

Alteraciones en la fagocitosis de los leucocitos creviculares de pacientes diabéticos con enfermedad periodontal

Alteration in the phagocyte activity of crevicular leucocytes regarding to diabetic patients with periodontal disease

C.D. Jorge R. Colchado Carhuavilca¹

¹ Departamento Académico Médico quirúrgico. Facultad Odontología. UNMSM. Lima Perú.

Correspondencia

C.D. Jorge Raúl Colchado Carhuavilca
Facultad de Odontología UNMSM.
Av. Germán Amézaga s/n Lima 1 Perú.
Telef. 511-2618993
E-mail: jcolchadoc@unmsm.edu.pe

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue determinar la existencia de alteraciones en la fagocitosis de los leucocitos creviculares de pacientes diabéticos con Enfermedad Periodontal. Para tal efecto, se seleccionaron 56 individuos con Enfermedad Periodontal: 42 pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 y 14 sin ella (grupo control), comprendidos entre 35 y 74 años de edad. Para la realización del estudio, se tomó como unidad de análisis los leucocitos provenientes del fluido crevicular de los pacientes en mención. Mediante lavados secuenciales; las muestras fueron analizadas microbiológica e inmunológicamente, teniendo como indicador, de la actividad fagocítica, a la *Candida albicans* ATCC. Hallándose que sólo el 22,02 ($\pm 7,62$) de los leucocitos creviculares de diabéticos realiza una adecuada actividad fagocítica frente al 78,64 ($\pm 9,20$) del grupo control. Asimismo el 78,21 ($\pm 7,84$) de los leucocitos creviculares de diabéticos realiza la adherencia leucocitaria sin ingesta del patógeno frente a un 21,36 ($\pm 9,20$) del grupo control. Resultando diferencias estadísticamente significativas en la adecuada fagocitosis del grupo de leucocitos creviculares de los diabéticos en relación al grupo control con un valor $t = 15,5$ ($p \leq 0,001$), del mismo modo las diferencias estadísticas fueron significativas en relación de la adherencia leucocitaria sin ingesta del patógeno con un valor $t = 15,4$ ($p \leq 0,001$) referente a los leucocitos creviculares de los pacientes diabéticos frente al grupo control.

Abstract

The goal of this investigation was to find out the alterations in the phagocyte activity of crevicular leucocytes regarding to diabetic patients with periodontal disease. For that reason, 56 patients with periodontal disease were selected: 42 of them with a diagnosis of Diabetes Mellitus - Type 2, and 14 patients without it (control group), from 35 to 74 years old. To performed the study, crevicular fluid of the mentioned patients was analyzed. By means of sequential washings the samples were analyzed microbiological and immunologically, taking *Candida albicans* ATCC as indicator of the phagocyte activity. It was found that only a mean of 22.02 (± 7.62) of diabetics crevicular leucocytes group have an adequate phagocyte activity compared to 78.64 (± 9.20) of control group. In the same manner a mean of 78.21 (± 7.84) of diabetics crevicular leucocytes group made adherence without ingestion of C.a. compared to only 21.36 (± 9.20) of the control group. The differences between appropriated phagocytosis and ingestion activity of C.a. diabetics' crevicular leukocytes group and phagocytes of control group were statistical significant, $t = 15.5$ ($p \leq 0.001$), in the same manner the differences between leukocyte adherence without ingestion of C.a. of diabetic group and the control group, were statistical significant, $t = 15.4$ ($p \leq 0.001$)

Palabras Clave: Diabetes, crevice fluid, fagocitosis, leukocytes, adherence, periodontal disease.

Key words: Diabetes, crevice fluid, fagocytosis, leukocytic adherence, periodontal disease.

Introducción

Las manifestaciones bucales, son frecuentes en diversos tipos de trastornos sistémicos, siendo el periodonto el más afectado, desencadenando en una enfermedad periodontal, las cuales presentan etapas de recesión y exacerbación⁽⁹⁻¹⁷⁾

que tiende a ser de acuerdo a la capacidad defensiva del huésped, función que esta representada por la acción que realizan los leucocitos creviculares, como primera barrera protectora⁽⁶⁻¹¹⁾. Las pruebas evidencian que los leucocitos son células protectoras claves, contra la infección y/o inflamación⁽¹⁻²⁻²⁰⁾ por tal

motivo se hace evidente que de existir una función alterada de los leucocitos creviculares puede conllevar a una enfermedad periodontal, más aún en aquellas entidades sistémicas, en donde la susceptibilidad a infecciones es determinante tal y como ocurre en la Diabetes Mellitus tipo 2⁽¹⁰⁻¹⁴⁻¹⁵⁻³⁰⁾. Por tal motivo, al ser los leucocitos

creviculares, células críticas en la etiología de la enfermedad periodontal, es necesario conocer más sobre su función fagocítica, principal función protectora a nivel celular y tisular⁽²⁶⁻²⁷⁻²⁹⁾, más aún al considerar a la Diabetes Mellitus tipo 2 como factor de riesgo en dicha patología⁽⁷⁻¹⁰⁻¹³⁻¹⁸⁻²³⁾, en consecuencia, es necesario identificar la existencia de alteraciones en alguno de los pasos de la fagocitosis y así proporcionar información científica que pueda contribuir a un adecuado tratamiento integral del paciente diabético, previniendo de esta forma el desarrollo de enfermedades periodontales.

Materiales y Método

Selección de Pacientes: La investigación fue llevado a cabo en 56 pacientes con Enfermedad Periodontal: 42 eran diabéticos tipo 2 y 14 eran no diabéticos (grupo control), comprendidos entre 35 y 74 años de edad. Se excluyó a todo paciente diabético con tratamiento periodontal previo así como también a aquellos que presentan movilidad dental a causa de trauma oclusal, a los portadores de procesos inflamatorios, que por si mismos o por tratamiento de otra entidad sistémica se encontrarán ingiriendo sustancias anti-inflamatorias que puedan alterar la composición del fluido crevicular. Ningún paciente recibió terapia antibiótica en los seis meses previos a la recolección de la muestra.

Recolección del Fluido crevicular: Se realizó 50 lavados secuenciales del crevículo gingival, con el medio de transporte celular (Suero Fetal de Ternera 20%, M199) usando una pipeta convencional graduada en 10 ul (Finnpipette-LabSystem); y coleccionados en tubos Axigen, estériles. Luego, fueron centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos y lavados 2 veces con PBS, se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer con exclusión en Azul de Toluidina al 0,5% como indicador de viabilidad celular, las células fueron concentradas en 10⁶ leucocitos/ml.

Actividad Fagocítica: La Candida albicans (C.a.) ATCC fue usada como partícula indicadora para determinar

el número de fagocitos que contienen y se adhieren a leucocitos. La C.a. ATCC fue cultivada en agar Sabouraud, lavada y suspendida en PBS. Fue llevado a 90°C por 30 minutos sin destruir su apariencia general, nuevamente lavadas y suspendidas con PBS mas Suero Fetal de Ternera 20% (SFT) a una concentración final de 5 x 10⁸ C.a. /ml. A continuación, se tomó 0,2ul de C.a. y se mezcló con 0,2ul de suero AB Humano a 37° C por 30 minutos (opsonización). Se centrifugó y se lavó con PBS y fueron suspendidas con SFT. Luego, se tomó 10 ul de C.a. y se agregó a 10ul leucocitos a concentración de 10⁽⁸⁾ células/ml, se homogenizó y se colocó en láminas escavadas (3 pozos) y en una cámara húmeda, sin condiciones de agitación, a 37°C por 30 minutos (Fotos 1 y 2). Se retiró el sobre-nadante del 2° y 3° pozo, cubriéndose con 50ul de solución Eosina Y 0,2% + Azul Toluidina 0,4% observándose al microscopio a 100x. Se discriminó las C.a. adheridas (púrpuras) de las ingeridas (no coloreadas) (Fotos 3 y 4). El porcentaje fue calculado en 100 células viables.

Resultados

La glicemia de los pacientes diabéticos se encontraba compensada en un 78,6% y solo un 21,4% con valores clínicamente aceptables (Cuadro 1 y 2) La viabilidad celular de los leucocitos

creviculares de los diabéticos fue de 88,48 (+-3,76) y en los no diabéticos de 88,50(+ - 3,29).

En lo concerniente al total de leucocitos creviculares que realizan la fagocitosis del patógeno (Candida albicans), se puede apreciar que en los diabéticos la actividad fagocitaria fue mínima con 22,02(+7,62) frente al mayor número de leucocitos activamente fagocitarios correspondiente a los no diabéticos 78,64(+ - 9,20) (Cuadro 3 y 3.1).siendo la media y la desviación estándar significativamente diferentes,, además de contar con un t= 15,5 y un GL = 54 y un p<=0,001

Asimismo, la adherencia leucocitaria no fue complementada con la ingesta normal (fagocitosis) de la Candida albicans en los leucocitos creviculares de diabéticos con un 21,36 (+-9,20) a diferencia del grupo control (no diabéticos) en donde dicha adherencia fue complementada normalmente por la ingesta de la C.a. con un 78,21 (+7,84) (Cuadro 4 y 4.1) observándose diferencias significativas presentando un t=15.4 y un GL=54 y un p<=0,001. Por último, se aprecia una mayor incidencia de fagocitosis en la gingivitis en comparación con la periodontitis tanto en diabéticos como en el grupo control. (Cuadro 5) Asimismo, existe una mayor adherencia leucocitaria sin ingesta del patógeno en la periodontitis del grupo de diabético y control en comparación con el proceso de la gingivitis (Cuadro 6)

Cuadro 1. Distribución de pacientes según glicemia

Glicemia (mg/dl)	frecuencia	porcentaje válido	porcentaje acumulado
80-95	07	16,7	16,7
96-110	12	28,6	45,2
111-125	05	11,9	57,1
126-140	09	21,4	78,6
141-155	09	21,4	100,0
TOTAL	42	100,0	

Cuadro 2. Presencia de micosis en los pacientes diabéticos

Micosis	frecuencia	porcentaje válido	porcentaje acumulado
Presenta	36	85,7	85,7
No presenta	06	14,3	100,0
TOTAL	42	100,0	

Cuadro 3. Promedios de LFC según número de Candida albicans que fagocitan

Grupo	1 c.a.	2 c.a.	3 c.a.	4 c.a.	Total c.a.
Diabéticos	11,74 (±4,60)	06,95 (±3,93)	02,98 (±2,05)	0,38 (±0,96)	22,02 (±7,63)
Control	36,69 (± 6,49)	26,23 (±4,00)	12,00 (±3,16)	1,69 (±2,75)	78,64 (±9,20)

Cuadro 3.1. Valores descriptivos del grupo de LFC que realizan fagocitosis de C.a.

Grupo	media	error estándar	moda	desviación estándar	mínimo	máximo
Diabéticos	22,02	1,08	20	7,62	10	42
Control	78,64	2,46	84	9,20	63	90

Cuadro 4. Promedios de LFC que realizan adherencia sin ingesta de C.a.

Grupo	1 c.a.	2 c.a.	3 c.a.	4 c.a.	Total c.a.
Diabéticos	13,10 (±9,27)	33,50 (±9,50)	20,95 (±7,83)	8,01 (±6,53)	78,21 (±7,84)
Control	08,38 (± 2,87)	08,08 (±5,85)	02,69 (±1,65)	0,92 (±1,55)	21,36 (±9,20)

Cuadro 4.1. Valores descriptivos del grupo de LFC que realizan adherencia sin ingesta de C.a.

Grupo	media	error estándar	moda	desviación estándar	mínimo	máximo
Diabéticos	78,21	1,21	80	7,84	58	90
Control	21,36	2,46	16	9,20	10	37

Cuadro 5. Promedios de LFC que fagocitan C.a. según grupo y condición periodontal

Grupo	Condición	1 c.a.	2 c.a.	3 c.a.	4 c.a.
Diabéticos	Gingivitis	14,2	17,5	4,5	04
	Periodontitis	11	08	04	04
Control	Gingivitis	40	34	13	04
	Periodontitis	36,57	28	11	04

Cuadro 6. Promedios de LFC que realizan adherencia sin ingesta de C.a. según grupo y condición periodontal

Grupo	Condición	1 c.a.	2 c.a.	3 c.a.	4 c.a.
Diabéticos	Gingivitis	11,53	34,6	23,4	13
	Periodontitis	15,76	34,6	21,2	9,92
Control	Gingivitis	07	7,5	04	04
	Periodontitis	10	09	04	04

Discusión

Este estudio permitió confirmar la presencia de un gran número de células obtenidas de los lavados creviculares, tanto en los pacientes diabéticos como en los controles, siendo la mayoría de las células de defensa neutrófilos PMNs, tal y conforme se reportaron en otros estudios⁽²⁵⁾. Todo paciente diabético mantenía valores de glicemia aceptables tanto por la OMS y la ADA⁽³⁻⁴⁻⁵⁾. La investigación tuvo como indicador de la fagocitosis a la Candida albicans, teniendo en cuenta que, la Diabetes Mellitus es un factor predisponente a Candidiasis oral⁽⁸⁻¹³⁾ (Cuadro 2) hallándose, que el sistema inmunológico de los pacientes diabéticos no realiza una adecuada ingestión de la Candida albicans probablemente por presentar problemas en el sistema inmunológico del diabético y no reconoce al patógeno como antígeno, incrementando la posición de que existe una alteración en la fagocitosis en los leucocitos creviculares que pueden condicionar a una Enfermedad Periodontal. La pobre ingesta de los patógenos por parte de los leucocitos creviculares de diabéticos en comparación con el grupo control hallados en el presente estudio, nos demuestra que existen alteraciones fagocitarias (Cuadro 3 y 3.1). Este hallazgo se respalda en la mayor adherencia sin ingesta de patógenos por parte de los leucocitos de los mismos diabéticos en comparación con los de control (Cuadro 4 y 4.1); probablemente debido a diversos factores como la microangiopatía diabética⁽²⁴⁾ hiperglicemia, factores moleculares - inmunológicos como el TNF alfa⁽¹⁶⁾ que impide una respuesta tisular efectiva ante factores irritativos, una menor afluencia de células de defensa y una irregular captación de glucosa extracelular presente en el fluido crevicular⁽¹²⁻²¹⁻²²⁻²⁸⁾, fuente principal de energía para los fenómenos de glucólisis, y que impedirían una adecuada realización de la Quimiotaxis lo cual desencadenaría en una probable Fagocitosis frustrada⁽¹²⁻¹⁹⁻²⁵⁻²⁷⁾ en el diabético en donde el fagocito

se adhiere al patógeno y degranula, descargando su contenido intracelular de lisosomas y gránulos específicos y azurófilos, pero no fagocita⁽⁶⁾. Por último, en lo que concierne a la fagocitosis en relación a los diferentes tipos de enfermedades periodontales (Cuadro 5 y 6), se evidencia una mayor actividad fagocítica en la gingivitis en comparación con la periodontitis y por otro lado la existencia de una mayor adherencia leucocitaria sin ingesta de patógenos en la periodontitis en comparación con la gingivitis, tanto en los diabéticos como en el control, esto puede ser considerado por su diferencia etiológica y/o tiempo del proceso patológico.

Al término del estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

. La Diabetes Mellitus tipo 2 provoca una reducción en la función fagocítica de los leucocitos creviculares condicionando a una enfermedad periodontal.

. La adherencia leucocitaria, sin complemento fagocitario (ingesta del patógeno), son evidencias claras de que existen alteraciones en la fagocitosis de los leucocitos creviculares de los pacientes diabéticos con enfermedad periodontal.

. En la Gingivitis, se produce una mayor acción fagocítica que en la pe-

riodontitis, tanto en el diabético como en los no diabéticos.

. En la periodontitis, se produce una mayor adherencia leucocitaria sin ingesta del patógeno en comparación con la gingivitis, tanto en diabéticos como en no diabéticos.

. La incidencia y la gravedad de la enfermedad periodontal está condicionada a numerosos factores, pero en la Diabetes Mellitus tipo 2 lo más preocupante es la deficiencia inmunológica que existe ante la agresión de microorganismos patógenos, debido a una deficiente fagocitosis por parte de los leucocitos creviculares.

Alteraciones en la fagocitosis de los leucocitos creviculares de pacientes diabéticos con enfermedad periodontal

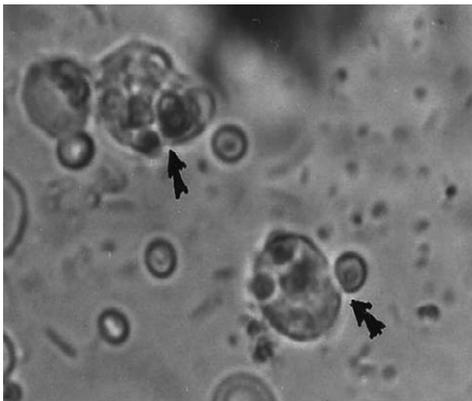


Foto 1: Leucocito del Fluido Crevicular (LFC) en plena fagocitosis: Iniciando englobamiento de la *C. albicans* (abajo) y concluyendola (arriba). Magnificación 1000 x

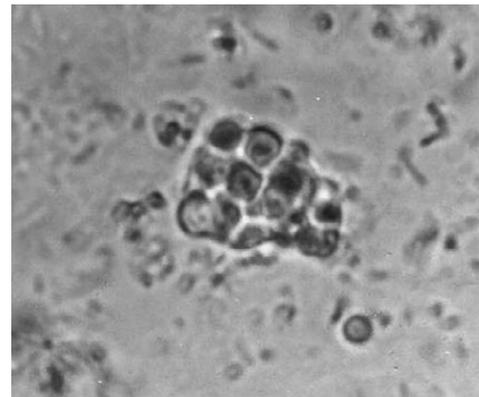


Foto 2: LFC culminando la fagocitosis. Magnificación 1000 x

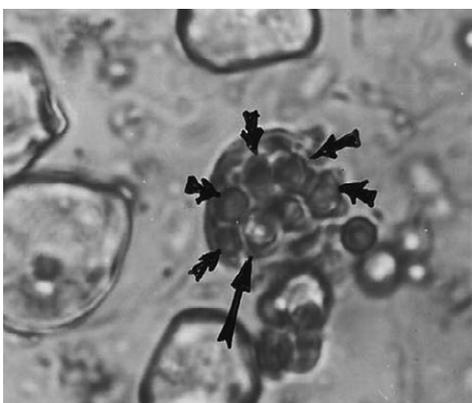


Foto 3: LFC se evidencia las *C. albicans* adheridas no fagocitadas (color púrpura - flecha corta) de las fagocitadas (no coloreadas - flecha larga) Coloración Eosina Y + Azul toluidina (1000 x)

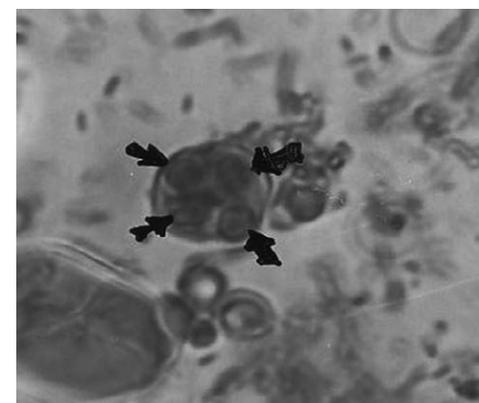


Foto 4: LFC de diabético se evidencia que sólo las *C. albicans* son adheridas (color púrpura - flechas) y no son fagocitadas. Magnificación 1000 x

Referencias Bibliográficas

1. Aguilar Serrano Pérez Estrada "Alteraciones de la Fagocitosis en el Asma Bronquial " Rev. Neumología Y Cirugía de Tórax Vol 56(3):59 - 64. 1991.
2. Alzamora L. Escajadillo C. "Manual de Prácticas - Curso Inmunológica E Inmunología Y Geología " 9ª Ed. UNMSM Lima - Perú 1999
3. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2005; 29 (Suppl. 1): 37-s42.
4. American Diabetes Association Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Committee Report. Diabetes Care 1997; 20: 1183-1197.
5. American Diabetes Association Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2003; 26: 3160-3167.
6. Barrios Gustavo. Odontología: Su Fundamento Biológico. Edit. Iatros Colombia 1991
7. Barroso I. Genetics of type 2 diabetes. Diabet Med 2005; 22: 517-535.
8. Belazi Maria et al. **Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors** Mycoses. 2005; Vol. 48(3): 192-196
9. Carranza F. Periodontología Clínica de Glickman" 6ª ed. México. Interamericana 1998.
10. Cerda J. Vásquez de La Torre - Malacara "La enfermedad periodontal en la diabetes mellitus no insulino dependiente - el efecto de la edad y el tiempo desde el diagnóstico" J.Periodontol 1995; Vol. 65 (11):991 - 5
11. Cimasoni G. "Crevicular fluid undated" Monograf Oral Scienc. 1983 Vol.12(1)
12. Cohen - Leony - Simpson "Phagocytic cells in periodontal defense" J. Periodontol. Oct 1985. Vol 56(10): 612 - 615 .
13. Dorocka-Bobkowska B. et al. **Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis** Journal of Oral Pathology & Medicine Vol 25(8) Sep 1996: 411-415
14. Emrich-Shlossman-Genco "Periodontal disease in non-insulin- dependent diabetes mellitus" J.Periodontol. Feb.1991 Vol.62(2):123-131
15. Esmann V. "The polymorphonuclear leukocyte in diabetes mellitus" J. Clin Chem. Clin.Biochem. Sep 1983 Vol.21(9): 561-567
16. **Fusanori Nishimura Et Al (2003)** Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor- α in a 2-way relationship. Journal Of Periodontology January 2003. Vol. 74(1), 97-102
17. Genco-Goldman-Cohen Periodoncia. Mexico: Edit. Interamericana. 1993
18. Grossi - Genco "Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship" Ann. Periodontal July 1998 Vol.3(1):51-61
19. Higgs - Mc Call - Youlten "A chemotactic role for prostaglandins released from polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis" Br. J. Pharmacol 1975; 53:539
20. Male David "Immunology" 2a ed. Londres: Edit Sanda. 1991
21. Matarasso - Cafiero - Bizzani - Nicolo "The role of phagocytic cells in periodontal disease" Minerva Stomatol 1991; Vol.40(4): 203 - 210
22. Mc Mollen-Van Dylre-Genco "Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to Diabetes Mellitus" J.Periodontol 1998; Vol.52(4):167 - 173
23. Nishimura-Takahashi "Periodontal disease as a complication of Diabetes Mellitus" Ann Periodont. July 1998 Vol 3 (1):20 - 29.
24. Romero Rivas - Gutiérrez Manay J.- Rojas "Diagnóstico precoz de la diabetes mediante estudio histológico de la gingiva" Rev. Alma Mater UNMSM. Agosto 1994 Vol.8: 65 - 78
25. Sigush-Klinger-Holtz-Süss "In vitro phagocytosis by crevicular phagocytes In many forms of periodontitis" J.Periodontol. 1992 63:496 - 501
26. Tan - Anderson - Watanakunakorn "Neutrophil dysfunction in Diabetes Mellitus" J Lab. Clin. Med. Jan 1975 Vol.85(1):26-33
27. Van Dyke - Zinney - Winkel "Neutrophil function in localized Juvenil Periodontitis: phagocytosis, superoxide production and specific granule release" J.Periodontol. Nov.1986 903 - 908
28. Wierusz - Wysocka - Wysocki "Phagocytosis, bactericidal capacity and superoxide anion (O_2^-) production by polymorphonuclear neutrophils from patients with Diabetes Mellitus" Folia Aematol. Int. May. Klin. Morphol. Blutforsch. 1985 Vol 112(5):658 - 668
29. Wilson-Reeves W.G. "Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes" Clin. Exp. Immunol. Feb 1986 Vol 63(2): 478-484
30. Zachariassen R.D. "Diabetes Mellitus And Periodontal Disease" Compendium. May 1991 Vol.12(5):324, 326-328.

Recibido :07-07-2008

Aceptado para publicación: 13-08-2008