intraexaminador = 0.86). Todas las

evaluaciones, se llevaron a cabo después de la higiene oral. Se realizó el índice gingival (IG) de Loe & Silness⁷ y el índice de placa (IP) de Silness & Loe⁸. El estado de los tejidos de soporte dentario se evaluó a través de la profundidad del surco gingival y el nivel de inserción, estos fueron medidos en seis puntos (mesial, medio y distal por vestibular y palatino-lingual) en cada uno de los dientes seleccionados. Para la determinación de la profundidad del surco se midió la distancia desde el margen gingival hasta la localización de la punta de la sonda periodontal, mientras que, para evaluar el nivel de inserción se tomó en cuenta la distancia desde la base de la bolsa hasta línea amelocementaria, por último el nivel óseo fue determinado a través de radiografías panorámicas y periapicales observando la distancia entre la cresta alveolar y la unión cemento - esmalte de los dientes adyacentes.

Recolección de muestra de fluido crevicular gingival

La recolección de la muestra del fluido crevicular se realizó antes de la evaluación clínica, los pacientes no debían haber ingerido alimentos una hora antes de la evaluación. Para el examen se realizó aislamiento relativo del sector con rollos de algodón, se removió con sumo cuidado la placa dental presente con rollos de algodón tratando de no tocar la encía y se secó la zona con aire por 15 segundos. Se emplearon puntas de papel absorbentes las cuales se introdujeron en la entrada del surco gingival sin ejercer presión alguna durante 30 segundos en 3 sitios de la cara vestibular de los dientes que presentaron mayor grado de severidad, en el caso de los sujetos sanos se tomaron las muestras en los incisivos centrales superiores e inferiores: mesial, medio y distal. Luego las puntas de papel se colocaron en un tubo estéril con solución Buffer (10 mM de NaH₂PO₄ y NaCl 150 mM, a pH 7,2)⁹. Aquellas puntas de papel visiblemente contaminadas por sangrado fueron descartadas y se realizó la toma de otra muestra. La muestra se centrifugó a 300g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo estéril y se almacenó a -70 °C hasta ser procesados.

Determinación del TLR2

El TLR2 fue determinado a través del ensayo inmuno-enzimático Sandwich (ELISA), para lo cual se utilizó el kit comercial MyBioSource N° MBS733038. Este permitió determinar cuantitativamente los niveles de TLR-2 presentes en las muestras de fluido crevicular. La reacción colorimétrica se cuantificó en un lector de microplacas (Titertek Multiskan® PLUS).

Análisis Estadístico

La comparación de los resultados obtenidos se realizó utilizando el programa GraphPad InStat versión 3.05 y Graph Pad prisma 5 para la representación gráfica de los datos. Al hacer análisis de las muestras en los dos grupos de estudio se utilizó t test utilizando como post-test la prueba de Bonferroni y para los estudios de correlación se utilizó la prueba de Correlación de Spearman. Con un límite de significancia $p < 0,05$. Los resultados se expresaron media \pm error estándar.

RESULTADOS

Del total de los 20 sujetos evaluados la muestra quedo distribuida de la siguiente manera: el grupo de pacientes con periodontitis crónica estuvo constituido

por 7 pacientes femeninos y 3 masculinos, entre 23–60 años de edad con una media de $45,8 \pm 11,31$. En relación al grupo de los sujetos sanos estuvo conformado por 8 sujetos femeninos y 2 masculinos, entre los 22-33 años de edad con una media de $29,9 \pm 6,28$.

Al analizar el índice gingival (IG) y el índice de placa (IP) obtenido entre los pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos, se observó un valor de $1,047 \pm 0,03$ y $1,16 \pm 0,07$ para el grupo experimental y $0,21 \pm 0,09$ y $0,063 \pm 0,04$ para los sujetos sanos respectivamente, obteniendo en ambos casos diferencias estadísticamente con un valor de $p < 0,001$. (Figura N° 1).

En la figura N° 2 se observa la profundidad al sondaje (PS) y el nivel de inserción (NI) en los pacientes con periodontitis crónica y en los sujetos sanos, evidenciándose $5,019 \pm 0,13$ y $4,60 \pm 0,30$ para el grupo experimental y $0,37 \pm 0,37$ y $0,72 \pm 0,72$ para el grupo control respectivamente, observándose diferencias estadísticamente significativa con un valor de $p < 0,001$.

Al estudio radiográfico se evidencio que la totalidad de los pacientes con periodontitis crónica presentaron pérdida ósea horizontal generalizada,

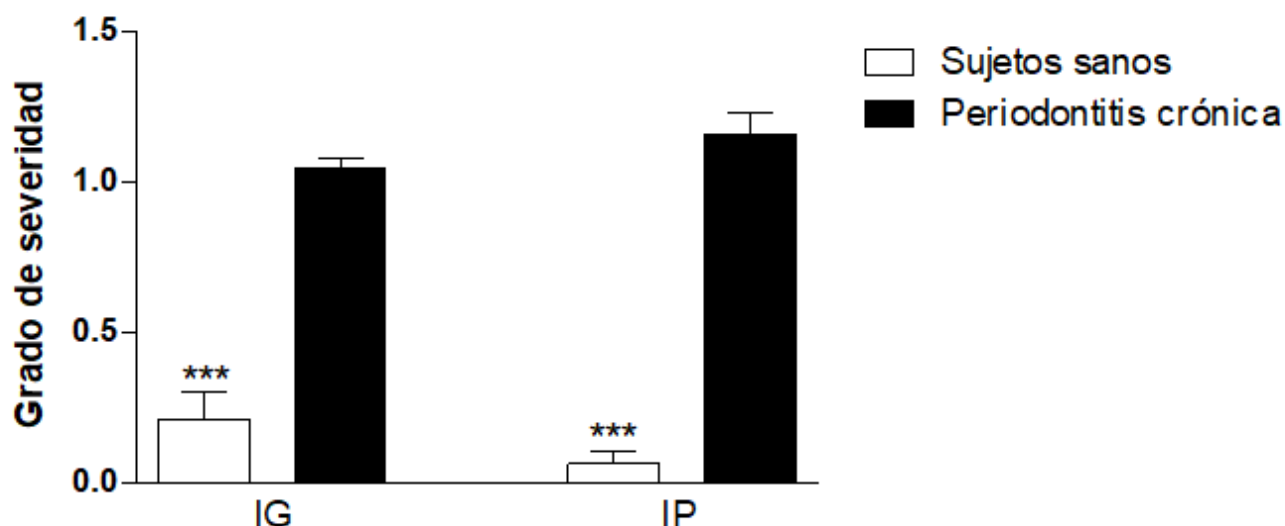


Figura 1. Índice Gingival y Placa de sujetos sanos y pacientes con periodontitis crónica. *** $p < 0,001$.

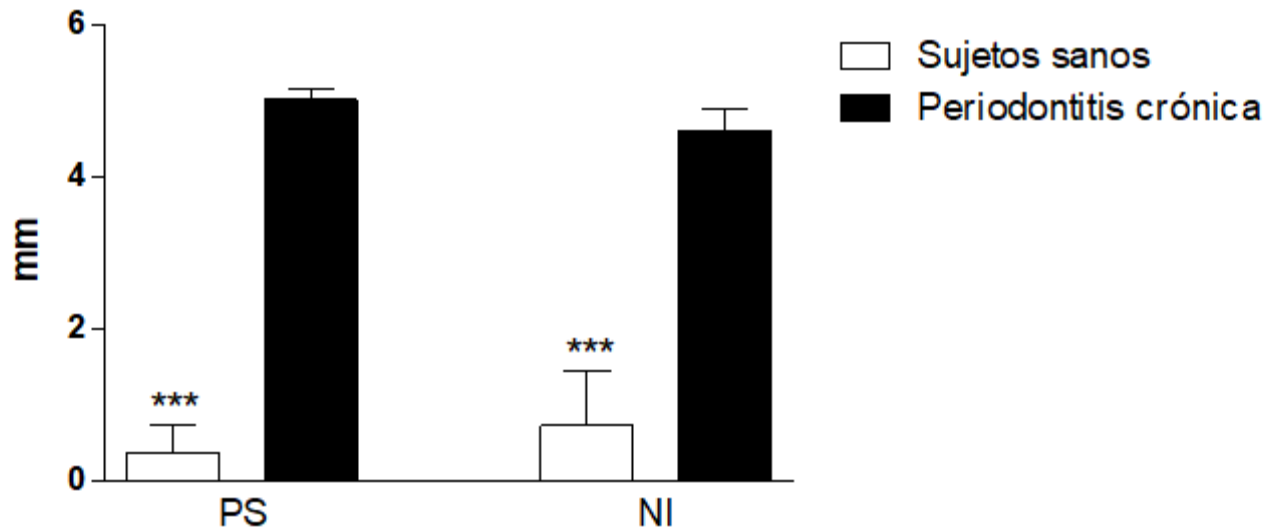


Figura 2. Profundidad del surco y Nivel de inserción de sujetos sanos y pacientes con periodontitis crónica. ***p<0.001.

observándose además disminución del trabeculado óseo, pérdida de la lámina dura y remanente óseo menor del 50 %, hallazgos compatibles con esta entidad.

Con respecto al TLR2 en muestras de fluido crevicular, se pudo observar un ligero aumento en los niveles de este receptor en el grupo de pacientes con

periodontitis crónica, comparados con los del grupo de sujetos sanos, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Evidenciándose, 0,57 ng/ml ± 0,06 para pacientes con periodontitis crónica y 0,48 ng/ml ± 0,05 para los sujetos sanos. (Figura N° 3).

Al correlacionar los parámetros clínicos IG, IP,

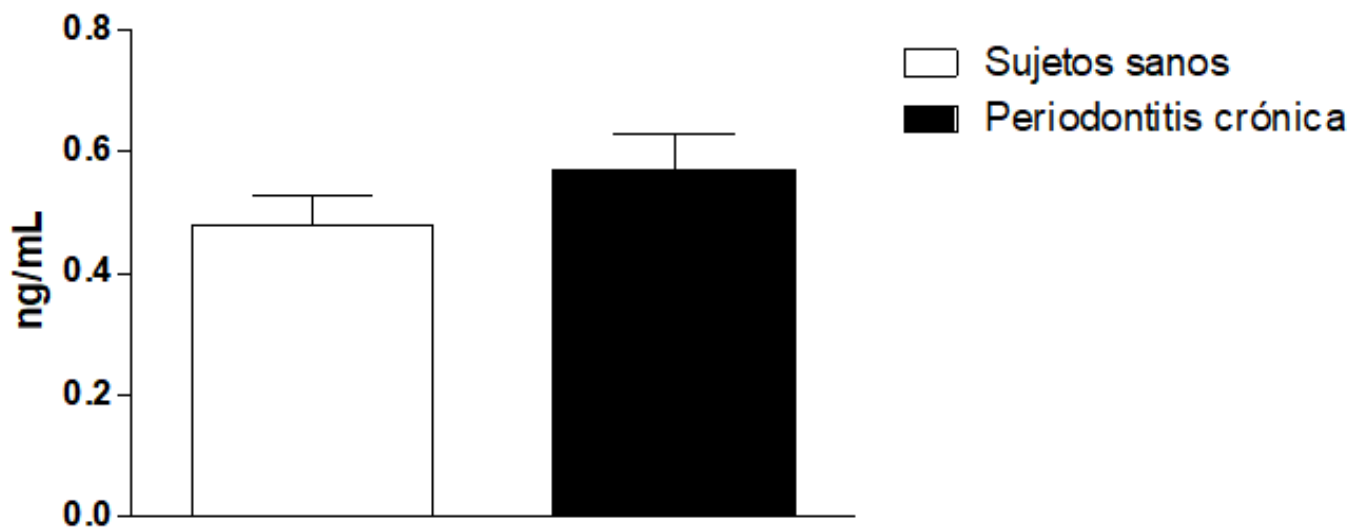


Figura 3. Niveles de TLR2 en muestras de fluido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos.

NI y PS con los niveles de TLR2 en fluido crevicular en pacientes con periodontitis crónica, solo se observó correlación positiva entre el índice gingival y TLR2 con un valor de $r^s= 0.7237$ y de $p =0.0234$ (Tabla N° 1).

DISCUSIÓN

Tabla 1. Correlación entre niveles de TLR-2 y parámetros clínicos periodontales.

Parámetros clínicos	TLR-2	
	Valor de r^s	Valor de p
IG	0.7237	0.0234*
IP	0.3823	0.2788
NI	0.09756	0.7850
PS	-0.3659	0.2957

* $p < 0.05$

Fuente: Moron, Viera, Morales, Chaparro, Fox

La patogénesis de la enfermedad periodontal es principalmente el resultado de la respuesta del huésped a la destrucción de tejido inducida por microorganismos, esta lesión o injuria producida a los tejidos, iniciará los procesos inmunológicos e inflamatorios del huésped. El sistema inmunitario innato es activado por la participación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los TLRs, los cuales son moléculas esenciales para la respuesta celular a los componentes de la pared celular bacteriana. Estas estructuras microbianas se refieren a PAMPs e incluyen lipopolisacáridos bacterianos, lipoproteínas, peptidoglicanos, ADN bacteriano y ARN de doble cadena, los cuales pueden ser reconocidos por el TLR y dar inicio a la respuesta inflamatoria. El TLR2 al unirse específicamente a uno de sus ligandos como el lipopolisacárido bacteriano podría desempeñar un papel potencial en el progreso de la periodontitis crónica^{10,11}.

La periodontitis se caracteriza por presentar clínicamente pérdida de inserción y de hueso alveolar, formación de bolsas periodontales e inflamación gingival^{6,12}. Los pacientes pertenecientes al grupo experimental mostraron características ampliamente

reportadas en periodontitis crónica Gupta y col¹³, Ruiz y col¹⁴, Ebersole y col¹⁵, y Rathnayake y col¹⁶., observándose valores elevados en todos los índices realizados (IG, IP, NI, PS y pérdida ósea) al compararlos con el grupo control, obteniendo como resultado, diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio.

Los resultados del presente estudio mostraron expresión del TLR2 tanto en los pacientes con periodontitis crónica como en los sujetos sanos, sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativas. Estos hallazgos son consistentes con los observados previamente por Buduneli y col¹⁷., quienes mostraron niveles similares de TLR2 en pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos, aunque estos receptores fueron determinados en diferentes fluidos biológicos a los utilizados en el presente estudio. Por otra parte, la escasa diferencia observada entre los niveles de TLR2, podría estar en relación con las variaciones descritas previamente entre los diferentes tipos de enfermedad periodontal¹¹, habiéndose reportado mayor expresión de este receptor en gingivitis que en periodontitis. A pesar de no haber observado una diferencia estadísticamente significativa en esta investigación, el hallazgo de evidenciar mayores niveles de TLR2 en pacientes con periodontitis crónica en comparación a los sujetos sanos, sugiere una posible participación de éste en la producción de mediadores inflamatorios relacionados con la enfermedad periodontal.

En este estudio, los sujetos sanos fueron significativamente más jóvenes que el grupo con periodontitis crónica, sin embargo, este hecho, de manera similar a lo encontrado por Buduneli N y col.¹⁷ pudiera no haber tenido un gran impacto en nuestros resultados, ya que se ha descrito anteriormente una expresión similar de niveles de TLR2 y 4 en linfocitos, monocitos y granulocitos en tejido donado de pacientes jóvenes.

En los pacientes pertenecientes al grupo experimental se pudo observar niveles de IG, IP, PS y NI compatibles con periodontitis crónica, sin embargo,

los resultados obtenidos en este estudio al correlacionar los parámetros clínicos (IG, IP, NI, PS) con los niveles de TLR2 en fluido crevicular, mostraron únicamente una correlación positiva entre el IG y TLR2. No ha sido posible encontrar literatura científica que haya correlacionado estos parámetros en este fluido, sin embargo, se ha evidenciado una correlación negativa entre la habilidad de estimulación de TLR2 de placa subgingival y los niveles de este receptor¹⁸; habiéndose reportado además que la expresión del gen de TLR2 y/o la proteína puede estar sobre expresada, no afectada o disminuida en enfermedad periodontal¹⁹. Diversos estudios han reportado que las variaciones observadas en las muestras biológicas en las cuales se determinó el receptor y la variación de la actividad de la enfermedad periodontal, pueden dar lugar a una

amplia gama de niveles de TLR^{17,19}.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se podría concluir que el TLR2 es capaz de desempeñar un rol importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal, debido a la capacidad que posee de activar mediadores de inflamación que conducen a la cronicidad de los signos que caracterizan a esta entidad y a la pérdida de los tejidos de soporte. Sin embargo, estudios futuros deberían ser llevados a cabo con un mayor número de sujetos con diagnóstico de periodontitis crónica y diversos grados de severidad en muestras de fluido crevicular gingival, que permitan determinar si la expresión de TLR2 está en relación con el grado de inflamación y por ende con la progresión de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Abe D, Kubota T, Morozumi T, Yoshie H. Upregulated genes in toll-like receptor (TLR) signaling pathway in periodontitis-affected gingival tissues. *OJST* 2014; 4: 22-28.
2. Park SR, Kim DJ, Han SH, Kang MJ, Lee JY, Jeong YJ, et al. Diverse Toll-like receptors mediate cytokine production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in macrophages. *Infect Immun* 2014 May;82(5):1914-1920.
3. Swaminathan V, Prakasam S, Puri V, Srinivasan M. Role of salivary epithelial toll-like receptors 2 and 4 in modulating innate immune responses in chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2013 Dec; 48(6):757-765.
4. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci* 2015 May-Jun;23(3):329-355).
5. Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol* 2000 2016 Feb;70(1):53-64.
6. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology- an update. *J Can Dent Assoc* 2000; 66(11): 594-597.
7. Loe H, Silness J. Periodontal Disease in pregnancy. *Act Odont Scand* 1963. 21:533-551.
8. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol Scand* 1964. 22:121-128.
9. Leishman SJ, Seymour GJ, Ford PJ. Local and Systemic Inflammatory Responses to Experimentally Induced Gingivitis. *Disease Markers* 2013; 35 (5): 543-549.
10. Sun Y, Guo QM, Liu DL, Zhang MZ, Shu R. In vivo expression of Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, CSF2 and LY64 in Chinese chronic periodontitis patients. *Oral Dis* 2010; 16(4):343-350.
11. Ilango P, Mahalingam A, Parthasarathy H, Katamreddy V, Subbareddy V. Evaluation of TLR2 and 4 in Chronic Periodontitis. *J Clin Diagn Res* 2016 Jun; 10(6):ZC86- ZC89.
12. Shanbhag S, Dahiya M, Croucher R. The impact of periodontal therapy on oral health-related quality of life in adults: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2012; 39:725-735.
13. Gupta N, Gupta ND, Gupta A, Khan S, Bansal N. Role of salivary matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in

chronic periodontitis diagnosis. *Front. Med* 2015; 9(1):72-76.

14. Ruiz A, Herrera M, Zamora A, Melendez J, Martínez V. Determinación de los niveles de IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva. *Rev Mex Periodontol* 2014; V (2):46-50.

15. Ebersole J, Schuster J, Stevens J, Dawson D, Kryscio R, Lin Y, et al. Patterns of Salivary Analytes Provide Diagnostic Capacity for Distinguishing Chronic Adult Periodontitis from Health. *J Clin Immunol* 2013; 33:271-279.

16. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary biomarkers of oral health – a cross-sectional study. *J Clin Periodontol* 2013 Feb;40(2):140-147.

17. Buduneli N, Özçaka Ö, Nalbantsoy A. Salivary and plasma levels of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2011 Jun; 82(6):878-884.

18. Ziauddin SM, Montenegro Raudales JL, Sato K, Yoshioka H, Ozaki Y, Kaneko T, et al. Analysis of Subgingival Plaque Ability to Stimulate Toll-Like Receptor 2 and 4. *J Periodontol* 2016 Sep; 87(9):1083-1091.

19. Mehlotra RK, Hall NB, Willie B, Stein CM, Weinberg A, Zimmerman PA, et al. Associations of Toll-Like Receptor and β -Defensin Polymorphisms with Measures of Periodontal Disease (PD) in HIV+ North American Adults: An Exploratory Study. *PLoS One* 2016 Oct;11(10):e0164075.