



Neutrófilos y células epiteliales en frotis de saliva de pacientes con periodontitis crónica: estudio piloto

Yveth Marlene Ortiz-García,* Trinidad García-Iglesias,** Alejandra García Orozco,*
Ilse Montserrat Montaña-Cisneros,*** Diana Laura López-Tela,*** Ana Lourdes Zamora-Pérez****

RESUMEN

Introducción: La periodontitis crónica (PC) es un proceso inflamatorio destructivo ocasionado por la disbiosis de la microbiota oral, cuyo resultado es un metabolismo óseo alterado. La permeabilidad del epitelio de unión permite la extravasación de proteínas plasmáticas y de componentes celulares como neutrófilos. El objetivo de este trabajo es cuantificar el número de neutrófilos y células epiteliales en frotis de saliva de sujetos con PC. **Material y métodos:** Se formaron dos grupos de estudio: sujetos control (SC) $n = 10$; sujetos con PC $n = 10$. Se realizaron frotis de saliva y se tiñeron con hemocolorante rápido Hycel No. Cat. 548. Se cuantificó el número de neutrófilos y células epiteliales por microscopía óptica. **Resultados:** El número de neutrófilos en saliva fue significativamente mayor en el grupo de sujetos con PC en comparación con el grupo de SC. El porcentaje de neutrófilos en el grupo de PC (17%) es mayor que el porcentaje de neutrófilos en el grupo de SC (9.5%). **Conclusión:** Los resultados preliminares revelan que los frotis de saliva de sujetos con PC muestran mayor número de neutrófilos en comparación con el grupo de SC, por lo tanto los frotis de saliva podrían ser una fuente informativa para el monitoreo del componente celular en la saliva de sujetos con PC.

Palabras clave: Neutrófilos, célula epitelial, frotis, saliva, periodontitis crónica.

ABSTRACT

Background: Chronic periodontitis (CP) is a destructive inflammatory process caused by dysbiosis of oral microbiota, which results in an altered bone metabolism. The permeability of the binding epithelium allows the extravasation of plasma proteins and cellular components such as neutrophils. The objective of this work is to quantify the number of neutrophils and epithelial cells in salivary smears of subjects with CP. **Material and methods:** This is a cross-sectional study. Two groups were formed: group 1 or CS ($n = 10$) and group 2 or CP ($n = 10$). Saliva smears were made and stained with Hemocolorante Rápido Hycel No. Cat. 548. The number of neutrophils and epithelial cells were quantified by light microscopy. **Results:** The number of neutrophils in saliva was significantly higher in the group of subjects with CP compared to the SC. The percentage of neutrophils in the CP group (17%) is higher than the percentage of neutrophils in the SC group (9.5%). **Conclusion:** Preliminary results show that salivary smears from subjects with CP show a greater number of neutrophils compared to the CS group, therefore salivary smears could be an informative source for the monitoring of the cellular component in saliva.

Key words: Neutrophils, epithelial cell, smear, saliva, chronic periodontitis.

INTRODUCCIÓN

La patogénesis de la periodontitis crónica (PC) se compone de una compleja interacción entre el ambiente microbiano y la respuesta del huésped, cuyo resultado es un metabolismo óseo alterado.¹

Los antígenos y productos bacterianos liberados por las bacterias son reconocidos por los receptores de tipo toll (TLRs) que se encuentran en la superficie de las células residentes del tejido, las cuales inician la respuesta inflamatoria en el tejido.^{2,3} A través de una cascada de eventos, los mastocitos liberan aminas vasoactivas y citocinas como TNF- α que aumentan la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares en el surco gingival.⁴ La permeabilidad del epitelio de unión permite la extravasación de proteínas plasmáticas y componentes celulares al sitio de infección;⁵ en el caso de la PC la colonización bacteriana aumenta el infiltrado de macrófagos, linfocitos y neutrófilos orquestado por la producción de citocinas y mediadores inflamatorios.⁶

* Estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas (Orientación Inmunología).

** Profesor Investigador Titular «C». Laboratorio de Inmunología. Departamento de Fisiología.

*** Estudiante de la Licenciatura en Cirujano Dentista.

**** Profesor Investigador Titular «C».

Una vez en el surco las células inflamatorias como los neutrófilos se mezclan con el líquido crevicular gingival (LCG);⁷ a través de esta vía se ha descrito que hasta 30,000 neutrófilos por minuto pueden ingresar a la cavidad oral en sujetos sanos.⁸

Los neutrófilos o polimorfonucleares representan la primera línea de defensa protectora del huésped frente a patógenos periodontales⁹ y desempeñan un papel clave y fundamental en infecciones. Además, estudios muestran que más del 50% de las células recolectadas en el LCG son neutrófilos polimorfonucleares¹⁰ y que todos los elementos del LCG constantemente se mezclan con la saliva.

La saliva se ha descrito como fuente de biomarcadores para el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad periodontal, debido a que contiene una gran proporción del contenido en el LCG total proveniente del surco y de las bolsas periodontales.¹¹

Es considerada una fuente de información clínica relevante porque contiene elementos específicos para los aspectos fisiológicos de la enfermedad periodontal.⁷

Los biomarcadores son moléculas indicadoras que podrían ser utilizadas para monitorear el estado de salud; los cambios cualitativos en la composición de estos biomarcadores podrían tener valor diagnóstico para identificar susceptibilidad y/o enfermedad.¹² La evaluación de la composición salival mediante frotis sería una opción sencilla, económica e informativa cuyos resultados podrían reflejar el estado inflamatorio de la PC. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es cuantificar el contenido de neutrófilos y células epiteliales en frotis de saliva de sujetos con PC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Éste es un estudio de tipo transversal que fue realizado en el Postgrado de la Especialidad de Periodoncia del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara. Se incluyeron 20 participantes y se formaron dos grupos de estudio: Sujetos control (SC) $n = 10$; sujetos con PC $n = 10$.

A todos los participantes se les explicó el objetivo del estudio, firmaron el consentimiento informado y contestaron una encuesta para determinar si cumplían los criterios de inclusión al proyecto. Se incluyeron sujetos mayores de edad, sistémicamente sanos. Fueron excluidos del estudio sujetos con tratamiento periodontal dentro de los seis meses previos al estudio, mujeres embarazadas, consumidores de

alcohol, fumadores, individuos con enfermedades sistémicas crónicas degenerativas, autoinmunes, infectocontagiosas o que se encontraran bajo tratamiento farmacológico.

Diagnóstico periodontal

Todos los participantes fueron evaluados por un especialista en periodoncia de la clínica de Postgrado de Periodoncia del Centro Universitario de Ciencias de la Salud para establecer el diagnóstico periodontal, considerando parámetros clínicos como profundidad de sondeo (PS), nivel de inserción clínica (NIC), índice de sangrado (IS) e índice de placa (IP). El diagnóstico se basó en los criterios propuestos en el Taller Internacional para la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales de 1996.

Toma de muestras de saliva

Las muestras se obtuvieron en un horario de 10 a 12 de la mañana, a todos los participantes se les indicó no comer, beber alimentos o usar productos de higiene dental al menos dos horas antes de su cita.

Realización de frotis

Se obtuvieron 2 mL de saliva no estimulada⁷ de los sujetos de ambos grupos. Inmediatamente después de la toma de muestra la saliva fue centrifugada a 3,500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y el *pellet* obtenido fue resuspendido con 400 μ L del buffer para células bucales,¹³ la muestra fue extendida en portaobjetos previamente codificados.

Tinción

Las laminillas fueron fijadas y teñidas con el equipo de soluciones colorantes para la tinción rápida manual de frotis, hemocolorante rápido Hycel No. Cat. 548 proporcionando resultados similares a la tinción de Wright y Giemsa.

Cuantificación de neutrófilos en frotis de saliva

Los frotis de células de saliva teñidos con hemocolorante rápido fueron estudiados con microscopía óptica en el equipo OLYMPUS CX31, con los objetivos de 100x y 60x, por un único observador. Para el análisis se evaluaron en total 10 campos homogéneos y se

contó el número de células epiteliales y neutrófilos por campo (*Figura 1*).

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar de células epiteliales y de neutrófilos. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS v11.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Se consideró estadísticamente el valor de $p < 0.05$. Para establecer las diferencias entre los grupos con respecto al número de células epiteliales y neutrófilos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluó un total de 20 laminillas de los participantes de ambos grupos. El promedio de edad del grupo de SC y con PC fue 39.2 ± 7.2 y 42.6 ± 9.1 años respectivamente. Los

datos de los parámetros clínicos para el diagnóstico se muestran en el *cuadro I*, donde se observa que el grupo con PC presenta los parámetros de diagnóstico NIC, PS, IS, OP significativamente mayores en comparación con el grupo de SC.

En el *cuadro II* se describe el promedio de neutrófilos y células epiteliales observados por campo en los frotis de los participantes de los grupos de estudio.

Cuadro I. Características clínicas de los grupos de estudio.

Variables	Grupos		p
	1: SC	2: PC	
(n)	10	10	
Edad (años)	39.2 ± 7.2	42.6 ± 9.1	ns
Sexo			
Femenino (%)	5 (50)	5 (50)	
Masculino (%)	5 (50)	5 (50)	
NIC (mm)	0.92 ± 0.27	4.36 ± 1.14	0.001
PS (mm)	1.18 ± 0.43	3.44 ± 0.89	0.000
IS (%)	6.13 ± 3.25	14.07 ± 5.03	0.000
IP (%)	12.37 ± 5.62	33.43 ± 15.86	0.000

Parámetros clínicos del diagnóstico periodontal de ambos grupos. (U de Mann Whitney), se consideró significativo $p < 0.05$. La edad se expresa en promedio de años \pm DE; NIC = nivel de inserción clínica se muestra en mm \pm DE; PS = profundidad al sondeo se muestra en mm \pm EE; IS = índice de sangrado periodontal se muestra en % \pm DE; IP = índice de placa se muestra en % \pm DE. F = femenino; M = masculino; n = tamaño de la muestra; SC = sujetos control; PC = periodontitis crónica.

Cuadro II. Células epiteliales y neutrófilos en frotis de saliva.

Grupo	Neutrófilos	Células epiteliales
SC (n = 10)	2.43 ± 0.70	25.9 ± 3.87
PC (n = 10)	5.75 ± 1.97	29.2 ± 5.72
p	0.002^a	0.324 ^a

Comparación intergrupo del número de neutrófilos y células epiteliales en frotis de saliva. ^a = Comparación entre el grupo de SC vs grupo con PC. Prueba U de Mann Whitney, $p < 0.05$. n: tamaño de la muestra; SC: sujetos control; PC: periodontitis crónica.

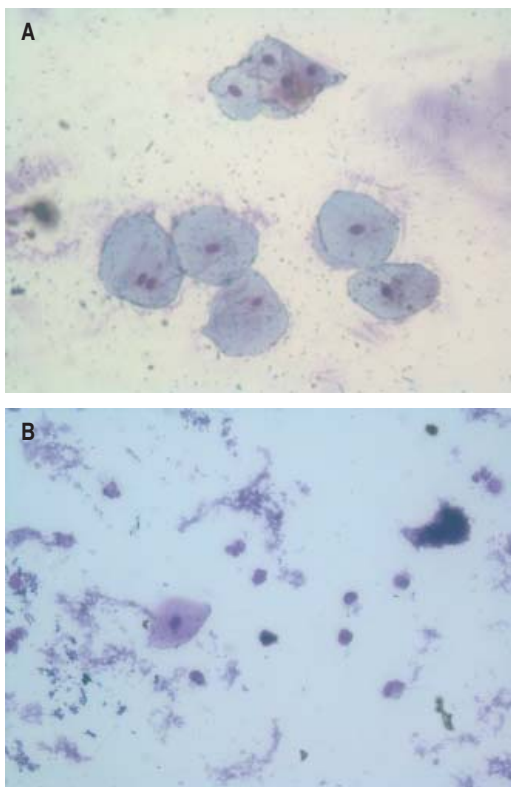


Figura 1. Fotografías de frotis de saliva. A. Células epiteliales 100x; **B.** Neutrófilos y células epiteliales 40x, tinción de hemocolorante rápido.

Se puede apreciar que el grupo con PC presentó significativamente mayor número de neutrófilos en comparación con el grupo de SC $p < 0.05$. El promedio de células epiteliales no mostró diferencias significativas entre los grupos.

Las células epiteliales se detectaron en mayor porcentaje que los neutrófilos en los frotis de saliva de ambos grupos. El porcentaje de neutrófilos del grupo de SC fue de 9.5%, mientras que el grupo con PC tuvo mayor porcentaje de estas células en frotis de saliva con un 17% (*Figura 2*).

DISCUSIÓN

El presente trabajo es un estudio piloto que cuantificó el número de neutrófilos y células epiteliales en frotis de saliva de sujetos con PC.

La saliva es un fluido de la cavidad oral utilizado para la evaluación de biomarcadores para el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad periodontal, debido a que contiene una gran proporción del LCG total provenientes del surco gingival o las bolsas periodontales;¹¹ el estudio y análisis del contenido de células en este fluido podría aportar datos relevantes en la fisiopatología de la PC, además de las ventajas que implica la utilización de la saliva como la recolección rápida, no invasiva y de bajo costo en comparación con fluidos como la sangre o LCG.¹⁴

Los resultados preliminares de este trabajo revelan que los frotis de saliva presentan una mezcla

tanto de células epiteliales como de células inmunes en las muestras de ambos grupos de estudio. Esto se explica debido a la mezcla que existe entre la saliva, con la mucosa de la cavidad oral, y los sitios permeables que permiten extravasación de células de la circulación sanguínea como los neutrófilos. Lo anterior coincide con lo descrito por Theda y cols. quienes evaluaron el contenido celular en saliva de niños con gingivitis y adultos sanos, en este trabajo se observó una mezcla de células epiteliales y de leucocitos en los frotis de saliva.¹⁴

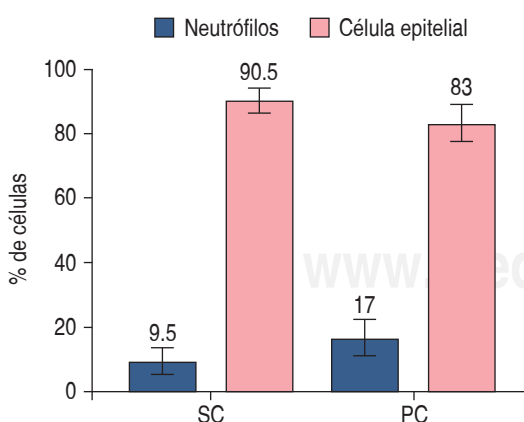
Encontramos que el grupo de PC presentó significativamente mayor número de neutrófilos en frotis de saliva en comparación con el grupo de SC. Esto puede deberse a la naturaleza inflamatoria de la PC¹⁵ que hace que constantemente se extravasen o recluten al surco gingival células y mediadores inflamatorios desde la circulación.¹⁶

El estímulo bacteriano persistente en el surco gingival genera un infiltrado exacerbado de neutrófilos al sitio de la infección,¹⁷ esto podría ser la razón por la cual el número de estas células se incrementa en los frotis de saliva de los sujetos con PC, lo que refleja la influencia del proceso inflamatorio en el periodonto en el contenido de células en saliva.

Otro dato encontrado muestra mayor porcentaje de células epiteliales en relación con el porcentaje de los neutrófilos, en ambos grupos de estudio se puede atribuir al constante recambio de células de los diferentes tipos de epitelios de la mucosa bucal que son vertidas y mezcladas con la saliva.¹⁸

Detectamos que el porcentaje de neutrófilos del grupo de PC (17%) es mayor que el porcentaje de neutrófilos del grupo de SC (9.5%). Resulta interesante que en ausencia de algún proceso inflamatorio en la cavidad oral el porcentaje o la proporción de los neutrófilos es constante como lo podemos observar en nuestros resultados en el grupo de SC, además de que el porcentaje de los neutrófilos se puede modificar por la presencia del proceso inflamatorio de patologías como la PC. Lo anterior muestra que las células inflamatorias como los neutrófilos son necesarios para el mantenimiento de la salud oral y para contener los procesos infecciosos durante la colonización bacteriana en la PC.¹⁹

Los datos de este trabajo son preliminares; sin embargo, muestran evidencia de que la saliva es un fluido sumamente importante para el monitoreo de componentes celulares que pueden verse modificados por la presencia de algún proceso inflamatorio



SC = Sujetos control; PC = Sujetos con periodontitis crónica.

Figura 2. Porcentaje de neutrófilos y células epiteliales en frotis de saliva en los grupos de estudio.

en la cavidad oral. Parte de las perspectivas de este estudio piloto es aumentar el tamaño de la muestra, además de implementar otro tipo de tinción que permita identificar el tipo de células epiteliales en los frotis y clasificar el tipo de leucocitos encontrados en las muestras de saliva. Con los resultados del presente trabajo se propone la evaluación del contenido celular en saliva de una manera sencilla, económica y altamente informativa a través de la cuantificación de células en frotis de saliva de sujetos con PC.

CONCLUSIÓN

Los resultados preliminares revelan que los frotis de saliva de sujetos con PC muestran mayor número de neutrófilos que el grupo de SC, por lo tanto los frotis de saliva podrían ser una fuente informativa para el monitoreo del componente celular en el fluido que puede reflejar procesos inflamatorios en la cavidad oral; sin embargo, es importante continuar con más investigaciones acerca del componente celular en saliva en sujetos con PC.

REFERENCIAS

- Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 30-44.
- Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 1-14.
- Kinane DF, Lappin DF. Immune processes in periodontal disease: a review. *Ann Periodontol*. 2002; 7: 62-71.
- Zaric SS, Lappin MJ, Fulton CR, Lundy FT, Coulter WA, Irwin CR. Sialylation of porphyromonas gingivalis LPS and its effect on bacterial-host interactions. *Innate Immun*. 2017; 23 (3): 319-326.
- Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 2000. 2006; 40: 29-49.
- Palaska I, Gagari E, Theoharides TC. The effects of *P. gingivalis* and *E. coli* LPS on the expression of proinflammatory mediators in human mast cells and their relevance to periodontal disease. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2016; 30 (3): 655-664.
- Farnaud SJ, Kosti O, Getting SJ, Renshaw D. Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *Scientific World Journal*. 2010; 16: 434-456.
- Nicu EA, Loos BG. Polymorphonuclear neutrophils in periodontitis and their possible modulation as a therapeutic approach. *Periodontol* 2000. 2016; 71 (1): 140-163.
- Shah R, Thomas R, Mehta DS. Neutrophil priming: Implications in periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol*. 2017; 21 (3): 180-185.
- Rahnama M, Czupkałło L, Kozicka M, Łobacz M. Gingival crevicular fluid composition and clinical importance in gingivitis and periodontitis. *Pol J Public Health*. 2014; 124 (2): 96-98.
- Korte DL, Kinney J. Personalized medicine: an update of salivary biomarkers for periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2016; 70 (1): 26-37.
- Michalke B, Rossbach B, Göen T, Schäferhenrich A, Scherer G. Saliva as a matrix for human biomonitoring in occupational and environmental medicine. *Int Arch Occup Environ Health*. 2015; 88 (1): 1-44.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009; 4 (6): 825-837.
- Theda C, Hwang SH, Czajko A, Loke YJ, Leong P, Craig JM. Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. *Sci Rep*. 2018; 28 (1): 6944.
- Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*. 2011; 38 (Suppl. 11): 60-84.
- Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009; 54 (Suppl 1): S2-10.
- Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014; 35 (1): 3-11.
- Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontol* 2000. 2016; 70 (1): 11-25.
- Hajishengallis G, Chavakis T, Hajishengallis E, Lambris JD. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J Leukoc Biol*. 2015; 98 (4): 539-548.

Correspondencia:

Dra. en C. Ana Lourdes Zamora-Pérez
 Profesor Investigador Titular «C».
 Centro Universitario de Ciencias de la Salud.
 Universidad de Guadalajara.
 Sierra Mojada Núm. 950, Col. Independencia,
 44350, Guadalajara, Jalisco.
 E-mail: anazamora@gmail.com