



Determinación de los niveles de IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva

"Primer Lugar en el Concurso de Carteles" XXXV Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Periodontología, Ciudad de México. Agosto 2014

Alondra del Carmen Ruíz-Gutiérrez,^{*,**} María de la Cruz Herrera-Mora,^{*,**}
Ana Lourdes Zamora-Pérez,^{*} José Luis Meléndez-Ruiz,^{*}
Vianeth del Carmen Martínez-Rodríguez,^{*,**} Celia Guerrero-Velázquez^{*}

RESUMEN

Antecedentes: La enfermedad periodontal incluye principalmente a la periodontitis crónica (PC) y agresiva (PA), que se caracterizan por la formación de bolsas, pérdida de inserción y hueso alveolar. Las citocinas proinflamatorias como resultado de la respuesta inmune en la periodontitis generan la expansión clonal de células Th (Th1, Th2 y Th17). Recientemente, se ha descrito que las clonas Th17 producen IL-17 (citocina involucrada en la pérdida ósea en patologías como la artritis reumatoide y la periodontitis). **Objetivo:** Determinar los niveles de IL-17 en muestras de líquido crevicular gingival (LCG). **Material y métodos:** Se incluyeron 21 individuos, siete controles sanos (CS), siete con periodontitis crónica y siete con periodontitis agresiva. En cada paciente, se registró el índice gingival, índice de placa, profundidad al sondeo y nivel de inserción clínica. Se midieron los niveles de IL-17 en el líquido crevicular gingival a través del método de ELISA. **Resultados:** Encontramos un aumento significativo de los niveles de IL-17 en el LCG de los pacientes con PA y PC en comparación con los controles sanos. **Conclusiones:** Nuestros datos muestran que existe una mayor concentración de IL-17 en el LCG de pacientes con PA y PC en comparación con los CS, lo que sugiere que la IL-17 desempeña un rol importante en la patogénesis y progresión de la enfermedad. Se conoce que la IL-17 se libera por las Th17 y activa a los osteoclastos que degradan la matriz ósea, como consecuencia de los mediadores inflamatorios exacerbados en la periodontitis.

Palabras clave: Periodontitis crónica, periodontitis agresiva, Th17, IL-17, reabsorción ósea, líquido crevicular gingival.

ABSTRACT

Background: Periodontal disease includes mainly chronic (CP) and aggressive periodontitis (AP), which are characterized by periodontal pockets, loss of the tooth attachment apparatus and alveolar resorption. Pro-inflammatory cytokines as a result of the immune response in periodontitis generate clonal expansion of cells Th (Th1, Th2 and Th17). It has been recently reported that Th17 clones produce IL-17 (cytokine involved in bone loss in conditions such as rheumatoid arthritis and periodontitis). **Objective:** To determine the levels of IL-17 in gingival crevicular fluid (GCF) samples. **Material and methods:** We included 21 individuals, seven healthy controls (HC), seven with chronic periodontitis and seven with aggressive periodontitis. In each patient, the gingival index, plaque index, probing depth and clinical attachment level were recorded. The levels of IL-17 were measured in gingival crevicular fluid via ELISA. **Results:** We found a significant increase in the levels of IL-17 in the GCF of AP and CP patients compared with HC. **Conclusions:** Our data shows that there are higher concentrations of IL-17 in patients with AP and CP compared to HC, suggesting that IL-17 plays an important role in the pathogenesis and progression of the disease. It is known that IL-17 activates Th17 and osteoclasts that break down bone matrix, as a result of the exacerbated release of inflammatory mediators in periodontitis.

Key words: Chronic periodontitis, aggressive periodontitis, Th17, IL-17, bone resorption, gingival crevicular fluid.

* Instituto de Investigación en Odontología.

** Especialidad de Periodoncia.

Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales.
Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de
Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

Recibido: 30 de septiembre de 2014. Aceptado: 30 de octubre de 2014.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una de las dos patologías bucales que afectan a la población mundial.¹ Esta enfermedad incluye desórdenes inflamatorios de gingivitis y periodontitis causadas por bacterias Gram negativas como *Porphyromonas gingivalis*

y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, entre otras.² La periodontitis crónica (PC) y la periodontitis agresiva (PA) se caracterizan por inflamación gingival, formación de bolsas periodontales, pérdida de inserción y destrucción de hueso alveolar.³ La principal diferencia entre la PC y la PA radica en que la pérdida de inserción es más rápida en la PA.^{1,2}

El evento inicial de la periodontitis es la inflamación gingival, que comienza con la acumulación de citocinas proinflamatorias como la IL-1, TNF- α , IL-12 e IL-18. Estas citocinas promueven la activación y diferenciación de las células T y NK. Cabe señalar que las células T cooperadoras (Th), bajo la influencia de la IL-12, se diferencian en Th1 y Th2, que secretan IL-2, INF γ , IL-4, IL-6 e IL-10, respectivamente. Sin embargo, recientemente se

ha descrito una nueva subpoblación de Th (Th17), capaz de secretar IL-17.^{3,4}

La IL-17 estimula a las células epiteliales, endoteliales y fibroblásticas para producir IL-6, IL-8 y prostaglandinas E₂ (PGE₂), por lo que se sugiere que esta interleucina es capaz de producir osteoclastogénesis debido a la inducción de la expresión de RANKL en las células osteoblásticas. Por su parte, los osteoclastos inmaduros expresan el RANK, y al unirse al RANKL, se activan para inducir la reabsorción ósea en las enfermedades periodontales. Por ello, se sugiere que la IL-17 está indirectamente implicada en el sistema RANK/RANKL/OPG en la reabsorción ósea en la enfermedad periodontal⁵ (Figura 1).

En este sentido, varios estudios han demostrado niveles elevados de IL-17 en lesiones periodontales, lo que podría hacer suponer que la IL-17 juega un papel en este proceso.⁶ También se han reportado concentraciones elevadas de IL-17 en el líquido crevicular gingival (LCG) de pacientes con PC⁷ y PA en comparación con sujetos sanos.⁸ Sin embargo, no se han comparado los niveles de IL-17 en el LCG en sujetos con periodontitis crónica y agresiva. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar los niveles de la IL-17 en el LCG de controles sanos e individuos con periodontitis crónica y agresiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo de conformidad con las normas de buenas prácticas clínicas y éticas establecidas en la versión VI (2002) de la Declaración de Helsinki y sus modificaciones en Tokio y Venecia.⁹ El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Universidad de Guadalajara en enero de 2013. La naturaleza del estudio fue explicada con detalle a cada paciente y se obtuvo el consentimiento bajo información. El estudio se realizó de febrero de 2013 a abril de 2014.

Los sujetos de estudio fueron seleccionados de las Clínicas Odontológicas Integrales del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara. A todos los participantes se les realizó una historia médica y dental y se diagnosticaron de acuerdo con la clasificación de la Academia Americana de Periodontología de 1999.¹⁰ Dentro del examen periodontal, se registró el índice gingival (IG), índice de placa (IP), profundidad al sondeo (PS) y nivel de inserción clínica (NIC).^{11,12}

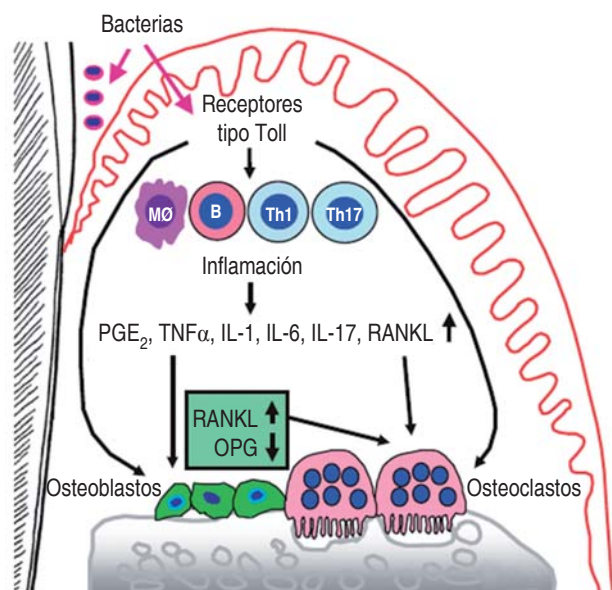


Figura 1. Pérdida ósea inducida por las células Th17 activadas en la periodontitis. Las bacterias periodontopatógenas activan a los macrófagos y células B induciendo la liberación de citocinas IL-1, IL-6, TNF- α y prostaglandinas. Al mismo tiempo, las células Th se activan al reconocer a los antígenos de dichas bacterias, se clonan y diferencian en subpoblaciones Th1 y Th17. Las células Th17 producen principalmente IL-17, que induce la maduración de los precursores de osteoclastos llevándolos a la activación y degradación de la matriz ósea (Tomado de Koide M, Kinugawa S, Takahashi N, Udagawa N. Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. Periodontol 2000. 2010; 54: 235-246).

GRUPOS DE ESTUDIO

Grupo sanos (GS): $n = 7$, sujetos periodontalmente sanos, sin pérdida de inserción clínica (NIC), inflamación, sangrado ni pérdida ósea radiográfica, con un IG ≤ 1 , y cuya media de las PS fuera ≤ 3 mm.

Grupo con PC: $n = 7$, pacientes con presencia de daño en varios sitios de la cavidad oral, incluyendo PS ≥ 4 mm y PI ≥ 4 mm, con presencia de sangrado al sondeo e inflamación.

Grupo con PA: $n = 7$, individuos con NIC ≥ 5 mm en ≥ 8 dientes, tres de los cuales no fueran incisivos ni primeros molares y que mostraran evidencia radiográfica de pérdida de hueso alveolar avanzada.

Se excluyeron del estudio todas aquellas personas fumadoras, con enfermedades sistémicas sumadas, con prescripción o uso de antibióticos y/o antiinflamatorios en un periodo de tres meses anteriores al estudio. Así mismo, los individuos que presentaran enfermedades infecciosas como hepatitis, infección por virus de inmunodeficiencia adquirida y tuberculosis o que hubieran estado en tratamiento con fenitoina, ciclosporina o bloqueadores de los canales de calcio, al igual que mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

MUESTRA DEL LÍQUIDO CREVICULAR GINGIVAL

Los parámetros clínicos se registraron y los sitios para tomar las muestras del LCG fueron seleccionados; se eligieron tres dientes por paciente, de los que se tomaron tres muestras por sitio en áreas proximales. Después de aislar el diente con un rollo de

algodón, se removió la placa supragingival con una cureta, sin tocar la encía marginal. El surco gingival se secó suavemente con una jeringa de aire por 15 segundos. Se insertó papel absorbente estandarizado (Periopaper, Oral Flow Inc., NY. USA) de 6 x 2 mm, a 2 mm de profundidad del surco gingival, sin ejercer presión, durante 30 segundos; se retiró el papel y se dejó descansar por 60 segundos para introducir la segunda tira; después, se proporcionó otro periodo de descanso (60 segundos) y se insertó la tercera tira. Las tiras que mostraron contaminación con sangre fueron desechadas. La densidad de humedad se midió inmediatamente después de la recolección en el Periotron 8000 (Oraflow, Inc., NY. USA). Las tiras se introdujeron en tubos Eppendorf en hielo frappé y se almacenaron a -80°C .

ENSAYO DE IL-17

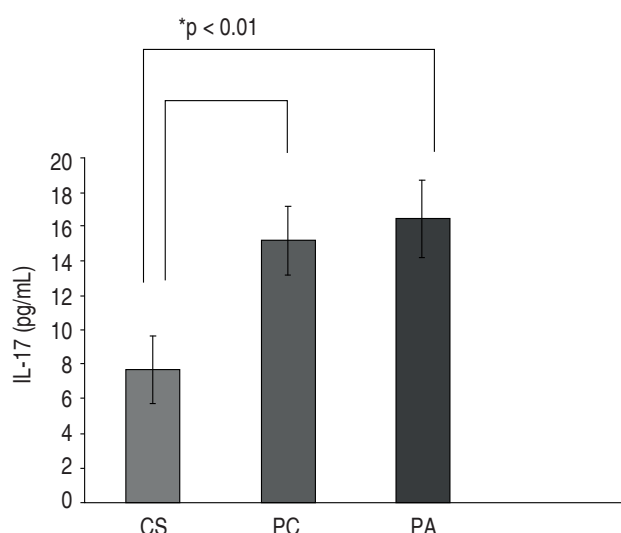
La concentración de IL-17 fue medida a través del método de ELISA (kits MyBioSource, Inc. San Diego, Ca. USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentaron como el promedio \pm la desviación estándar de los grupos para todas las variables del estudio. Los resultados presentaron una distribución normal de acuerdo con la prueba de Kolmogórov-Smirnov (niveles de IL-17), por lo que pudiera haberse aplicado una prueba paramétrica para la comparación entre los grupos. Sin embargo, decidimos aplicar una prueba no paramétrica U de Mann Whitney, debido a la n pequeña de cada grupo

Cuadro I. Parámetros clínicos y variables demográficas de controles sanos de los grupos de estudio.

Parámetros/grupo	Sanos ($n = 7$)	PC ($n = 7$)	PA ($n = 7$)
Edad (años)	22.7 (20.25)	45.1 (41-53)	41.1 (23.45)
Masculino/femenino	1/6	3/4	1/6
PS (mm)	1-3	6.1 ± 2.3 (4-10)	7.3 ± 2.3 (5-13)
NIC (mm)	≤ 3	6.7 ± 2.3 (5-14)	7.4 ± 2.7 (5.16)
Edad: promedio (mínimo-máximo)			
Sexo: proporción			
Profundidad al sondeo (PS) = [promedio \pm la desviación estándar (mínimo-máximo)]			
Nivel de inserción clínica (NIC) = [promedio \pm la desviación estándar (mínimo-máximo)]			



CS = Controles sanos, PC = Periodontitis crónica, PA = Periodontitis agresiva.

* Niveles de significancia $p < 0.05$.

Figura 2. Concentración de IL-17 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica, agresiva y controles sanos. Los pacientes con PC y PA mostraron niveles más elevados de IL-17 en el LCG en comparación con los controles sanos. Sin embargo, no observamos diferencias estadísticas entre los pacientes con PA y PC.

de estudio. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSSV.16.0 para Windows.

RESULTADOS

Variables clínicas periodontales

Los valores de los parámetros clínicos y variables demográficas de los grupos de estudio se presentan como el promedio \pm la desviación estándar en el *cuadro I*.

En el presente estudio, encontramos niveles de IL-17 en el LCG significativamente más elevados en los pacientes con PC y PA en comparación con los controles sanos. Sin embargo, no observamos diferencias significativas entre el grupo de pacientes con PC y PA (*Figura 2*).

DISCUSIÓN

En la periodontitis, las citocinas liberadas por Th1 y Th2 desempeñan un papel importante en la iniciación, progresión y modulación de la inflamación

periodontal.¹³ Durante los últimos años, una nueva clona de células Th (Th17) ha resultado de gran interés debido a su capacidad para producir citocinas proinflamatorias, entre ellas, la IL-17.¹⁴

La IL-17 juega un papel importante en la periodontitis debido a que los pacientes con esta enfermedad muestran un aumento de los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos). Estas células liberan IL-1 β y TNF- α , principalmente, para inducir la liberación de citocinas por parte de las Th17 (IL-17).¹⁵

Actualmente, se conoce que la IL-17 estimula la maduración de los precursores del osteoclasto, dando como resultado osteoclastos que degradan la matriz ósea.¹⁵ Así mismo, se ha demostrado que la IL-17 puede estimular a las células epiteliales, endoteliales y fibroblásticas para producir IL-6, IL-8 y prostaglandinas E2 (PGE2), que repercuten directamente en la osteoclastogénesis a través del sistema RANK/RANKL.⁵

En el presente estudio, encontramos niveles significativamente elevados de IL-17 en el LCG en pacientes con PC y PA en comparación con sujetos sanos, lo que no coincide con lo descrito por Zuhail y colaboradores, quienes encontraron niveles disminuidos de IL-17 en el LCG de pacientes con PA en comparación con los sujetos sanos. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas.¹⁶

Por su parte, Vernal y su grupo encontraron niveles elevados de IL-17 en el LCG de pacientes con PC, lo que coincide con los resultados de nuestro trabajo, donde demostramos niveles significativamente elevados de IL-17 en comparación con los controles sanos.⁷

Cabe señalar que el LCG es un líquido que proviene del sistema linfático y éste se conecta con el sistema sanguíneo, que drena en el crevice, por lo que esto nos da la pauta para determinar los niveles de IL-17 a nivel local y sistémico.¹⁷

El estudio molecular de los niveles de IL-17 en el LCG en los pacientes con PA y PC nos permitirá conocer el papel que juega en la reabsorción ósea de la enfermedad periodontal.

CONCLUSIONES

Nuestros datos muestran que existe una mayor concentración de IL-17 en el LCG de pacientes con PA y PC en comparación con los controles sanos, lo que sugiere que la IL-17 desempeña un rol importante en la patogénesis de la periodontitis debido a la naturaleza proinflamatoria de la enfermedad y a su capaci-

dad para producir mediadores que contribuyen a la exacerbación de la inflamación y la reabsorción ósea.

REFERENCIAS

1. Craig R, Pernat AM, Pecoits-Filho R, Levin NW, Katanko P. Periodontal diseases and systemic inflammation. *Seminars in Dialysis*. 2013; 26: 16-39.
2. Lindhe J, Ranney R, Lamster I et al. Consensus report: chronic periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4: 38-38.
3. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: 247-254.
4. Sánchez-Hernández PE, Zamora-Pérez AL, Fuentes-Lerma M, Robles-Gómez C, Mariaud-Schmidt RP, Guerrero-Velázquez C. IL-12 and IL18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2011; 17: 522-529.
5. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2006 Oct 1; 177(7): 4662-4669.
6. Ohshima H, Kato-Kogoe N, Kuhara A et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res*. 2009; 88: 633-638.
7. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 383-389.
8. Schenkein H, Koertge T, Brooks C, Sabatini R, Purkall D, Tew J. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2010; 80: 943-947.
9. Declaración de Helsinki y sus modificaciones en Tokio y Venecia.
10. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4: 1-6.
11. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964; 22: 121-135.
12. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963; 21: 533-551.
13. Houry-Haddad Y, Wilensky A, Shapira L. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007; 45: 67-75.
14. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol*. 2007; 78: 1083-1093.
15. Anunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunology*. 2008; 20: 1361-1368.
16. Ay ZY, Yilmaz G, Ozdem M, Koçak H et al. The gingival crevicular fluid levels of interleukin-11 and interleukin-17 in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2012; 83: 1425-1431.
17. Gupta G. Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator- II: Inflammatory mediators, host-response modifiers and chair side diagnostic aids. *J Med Life*. 2013; 6 (1): 7-13.

Correspondencia:

Celia Guerrero Velázquez

E-mail: celiagv2001@yahoo.com.mx