

Análisis proteómico de expresión de citocinas en líquido crevicular gingival de portadores de VIH/SIDA. Ensayo analítico[§]

Jesús Eduardo Elizondo Ochoa,* Ana Cecilia Treviño Flores, **
María del Refugio Rocha Pizaña,* Mario Moisés Alvarez*

Resumen

La proteómica del líquido crevicular gingival (LCG) puede ser utilizada para evaluar la progresión de la enfermedad periodontal y el estado general de sujetos con enfermedades sistémicas. **Objetivo:** El presente ensayo analiza si los niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , y TNF- α están alterados en los pacientes con VIH/SIDA y si el recuento linfocitario T CD4, la carga viral y la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), determinan alguna diferencia. **Material y métodos:** Se incluyeron 3 pacientes con VIH/SIDA, junto con 1 sujeto sano. Hubo aprobación por el Comité de Ética y se obtuvieron consentimientos informados. Se analizaron distintos parámetros sistémicos según la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) y bucales en acuerdo con la OMS (Organización Mundial de Salud) y el EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV en la versión actualizada por la Oral HIV/AIDS Research Alliance (OHARA). **Resultados:** Observamos diferencias significativas en la expresión del perfil de citocinas del LCG de portadores de VIH-1. **Conclusión:** Los pacientes con VIH/SIDA tienen un balance inflamatorio incrementado; de ese modo, aumenta la susceptibilidad de adquirir enfermedad periodontal y la posible alteración en la microflora bucal.

Palabras clave: Proteómica, líquido crevicular gingival, citocinas, biomarcadores, VIH/SIDA.

Abstract

Gingival crevicular fluid (GCF) proteomics technology can be used to assess periodontal disease progression and overall condition of patients with systemic diseases. **Purpose:** This paper examines whether the levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , and TNF- α , are altered in patients with HIV/AIDS and whether CD4 T lymphocyte count, viral load and antiretroviral therapy (HAART), determine a difference. **Materials and methods:** 3 patients with HIV/AIDS, along with a healthy subject. The study was approved by the Ethics Committee and informed consents were obtained. Various parameters were analyzed in accordance with CDC, WHO (World Health Organization) and the EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV in the updated version of the Oral HIV/AIDS Research Alliance (OHARA). **Results:** Significant differences were observed in the expression of the cytokine profile of gingival crevicular fluid in HIV-1 carriers. **Conclusion:** Patients with HIV/AIDS have an increased inflammatory balance, high susceptibility to acquire periodontal disease, and the possible alteration in the oral microflora.

Key words: Proteomics, gingival crevicular fluid, cytokines, biomarkers, HIV/AIDS.

[§] Primer lugar en el Concurso Nacional de Investigación 2011 de la Asociación Mexicana de Periodontología , Colegio de Periodoncistas A.C., dentro de la XXII Reunión Nacional, 21 Congreso Internacional de Periodontología.

* Master en Ciencias Odontológicas, Esp. Periodoncia Centro de Biotecnología FEMSA, Cátedra de Biofármacos e Ingeniería Biofarmacéutica. Tecnológico de Monterrey, RZMM.

** Directora del programa Médico Cirujano Odontólogo. Directora de Vinculación, Extensión e Investigación del Centro Académico de Atención Odontológica (CAAD). Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Tecnológico de Monterrey, RZMM.

INTRODUCCIÓN

El término proteómica fue acuñado por Marc Wilkins en 1994 para referirse al estudio de las proteínas, su funcionamiento, localización, expresión e interacciones.¹ La proteómica es una rama de la biología molecular cuyo objetivo es identificar las proteínas específicas que se asocian a las enfermedades considerando, entre otras cosas, su presencia, ausencia o su nivel de expresión en el organismo. El perfil biológico o proteoma nos da una idea de la distribución de los tres grandes grupos de proteínas que se encuentran en el cuerpo humano: glicoproteínas, lipoproteínas e inmunoglobulinas.

El conocimiento del proteoma humano y los cambios funcionales y alteraciones genómicas que éste puede sufrir pueden contribuir a la identificación y caracterización de biomarcadores para el desarrollo de nuevas e innovadoras herramientas de diagnóstico, por lo que hoy en día el análisis proteómico se asocia con innumerables posibilidades y aplicaciones en el área de la salud, incluyendo la odontología.

Un biomarcador es una sustancia, por lo general una proteína, que ha sido asociada con alguna función biológica normal del organismo, con alguna enfermedad o alteración específica (o con su respectiva severidad y/o progresión), o bien con una respuesta bioquímica a cierta terapia o intervención.²

Un biomarcador diagnóstico ideal es aquél que puede ser claramente identificado y relacionado con una enfermedad o condición, especialmente en pacientes que no presentan una sintomatología específica. Según Boja y Hiltke (2010), algunas de las características que debe tener un biomarcador son: (1) alta especificidad para determinada enfermedad o condición (mínimos falsos positivos), (2) alta sensibilidad (mínimos falsos negativos), (3) fácil de utilizar, (4) sujeto a estandarización y (5) validez y confiabilidad. Existen hoy en día enfermedades que pueden ser detectadas mediante la identificación de uno o varios biomarcadores que, en conjunto, han sido previamente caracterizados y pueden asociarse a dicha condición de manera confiable. Es posible además identificar biomarcadores que anticipan la predisposición o el riesgo de ciertas personas de padecer, desarrollar o sufrir una reincidencia de ciertas patologías y/o condiciones (por ejemplo, cáncer).^{3,4}

El descubrimiento de los conjuntos o paneles de proteínas que pueden ser utilizadas para fines de diagnóstico y tratamiento es un área de oportunidad de gran impacto y alcance en el área de las ciencias de la salud; sin embargo, es una realidad que es en la medicina en donde la proteómica se ha desarrollado con más profundidad, pues en la odontología es aún poco utilizada a pesar de su aplicación potencial en la detección, diagnóstico y predicción de ciertas enfer-

medades bucodentales, como la enfermedad periodontal. El proteoma de un organismo es muy dinámico y varía de acuerdo a cada tipo celular y a su respectivo estado funcional, lo cual se refleja en la composición de las proteínas que pueden ser identificadas en los fluidos corporales cuando existe un determinado estímulo externo o como respuesta o reacción a ciertos procesos asociados con ciertas enfermedades.⁵

Según el informe de ONUSIDA sobre la epidemia mundial de SIDA 2010 existen 33.3 millones de personas infectadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), lo que la convierte en una de las enfermedades de mayor incidencia a nivel mundial. Si bien esta enfermedad ha sido ampliamente investigada a nivel internacional, existen pocos estudios sobre las consecuencias de ésta en la cavidad bucal de los portadores de VIH. Resultados de algunos estudios han demostrado una alta prevalencia de lesiones bucales en individuos infectados por el VIH; además varios reportes indican que del 70 al 90% de los pacientes con VIH/SIDA muestran manifestaciones en cabeza y cuello en algún estadio de la enfermedad o seropositividad, y que esta proporción aumenta cada vez más a medida que la enfermedad evoluciona.⁷⁻⁹

Las citocinas, también llamadas citoquinas, son proteínas o glicoproteínas secretadas por las células inmunocompetentes, de bajo peso molecular (menos de 30 Kd) que a través de su interacción con receptores de superficie celular, regulan el desarrollo o la función de otra célula. Agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas.

Las citocinas juegan un rol fundamental en la regulación del mecanismo de la inflamación. Existen 2 grupos de citocinas: las proinflamatorias y las antiinflamatorias. Algunas citocinas, además, inducen la expresión de un mayor número de receptores por los cuales un gran número de partículas virales entran hacia las células.

En los pacientes infectados por el VIH las citocinas tienen una implicación dual, limitando y a la vez magnificando la infección. Citocinas como el interferón gamma (INF- γ) influyen en la inhibición del virus, mientras que citocinas como la interleucina I (IL-1) influyen en su multiplicación.¹⁰

Un subgrupo de citocinas proinflamatorias, llamadas quimioquinas, tienen propiedades quimiotácticas y orquestan la migración y función de los leucocitos. Se ha propuesto que cumplen un papel muy importante en la fisiopatología de algunas enfermedades como en la infección por el VIH y algunas reacciones autoinmunes. Distintas quimioquinas (RANTES, MIP-I alfa -MIP-1a- y MIP-I beta -MIP-1b-)

producidas por los linfocitos CD8 son capaces de inhibir la replicación *in vitro* de algunas cepas del VIH-1, mientras que RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (proteína inflamatoria de los macrófagos alfa y beta), se unen al receptor CCR5 y actúan promoviendo la entrada del virus hacia las células.¹¹ La interleucina 2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) estimulan la expresión del los genes del VIH dentro de los linfocitos T CD4 infectados. La interleucina 1 (IL-1), interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma (INF- γ) y GM-CSF estimulan la expresión de los genes y la replicación del virus en monocitos y macrófagos infectados.¹² En el año 2005, Llano y Esté¹³ publicaron una revisión muy completa acerca de las citocinas presentes en pacientes infectados con VIH-1 dando un listado de 12 citocinas y 7 quimiocinas que ya han sido implicadas directamente en esta enfermedad (*Cuadro I*). Además, algunas de esas citocinas han sido implicadas en afecciones de la cavidad bucal; por ejemplo, la interleucina 1 β (IL-1 β) se ha asociado con la pérdida de inserción de tejido conectivo periodontal y reabsorción del hueso alveolar.¹⁴ La elevación de esta citocina también ha sido relacionada con la presencia subgingival de patógenos como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Eikenella corrodens*.¹⁵ Otros estudios han encontrado que algunas quimiocinas como la proteína quimoatrayente de los monocitos (MCP-1) es sintetizada por células del endotelio vascular y fagocitos mononucleares en encías inflamadas.¹⁶ Otros hallazgos en tejidos periodontales indican que la citocina proinflamatoria interleucina 1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) inducen la expresión de MCP -1 en fibroblastos de ligamento periodontal humano.¹⁷

El líquido crevicular gingival contiene proteínas plasmáticas, células epiteliales descamadas, bacterias, células de defensa y otros. Al contener células del sistema inmune como linfocitos y monocitos, este líquido se convierte en una fuente potencial de virus. Esto es evidenciado en trabajos como el de Maticic y col, quienes analizaron muestras de líquido crevicular gingival de pacientes infectados con VIH, encontrando DNA pro-viral en 17 de 35 muestras totales.¹⁸ El líquido crevicular gingival también contiene citocinas, quimiocinas y otros factores que son producidas por las células presentes en este fluido corporal. Baqui y col analizaron la presencia de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α y observaron que se encontraban elevadas en el líquido crevicular gingival de pacientes con VIH comparado con controles sanos.¹⁹ Lamster encontró que en pacientes con HIV se observa una elevación de IL-1 β en el líquido crevicular gingival.²⁰ Por su parte, Alpagot y Lee evaluaron la presencia de INF- γ y lo asociaron con el estatus periodontal de 33 pacientes con VIH en un periodo

de 6 meses. Ellos encontraron que en los sitios donde se encontraba elevado INF- γ se elevaba el riesgo de progresión de la periodontitis.²¹

En la actualidad existen algunos sistemas que utilizan kits a través de los cuales es posible realizar la detección simultánea de varias citocinas, lo que reduce la cantidad de muestra por ensayo, lo cual es muy importante y conveniente en muestras en las cuales se tiene poco volumen, como es el caso del líquido crevicular gingival. Algunos de estos sistemas a base de kits son el Cytometry Bead Array de BD (San José, CA, USA) o el Flow Cytomix Multiplex de eBioscience (San Diego, CA, USA). Estos sistemas ofrecen varias ventajas, sin embargo la mejor sensibilidad es la reportada por el kit del sistema Bio-Plex® 200 de matrices en suspensión xMAP (Luminex) de Bio-Rad (Hercules, Ca, USA).

Sachdeva y cols²² usaron un biochip (Biochip array system Evidence Investigator de Randox Laboratories Ltd, Crumlin UK) para la medición simultánea de 12 citocinas en plasma de los pacientes con VIH. Ellos reportaron que la sensibilidad de este método fue de 5.0 pg/mL para VEGF y 0.7 pg/mL para EGF.

Por otra parte, Lee y cols trabajaron con el sistema Bio-Plex®, y reportaron que la sensibilidad para un estudio de detección de citocinas en suero de pacientes con Alzheimer es de 0.49 a 32,000 pg/mL, el cual es el rango de sensibilidad más amplio reportado por los sistemas de kits disponibles actualmente en el mercado.

Otra ventaja del sistema Bio-Plex® es que solamente se requieren 12 μ L de muestra, la cual es la mitad de la que requieren los otros sistemas, características que hacen de este sistema una excelente opción para realizar análisis y estudios de múltiples citocinas.

Pocos estudios han evaluado la presencia de citocinas en líquido crevicular gingival de portadores de VIH/SIDA, por lo que es necesario conocer la presencia de un mayor número de citocinas y cómo influye este factor sistémico en la progresión de la enfermedad periodontal, así como su correlación en respuesta a la TARGA (Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron datos clínicos y muestras de líquido crevicular gingival de 3 pacientes VIH positivos confirmados mediante el análisis de laboratorio según la CDC 2008 por prueba ELISA y Western Blot, hombres pertenecientes a la clasificación de la OMS de hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH), edad entre 30 y 31 años, bajo terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), sin experiencia previa a la misma, exclusivamente bajo TARGA combinada de inhibidores de la transcriptasa inversa

Cuadro I. Citocinas presentes en pacientes infectados con VIH-1. Publicada en Llano A, EJA. Chemokines and other cytokines in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. Inmunología 2005; 24(2): 246-260.

Cytokine	Cell source	Normal function	Relation to HIV
IL-1	Monocytes, lymphocytes, endothelia, keratinocytes, epithelia, microglia	Induces IL-6 production, haematopoiesis, co-stimulates T cells, acute-inflammation response	Induces viral replication <i>in vitro</i> by activation of NFkB
IL-2	Activated T cells (Th1)	Stimulates proliferation and cytolytic activity of activated T cells, T cell differentiation, and thymocyte and B cell proliferation, induces secretion of INF γ , IL4 and TNF, enhances NK and monocyte activities	Impaired production in HIV + patients
IL-4	T cells, mast cells, eosinophils, basophils	B cell proliferation and differentiation, T cell proliferation, monocyte activation and mast cell proliferation	Induces the production of CC-chemokines. Up-regulates CXCR4 and down-regulates CCR5
IL-10	Monocytes, B and T cells, epithelial cells, keratinocytes Th2	Inhibition of proinflammatory cytokine production. Inhibition of IL2 production Inhibition of T cell activation and cytokine production B cell co-estimulator	High concentration: inhibits HIV replication Low concentration: induce HIV replication
IL-12	Monocytes/macrophages	Activates NK and T cells Induces INF γ production by NK and T cells Induces th1 development	Inductive and inhibitory effects on HIV replication <i>in vitro</i> . Impaired production in HIV + patients
IL-13	Activated T cells Mast cells B cells Th2	B cell growth and differentiation factor No effect on T cells Antiinflammatory cytokine: inhibits pro-inflammatory cytokine production	Down-regulates CD4, CXCR4 and CCR5 Inhibits HIV replication by monocytes in macrophages
IL-15	Monocytes/macrophages, PBMCs....	Stimulation of activated T cells, B cells, NK cells	Stimulates HIV-specific CTL Impaired production in HIV + patients
IL-16	CD8T cells, eosinophils, epithelial cells	Chemoattracts CD4 T cells, Eosinophils adhesion	Inhibits HIV replication
TNF	Monocytes/macrophages T cells	Cytotoxic for tumour cells. Induces necrotic or apoptotic cell death. Pro-inflammatory activity: induces IL1, IL6 and IL8	Induces viral replication <i>in vitro</i> by activation on NFkB. Elevated levels in HIV + patients

Continuación: Cuadro I. Citocinas presentes en pacientes infectados con VIH-1. Publicada en Llano A, EJA. Chemokines and other cytokines in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. Inmunología 2005; 24(2): 246-260.

Cytokine	Cell source	Normal function	Relation to HIV
IL-6	Monocytes/macrophages, T cells epithelial cells and keratinocytes and other cells types	Induces responses in B cells, T-cells, CTL and NK cells Anti-inflammatory functions	Induces viral replication <i>in vitro</i> of T cells and macrophages by activation of NFκB. Elevated levels in HIV + patients
IL-7	Stromal cells (thymus, bone marrow) and epithelial cells (keratinocytes)	Promotes B and T lymphoid development Monocyte cytokine secretion	High levels in HIV patients Induces HIV replication <i>in vitro</i>
IL-18	Monocytes/macrophages	Activates macrophages, NK and T cells Enhances IL, TNF- α and IFN- γ production by activated T cells Regulates Th1 and Th2 responses	Induces viral replication <i>in vitro</i> Elevated levels in HIV+ individuals

análogo de los nucleósidos (NRTI/Emtricitabina y Tenofovir) e inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo a los nucleósidos (NNRTI/Efavirenz), y de mínimo de un año para evitar el síndrome de reconstitución inmune, estos pacientes representan los casos y 1 paciente HSH en igualdad de edad no portador de VIH/SIDA confirmado mediante el análisis de prueba rápida para la detección de VIH-1 y VIH-2 en sangre total/suero/plasma (ACONBIO-TECH CO. con 100% sensibilidad y especificidad, 99.5% precisión) al momento de la toma de la muestra de líquido crevicular gingival, como control.

A todos ellos se les informó de manera escrita sobre los propósitos y objetivos del estudio y se les invitó a participar de forma voluntaria bajo consentimiento firmado, revisado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey, RZMM.

Se consideraron los siguientes criterios de inclusión:

- No fumadores.
- No usuarios de drogas.
- No coinfecciones virales VHB o VHC.
- Sin historial de padecer o haber padecido tuberculosis.
- Sin compromisos sistémicos (Anemia, osteoporosis, trastornos de la coagulación, fiebre reumática, afecciones cardíacas, enfermedades circulatorias, enfermedades respiratorias, enfermedades endocrinas, enferme-

dades hepáticas, cáncer, paciente con trasplante de órgano)

- Sin presencia de enfermedad periodontal clínica y/o orales.
- No utilización previa \geq 6 semanas de cualquier antibiótico.

Se realizó un análisis clínico y se registraron los siguientes parámetros:

- Recolección de datos según recomendación de la OMS (el número de historia clínica, edad, sexo, tiempo de diagnóstico de la enfermedad y la terapia antirretroviral).
- Clasificación según conteo de células linfocitarias T CD4/mm³ siguiendo las indicaciones de la CDC 2008 para adultos y adolescentes \geq 13 años (Nivel 1, 2, 3 [SIDA] y Desconocido).
- Clasificación según conteo de carga viral.
- Índice CPOD (según la OMS).
- Índice CPITN (según la OMS).
- Índice gingival de acuerdo a lo propuesto por Löe y Silness (1963) y Löe (1967).
- Índice de placa de acuerdo con Quigley y Hein (1962).
- Profundidad de bolsa.
- Nivel de inserción clínico.
- Encía queratinizada.
- Movilidad dental.

- Clasificación de lesiones orofaciales asociadas a VIH/SIDA según la OMS y el EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV en la versión actualizada en el año 2009 por la Oral HIV/AIDS Research Alliance.²³

Los pacientes se examinaran bajo luz artificial, espejo bucal plano, explorador bucal No. 5 y sonda periodontal calibrada de William (PQ-OW), Hu-Fridey Instrument Co. En el cuadro II se muestra el resumen de las condiciones de cada paciente, en relación al VIH.

Previo a la toma de la muestra de líquido crevicular gingival (LCG), para prevenir la contaminación con saliva, se aisló el sitio mediante rollos de algodón, y para prevenir la contaminación por placa dentobacteriana se removió la placa supragingival mediante el uso de cureta McCall 17-18 Hu-Friedy, posteriormente el área fue gentilmente secada con aire para recolectar una muestra de LCG mediante papel filtro cuidadosamente insertado en el surco periodontal por 30 segundos ($0.18 \mu\text{L} \pm 0.10 \mu\text{L}$) y cada muestra de cada participante se colocó por separado en tubo Eppendorf de 2.0 mL con 80 μL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) por 10 minutos agitando en vórtice por 30 segundos, posteriormente se centrifuga 1,200 rpm por 10 minutos a -4°C y se recolecta el sobrenadante y se procede a congelar a -80°C para realizar posteriormente el análisis inmunoenzimático múltiple del sistema Bio-Plex® 200 de matrices en suspensión xMAP (Luminex) de Bio-Rad.

Esta plataforma diagnóstica utilizando la tecnología de arreglo de suspensión múltiple Bio-Plex® basado en tecnología de microesferas, las cuales tienen proporciones únicas

de colorante y cada una está asociada a un solo analito. La técnica consiste en fijar anticuerpos a una superficie sólida de manera ordenada y localizada a modo de puntos distribuidos en dos ejes. La muestra en estudio se pone en contacto con la matriz, con lo que se consigue el reconocimiento y la interacción específica proteína-anticuerpo. El análisis de marcadores de superficie se lleva a cabo mediante citometría de flujo.

En total se recolectaron 4 muestras individuales de líquido crevicular gingival resultando por dilución en triplicado en 12 muestras combinadas y 1 blanco (solución estándar grado analítico). Se utilizó para establecer el perfil proteómico un panel de citocinas humanas 8-PlexA 1x96-well de Bio-Plex® para detección de 7 citocinas (IL2, 4, 6, 10, FNT- α , INT- γ y GM-CSF) y 1 quimiocina (IL-8) y se procesó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

En los últimos años ha habido un creciente interés por estudiar el posible papel de diversos mediadores de inflamación en el VIH/SIDA; a pesar de esto, existen pocos estudios sobre el rol de diferentes citocinas inflamatorias en dicha patología, en particular las expresadas a nivel bucal, lo cual se asocia a una progresión de la enfermedad periodontal.¹⁴⁻¹⁷ En el presente estudio, demostramos que, en comparación con sujetos sanos de similar edad, los pacientes con VIH-1 presentan un 87.5% del perfil proteómico del LCG con alteraciones, presentándose niveles elevados de IL-6, IL-8 y INF- γ , así como niveles bajos de IL-2, IL-10, TNF- α y GM-CSF.

Cuadro II. Resumen de las condiciones de los pacientes que participaron en el ensayo analítico, en relación al VIH.

	Casos			
	1	2	3	4
HSH	1	2	3	4
VIH/SIDA	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo [°]
Edad	30	30	31	30
Experiencia previa al TARGA	No	No	No	/
TARGA	Emtricitabina, tenofovir y efavirenz			
Tiempo de TARGA	24 meses	18 meses	0 meses	/
LTCd4 totales	640/ μL	360/ μL	10/ μL	1,200 μL
Carga viral VIH*	= 50 copias/mL	= 50 copias/mL	10,000 copias/mL	0 copias/mL
Clasificación de la infección	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	/

[°]No portador de VIH/SIDA confirmado mediante el análisis de prueba rápida para la detección de anticuerpos VIH-1 y VIH-2 en sangre total/suero/plasma (ACONBIOTECH 100% sensibilidad y especificidad, 99.5% precisión) al momento de la toma de la muestra de líquido crevicular gingival.

*CDC. Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection Among Adults, Adolescents, and Children Aged < 18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to < 13 Years- United States, 2008. MMWR 2008; 57: 1-7.

DISCUSIÓN

Al contener células del sistema inmune como linfocitos y monocitos, el LCG se convierte en una fuente potencial de virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Esto es evidenciado en trabajos como el de Maticic y cols, en donde analizaron muestras de líquido crevicular gingival de pacientes infectados con VIH, encontrando DNA pro-viral en 17 de 35 muestras totales. Su detección se correlacionó significativamente con la carga viral ($p = 0.03$) y no con el recuento de CD4 en sangre periférica.

Baqui y cols analizaron la presencia de las citocinas IL-1 β , IL-6 y FNT- α y observaron que se encontraban elevadas en el líquido crevicular gingival de pacientes con VIH comparado con controles sanos. Los niveles de IL-1 β , IL-6 y FNT- α en el líquido crevicular gingival entre pacientes VIH-1 infectados con una carga viral elevada ($> 10,000$ copias/mL) fueron superiores a las de pacientes con una carga viral baja (< 400 copias/mL). Sólo el aumento en el nivel de la IL-1 β fue asociado con la profundidad de bolsa periodontal.

Cuando son estimuladas por patógenos, las células huésped del periodonto liberan citocinas proinflamatorias, como parte de la respuesta inmune. Estos incluyen IL-1 α y β , IL-6, IL-8 y de TNF- α . Citoquinas tales como la IL-8 fomentan la migración de PMN al sitio de la infección. Estos datos indican que los procesos inflamatorios inducidos por patógenos periodontales y la activación de ciertas citoquinas como la IL-8, demuestran que existe un factor de relevancia probable en la destrucción de los tejidos del periodonto mediada por células del huésped.²⁴

Altos niveles de INF- γ indican un mayor riesgo en la progresión de la enfermedad periodontal en pacientes VIH positivos. Esto sugiere que las personas con biomarcadores elevados indicativos de inflamación local o de inflamación sistémica tienen un riesgo mayor de padecer enfermedad periodontal como sugieren Fitzsimmons y col (2010).²⁵

Falasca y cols demostraron una correlación positiva entre el grado de la periodontitis y los niveles de IFN- γ , IL-2, IL-18 y las células CD8 en el grupo de personas VIH positivas con periodontitis, la cual no está presente en las personas VIH positivas sin enfermedad periodontal.²⁶

Una expresión mayor en el suero entre el radio de TNF- α y la IL-10 es indicativo de una fuerte relación sistémica de un estado proinflamatorio que promueve la periodontitis de tipo crónico.²⁷

Los niveles séricos de MMP-2, TIMP-1, IL-12 y GM-CSF son estadística y significativamente mayores en la periodontitis crónica existiendo así una correlación entre el inicio y la progresión de la misma.²⁸

De igual forma anomalías metabólicas en relación a la TARGA han sido reportadas en la literatura. Ciertas

citocinas activan determinados tejidos y esto puede estimular la fosforilación de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogo de los nucleósidos (NRTI/Emtricitabina y Tenofovir) en ese tipo de tejido o célula, lo que podría contribuir a la selectividad tisular de la toxicidad de los mismos.²⁹ Estas observaciones identifican la necesidad de investigar cómo las citocinas afectan la farmacología y toxicidad celular de los NRTI. En cuanto al Efavirenz es un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo a los nucleósidos (NNRTI) que según los datos obtenidos por Trabattoni y cols³⁰ después de 10 meses de terapia con el mismo, se observa una expresión de IFN- γ mayor y una expresión menor de IL-10, IL-4, TNF- α y TNF- β .

CONCLUSIONES

En este ensayo analítico los resultados entre el paciente control y los pacientes VIH-1 sugieren que el desequilibrio entre citocinas pro y antiinflamatorias hacen que estos últimos sean más susceptibles de adquirir enfermedad periodontal, causando posibles alteraciones en la flora bucal.

La cantidad total de proteínas en la saliva completa oscila entre 0.5 y 3 mg/mL. Este proteoma consta de aproximadamente 1,000 secuencias de proteínas distintas de las cuales alrededor de 300 secuencias son de origen humano. La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente. El estudio y comparación sistemáticos del proteoma en diferentes situaciones metabólicas y/o patológicas permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. En el caso del análisis proteómico asociado a patologías concretas como en el VIH/SIDA, es posible identificar proteínas que permitirían diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma. A estas proteínas se les conocen como biomarcadores.³¹

La proteómica del LCG en la clínica y la investigación demuestra ser un método práctico y confiable en el reconocimiento de varios biomarcadores de enfermedades sistémicas y orales. Estudios como el de Pradeep (2011) comprueban que niveles del biomarcador Pentraxina PTX3 producida en respuesta a señales proinflamatorias primarias por diversos tipos celulares (macrófagos y células epiteliales) en sujetos con respuesta inmunológica sistémica son similares en LCG y plasma.³²

Es necesario realizar más estudios para establecer el valor diagnóstico del LCG en comparación con la sangre. En este momento el líquido crevicular gingival aparece ser una herramienta importante para el monitoreo de la presencia y progresión de padecimientos específicos.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro más profundo y sincero agradecimiento a CO-ESIDA Nuevo León, al Colegio de Médicos Tratantes de VIH, AC, al Gremio Vita Novus, AC, a la compañía Hu-Friedy (División México), a PROMOVAGO, S.A de C.V y a VAMASA, S.A de C.V por su apoyo para la realización de este estudio.

Bibliografía

1. Wilkins M. Proteomics data mining. Expert review of proteomics. 2009; 6 (6): 599-603.
2. Boja E, Hiltke T, Rivers R, Kinsinger CH, Rahbar A, Mesri M, Rodriguez H. Evolution of clinical proteomics and its role in medicine. *Journal of Proteome Research* 2011; 10: 66-84.
3. García-Foncillas J, Bandre´s E, Zárate R, Ramírez N. Proteomic analysis in cancer research: potential application in clinical use. *Clin Transl Oncol* 2006; 8 (4): 250-261.
4. Kelleher MT, Fruhwirth G, Patel G, Ofo E, Festy F, Barber PR, Ameer-Beg SM, Vojnovic B, Gillett C, Coolen A, Keri G, Ellis PA, Ng T. The potential of optical proteomic technologies to individualize prognosis and guide rational treatment for cancer patients. *Target Oncol* 2009; 4 (3): 235-252.
5. Apweiler R, Aslanidis Ch, Deufel T, Gerstner A, Hansen J et al. Approaching clinical proteomics: Current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytomics in Clinical Proteomics* 2009; (75A): 816-832.
6. Informe de ONUSIDA sobre la epidemia mundial de SIDA 2010 Fuente Digital: http://www.unaids.org/global-report/Global_report_es.htm#
7. Arendorf TM, Bredekamp B, Cloete CAC, Sauer G. Oral manifestation of HIV infection in 600 South African patients. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 176-9.
8. Barr CE. Dental management of HIV-associated oral mucosal lesions: current and experimental techniques. In: Robertsson PB, Greenspan JS. Perspectives on Oral Manifestation of AIDS: diagnosis and management of HIV-associated infections. Littleton, Mass: PSG Publishing Co, Inc; 1998: 77-95.
9. Ceballos A, Aguirre JM, Bagan JV. Oral manifestation associated with human immunodeficiency virus infection in Spanish population. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 523-6.
10. Alpagot TFK, Lee A. Longitudinal evaluation of GCF IFN-gamma levels and periodontal status in HIV+ patients. *J Clin Periodontol* 2003; 30 (11): 944-948.
11. Maticic MPM, Kramar B, Tomazic J, Vidmar L, Zakotnik B, Skaleric U. Proviral HIV-1 DNA in gingival crevicular fluid of HIV-1-infected patients in various stages of HIV disease. *J Dent Res* 2002; 79 (7): 1496-1501.
12. Baqui AAT, Jabra-Rizk MA, Zhang M, Kelley JI, Falkler WA Jr. Enhanced interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid from periodontal pockets of patients infected with human immunodeficiency virus 1. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15 (2): 67-73.
13. Llano AEJA. Chemokines and other cytokines in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *Inmunología* 2005; 24 (2): 246-260.
14. Masada MPR, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1990; 25 (3): 156-163.
15. Reinhardt RAMM, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison AC. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993; 20 (3): 225-231.
16. Yu XAH, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. *Infect Immunol* 1993; 61 (11): 4622-4628.
17. Ozaki KHS, Takeshita A, Chen Y, Watanabe A, Nishida K, Miyata Y, Kitano S. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate synergistically the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in fibroblastic cells derived from human periodontal ligament. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11 (2): 109-114.
18. Maticic MPM, Kramar B, Tomazic J, Vidmar L, Zakotnik B, Skaleric U. Proviral HIV-1 DNA in gingival crevicular fluid of HIV-1-infected patients in various stages of HIV disease. *J Dent Res* 2000; 79 (7): 1496-1501.
19. Baqui AA, Jabra-Rizk MA, Zhang M, Kelley JI, Falkler WA Jr. Enhanced interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid from periodontal pockets of patients infected with human immunodeficiency virus 1. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15 (2): 67-73.
20. Lamster IBGJ, Mitchell-Lewis DA, Begg MD, Mitchell A. New concepts regarding the pathogenesis of periodontal disease in HIV infection. *Ann Periodontol* 1998; 3 (1): 62-75.
21. Alpagot TFK, Lee A. Longitudinal evaluation of GCF IFN-gamma levels and periodontal status in HIV+ patients. *J Clin Periodontol* 2003; 30 (11): 944-948.
22. Sachdeva NYH, Oshima K, Garcia D, Goodkin K, Asthana D. Biochip array-based analysis of plasma cytokines in HIV patients with immunological and virological discordance. *Scand J Immunology* 2007; 65 (6): 549-554.
23. Shibuski CH, Patton LL, Webster-Cyriaque JY, Greenspan D, Traboulsi RS, Ghannoum M, Jurevic R, Phelan JA, Reznik D, Greenspan JS. The Oral HIV/AIDS Research Alliance: updated case definitions of oral disease endpoints. *Oral HIV/AIDS Research Alliance, Subcommittee of the AIDS Clinical Trial Group. J Oral Pathol Med* 2009; 38 (6):481-8.
24. Lee E, Yang YH, Ho YP, Ho KY, Tsai CC. Kaohsiung. Potential role of vascular endothelial growth factor, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in periodontal diseases. *J Med Sci* 2003; 19 (8): 406-15.
25. Fitzsimmons TR, Sanders AE, Bartold PM, Slade GD. Local and systemic biomarkers in gingival crevicular fluid increase odds of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010; 37 (1): 30-6. *Epub 2009 Dec 7.*

26. Falasca K, Vecchiet F, Ucciferri C, Vignale F, Conti P, Pizzigallo A, Piattelli A, Vecchiet J. Periodontitis and cytokine patterns in HIV positive patients. European Journal Med Research 2008; 13 (4): 163-8.
27. Passoja A, Pujoja I, Knuuttila M, Niemelä O, Karttunen R, Raunio T, Tervonen T. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α in chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2010; 37 (10): 881-7.
28. Peixi L, Wings TYL, Guangyue L, Hao L, Min W, Mary NBC, Ziyuan L. The effect of chronic periodontitis on serum levels. African Journal of Biotechnology 2011; 10 (16): 3070-3076.
29. Cherry CL, Wesselingh SL. Nucleoside analogues and HIV: the combined cost to mitochondria. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1091-3.
30. Trabattoni D et al. Modulation of human immunodeficiency virus (HIV)-specific immune response by using efavirenz, nelfinavir, and stavudine in a rescue therapy regimen for HIV-infected, drug-experienced patients. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9 (5): 1114-1118.
31. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. Nature 2008; 452 (7187): 571-9. Review.
32. Pradeep AR, Kathariya R, Raghavendra NM, Sharma A. Levels of pentraxin-3 in gingival crevicular fluid and plasma in periodontal health and disease. J Periodontol 2011; 82 (5): 734-41.

Correspondencia:

Jesús Eduardo Elizondo Ochoa

Tecnológico de Monterrey, RZMM
Col. Tecnológico, Monterrey, N.L. México 64849
Teléfono: +52 (81) 8358-2000 Ext. 4821-102
E-mail: eduardoelizondo@itesm.mx