

## Enzimas salivales y enfermedad periodontal

Tatjana Todorovic<sup>1</sup>, Ivan Dozic<sup>1</sup>, Mario Vicente Barrero<sup>2</sup>, Besir Ljuskovic<sup>3</sup>, Janko Pejovic<sup>4</sup>, Marjan Marjanovic<sup>4</sup>, Milan Knezevic<sup>2</sup>

(1) Departamento de Bioquímica. Facultad de Estomatología. Universidad de Belgrado. Serbia y Montenegro

(2) Servicio de Estomatología, Cirugía Oral y Maxilofacial. Complejo Hospitalario Materno-Insular. Las Palmas de Gran Canaria. España

(3) Departamento de Cirugía Oral. Clínica de Estomatología. Academia Médica Militar. Belgrado. Serbia y Montenegro

(4) Departamento de Periodontología. Clínica de Estomatología. Academia Médica Militar. Belgrado. Serbia y Montenegro

### Correspondencia:

Dr. Mario Vicente Barrero

Servicio de Estomatología, Cirugía Oral y Maxilofacial

Hospital Universitario Insular. Ala Oeste-2ª planta

Plaza del Dr. Pasteur s/n

Las Palmas de Gran Canaria. España

E-mail: mmvicente@wanadoo.es

Recibido: 6-04-2005

Aceptado: 30-07-2005

### Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed  
-EMBASE, Excerpta Medica  
-Indice Médico Español  
-IBECS

Todorovic T, Dozic I, Vicente-Barrero M, Ljuskovic B, Pejovic J, Marjanovic M, Knezevic M. Salivary enzymes and periodontal disease. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E115-9.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-6946

## RESUMEN

**Objetivos:** Las enfermedades que producen daño tisular producen la liberación de diferentes enzimas relacionadas con la muerte y destrucción celular, como son la aspartato y alanino aminotransferasa (AST, ALT), lactato dehidrogenasa (LDH), creatinina quinasa (CK), alcalina y ácida (ALP, ACP) y gamma glutamil transferasa (GGT). Al tratarse la enfermedad periodontal (EP) de un proceso inflamatorio con afectación de la encía y periodonto, parece lógico pensar que la actividad enzimática debe reflejar los cambios metabólicos secundarios a esta reacción inflamatoria.

**Diseño del estudio:** En este artículo examinamos la actividad de CK, LDH, AST, ALT, GGT, ALP y ACP en la saliva de pacientes con EP, antes y después del tratamiento periodontal (grupo experimental-30 muestras) así como en la saliva de pacientes sin enfermedad periodontal (grupo control-20 muestras). La EP se diagnosticó en base a parámetros clínicos (índice gingival-GI, sangrado al sondaje-BOP y profundidad al sondaje-PD). Todos los pacientes con enfermedad periodontal recibieron tratamiento convencional de la misma. Se registró la actividad enzimática en todos los pacientes y se cuantificó por espectrofotometría

**Resultados:** Se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad de CK, LDH, AST, ALT; GGT, ALP y ACP en la saliva de los pacientes con enfermedad periodontal en relación a los resultados obtenidos en el grupo control. Se detectó una correlación positiva entre la actividad de las enzimas salivales examinadas y el valor del GI. Después del tratamiento periodontal convencional la actividad de estas enzimas salivales disminuyó significativamente.

**Conclusiones:** Basándonos en estos resultados. Podemos concluir que la actividad de estas enzimas puede ser útil en el diagnóstico y evaluación del tratamiento de la EP.

**Palabras clave:** Saliva, enzimas, enfermedad periodontal.

## ABSTRACT

**Background:** Host responses to periodontal disease include the production of different enzymes that are released by stromal, epithelial or inflammatory cells. There are important enzymes associated with cell injury and cell death like: aspartate and alanine aminotransferase (AST, ALT), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), alkaline and acidic phosphatase (ALP, ACP), gamma glutamil transferase (GGT). Changes in enzymatic activity reflect metabolic changes in the gingiva and periodontium in inflammation.

**Design of Study:** In this paper we have examined the activity of CK, LDH, AST, ALT, GGT, ALP and ACP in saliva from patients with periodontal disease before and after periodontal treatment (experimental group - 30 samples) and in saliva from healthy patients (control group - 20 samples). Periodontal disease was determined based on clinical pa-

rameters (gingival index (GI), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD)). Patients with periodontal disease were under conventional periodontal treatment.

**Results:** Obtained results were shown statistically significant increases of activity of CK, LDH, AST, ALT, GGT, ALP, ACP in saliva from patients with periodontal disease in relation to control group. There is positive correlation between the activity of examined salivary enzymes and value of the gingival index. After conventional periodontal therapy the activity of all salivary enzymes was significantly decreased.

**Conclusions:** Based on these results, it can be assume that activity of these enzymes in saliva, as biochemical markers for periodontal tissue damage, may be useful in diagnosis, prognosis and evaluation of therapy effects in periodontal disease.

**Key words:** Saliva, enzymes, periodontal disease.

## INTRODUCCION

En los últimos años, se ha postulado que la saliva constituye un material biológico importante para el desarrollo de nuevos tests, que favorecerían el conocimiento del diagnóstico y la etiopatogenia de muchas enfermedades sistémicas, tales como la leucemia, el síndrome de Sjögren, el SIDA, el lupus eritematoso sistémico y la diabetes mellitus (1). Entre los componentes importantes de la saliva, que en este contexto se discuten dentro de literatura especializada, se encuentran varias enzimas. La respuesta del organismo a la enfermedad periodontal (EP) incluye la producción de algunas enzimas ya conocidas con anterioridad, que son liberadas por las células estromales, epiteliales y por las mismas bacterias. El análisis de estas enzimas en la secreción salival así como en el fluido crevicular, puede contribuir a clarificarla patogénesis y mejorar el diagnóstico precoz de la EP. Desde este punto de vista, el papel más importante se centra en las enzimas generadas por la destrucción de los tejidos periodontales, como son: elastasa, colagenasa, gelatinasa y proteínasa.

Algunas enzimas intracelulares incrementan su liberación en pacientes con EP, procedentes de las células periodontales dañadas, pudiendo localizarse en la saliva, el líquido crevicular y en las zonas limítrofes. Las enzimas particularmente relevantes en este grupo son las siguientes: aspartato y alanino aminotransferasa (AST y ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), gama-glutamyl-transferasa (GGT), creatin-kinasa (CK), alcalin-fosfatasa (ALP) y ácido-fosfatasa (ACP). Concretamente, la LDH y AST pueden ayudar en la monitorización de la progresión de la EP. Estas enzimas son muy útiles para comprobar la actividad de la EP o para valorar el efecto del tratamiento periodontal (2-4). Solo algunas investigaciones se han ocupado de la actividad de estas enzimas en la saliva, relacionándolas con la gingivitis y la EP, mostrando resultados similares a los de nuestro estudio. No obstante, la mayoría de estos estudios sobre la actividad de la ALP se refieren al líquido crevicular, mientras que el nuestro se refiere a saliva total.

Los objetivos de la investigación en este estudio han sido los siguientes:

- 1) Estudiar la actividad de las enzimas AST, ALT, CK, LDH, GGT, ALP y ACP en la saliva de los pacientes sanos en comparación con los pacientes con EP.
- 2) Valorar la correlación entre las actividades de las enzimas salivales estudiadas y los valores de los parámetros clínicos utilizados para la evaluación de las condiciones clínicas del

tejido periodontal.

3) Analizar las diferencias en la actividad de las enzimas AST, ALT, CK, LDH, GGT, ALP y ACP en la saliva de los pacientes con EP antes y después del tratamiento.

## MATERIAL Y METODOS

En el estudio se incluyeron 30 pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 25 y 50 años, con enfermedad periodontal y 20 personas sin alteraciones periodontales. Se excluyeron mujeres embarazadas y en periodo de lactancia, mujeres post-menopausicas y aquellas personas en tratamiento con estrógenos por distintas causas. Todos los sujetos examinados gozaban de buena salud, sin historia anterior de enfermedades sistémicas. En el examen inicial cada persona completó un cuestionario médico detallado y se sometió a un examen periodontal completo que incluyó: índice gingival (GI), sangrado al sondaje (BOP) y profundidad de sondaje (PD). En los criterios de inclusión, consideramos que el GI debía ser superior a 2; al menos 3 puntos de sangrado de los seis estudiados (incisivos y molares); y una PD de al menos 5 mm en alguna de estas mismas zonas en el estudio.

A los pacientes con EP se les aplicó un protocolo convencional de tratamiento que implicaba instrucciones para la higiene oral, cuatro sesiones de raspado y alisado de las superficies radiculares junto a la administración de 500 mgr. de amoxicilina con 125 mgr. de ácido clavulánico, 3 veces al día, durante 7 días. Tras cada raspado y alisado, recomendamos digluconato de clorhexidina, 3 veces al día durante 10 días.

La saliva se recogió antes y después del tratamiento, en las primeras horas de la mañana, después de un cepillado de 3 minutos y antes del desayuno. Se recolectaron muestras de saliva total, no estimulada, directamente de la boca de los pacientes con una pipeta automática especialmente diseñada (Salivette, Sarsstadt, Alemania) y se almacenaron en tubos estériles. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante diez minutos. La actividad de las enzimas se determinó de forma inmediata, espectrométricamente con el método IFCC en un analizador automático Hitachi 911. La determinación fue inmediata teniendo en cuenta que la actividad de la LDH se degrada rápidamente cuando se congela y no disponíamos de otros métodos de medición alternativos (5).

Para el estudio estadístico se estudió el valor promedio, des-

viación estándar, error estándar, coeficiente de correlación de Pearson, y el test t de Student.

## RESULTADOS

Los resultados confirmaron que la actividad de las enzimas salivales de los pacientes con EP era significativamente más alta que la obtenida en el grupo control ( $p < 0.001$ ) (Tabla 1).

La correlación entre la actividad de estas enzimas y el valor de los parámetros clínicos mostró un alto coeficiente de correlación entre los valores del GI y las actividades de CK ( $r=0.828$ ), GGT ( $r=0.835$ ), ACP ( $r=0.694$ ), ALT ( $r=0.854$ ), LDH ( $r=0.850$ ), ALP ( $r=0.815$ ) y AST ( $r=0.804$ ). Teniendo en cuenta la PD se obtuvo una buena correlación con ALP ( $r=0.626$ ), LDH ( $r=0.750$ ) y AST ( $r=0.728$ ).

Después del tratamiento periodontal convencional la actividad de todas las enzimas salivales analizadas mostró una disminución significativa (Tabla 1).

## DISCUSION

El diagnóstico de la EP ha estado ligado a la valoración de test clínicos (GI, BOP, PD), así como en los hallazgos radiológicos (pérdida del hueso alveolar). Estas medidas son útiles para detectar la evidencia de la enfermedad y su pasado o para verificar la salud periodontal, pero dan solo una información limitada sobre el pronóstico y diagnóstico precoz.

Se han propuesto numerosos marcadores salivales para utilizarlos como tests diagnósticos de la EP. Este es el caso de las enzimas intracelulares (CK, LDH, AST, ALT, GGT, ALP y ACP). Sin embargo, si el tejido periodontal está enfermo, o sus células están dañadas debido al edema o destrucción de la membrana celular, estas enzimas intracelulares se liberan en mayor cantidad en el líquido crevicular gingival y en la saliva, donde su actividad pueden ser comprobada. Debido a este hecho, estas enzimas pueden actuar como marcadores bioquímicos de la condición funcional de los tejidos periodontales (2-4, 6, 7).

ENZIMA	PACIENTES SANOS	PACIENTES CON EP (ANTES DEL TRATAMIENTO)	PACIENTES CON EP (DESPUES DEL TRATAMIENTO)
CK	3,60 ± 1,95 U/l	44,25 ± 12,16 U/l *	23,12 ± 5,13 U/l *
LDH	99,50 ± 12,02 U/l	1015 ± 114,40 U/l *	215,25 ± 28,14 U/l *
AST	21,20 ± 6,76 U/l	184,30 ± 78,14 U/l *	50,25 ± 14,18 U/l *
ALT	7,30 ± 1,76 U/l	98,15 ± 20,72 U/l *	67,21 ± 13,16 U/l *
GGT	4,60 ± 1,95 U/l	12,19 ± 4,55 U/l *	8,03 ± 1,21 U/l *
ALP	7,30 ± 2,05 U/l	38,40 ± 9,89 U/l *	25,12 ± 7,34 U/l *
ACP	20,53 ± 4,01 U/l	81,76 ± 15,40 U/l *	42,25 ± 10,11 U/l *

**Tabla 1.** Diferencias entre las actividades (U/L ± SD) de las enzimas CK, LDH, AST, ALT, GGT, ALP, ACP en la saliva de los pacientes sanos y los pacientes con enfermedad periodontal, antes y después del tratamiento periodontal.

Leyenda: CK-creatin-kinasa, LDH-lactato deshidrogenasa, AST- aspartato aminotransferasa, ALT- alanino aminotransferasa, GGT- gamma-glutamyl-transferasa, ALP- alcalin-fosfatasa, ACP- ácido-fosfatasa,

\*-diferencia estadísticamente significativa:  $p < 0.001$ .

CK, LDH, AST, ALT y GGT son enzimas intracelulares incluidas en el proceso del metabolismo celular y también están mayoritariamente presentes en las células de tejidos blandos. Estas enzimas son indicadores de un nivel alto de daño celular y su actividad aumentada en la saliva es consecuencia de la mayor liberación por parte de las células de partes blandas periodontales dañadas y por supuesto, a un reflejo de los cambios metabólicos que se producen en la encía inflamada (2-4).

Otros estudios anteriores han mostrado resultados similares a estos, aunque se trata de estudios que detectaban las actividades de estas enzimas en el líquido crevicular gingival y no en la saliva libre no estimulada (8-11). La mayoría de estas investigaciones solo estudiaba la actividad de la AST (2-4, 6-9, 12). Solo algunas investigaciones se han ocupado de la actividad de estas enzimas en la saliva, relacionándolas con la gingivitis y la EP, mostrando resultados similares a los de nuestro estudio (10, 13-15).

ALP y ACP son enzimas intracelulares que se encuentran en la mayoría de los tejidos y órganos, particularmente en los huesos. Su actividad incrementada en la saliva probablemente es la consecuencia de procesos destructivos en el hueso alveolar en los estadios avanzados de desarrollo de la enfermedad periodontal, como se ha comprobado en trabajos anteriores de investigación donde también se ha confirmado una correlación positiva entre la actividad de ALP y el porcentaje de la pérdida del hueso alveolar (3, 4).

Algunos estudios han mostrado un aumento considerable de la actividad de ALP en la fase aguda de la enfermedad periodontal, recuperándose valores similares a los de las personas sanas después del tratamiento periodontal (16). En este sentido, también la mayoría de estos estudios sobre la actividad de la ALP se refieren al líquido crevicular (17, 18). Con respecto a la actividad salival de ACP en la enfermedad periodontal no hemos encontrado literatura disponible.

Nuestros resultados demuestran que la actividad incrementada de ciertas enzimas tisulares en la EP, pueden reflejar los cambios patológicos de las células periodontales. Además, la cuantía de su actividad puede reflejar la magnitud de los procesos patológicos y los daños presentes en el tejido periodontal. Así por ejemplo, puede mostrar si existe solo inflamación o si se acompaña también de procesos destructivos del hueso y partes blandas; por lo que sería un indicador del pronóstico y curso de la enfermedad.

Es verdad que para estimar el nivel del daño celular sería importante establecer la diferencia entre las mismas enzimas intracelulares ya que es sabido que no todas tienen la misma localización dentro de la célula. Algunas están localizadas únicamente en el citoplasma y salen mucho más fácilmente al espacio extracelular, como es el caso de LDH. Otras en cambio, están localizadas tanto en el citoplasma como en la mitocondria, por lo que su presencia en el espacio extracelular requerirá un daño celular más grave, concretamente en los casos de la AST y ALT. En otros casos están localizadas exclusivamente en los orgánulos celulares como la ACP que se encuentra sólo en los lisosomas. Si estas enzimas aparecen

en el espacio extracelular se puede concluir que ha ocurrido un daño celular grave (necrosis). Finalmente hay enzimas que se localizan en la membrana celular como son la GGT y ALP. Para la liberación de éstas, la membrana celular debería ser destruida previamente.

Teniendo esto en cuenta, la actividad de estas enzimas en la saliva puede ser útil para la valoración de la eficacia del tratamiento en una EP preexistente (2-4).

Los estudios mencionados anteriormente investigaban en su mayoría las actividades de estas enzimas en el líquido gingival crevicular, que está más en contacto con el tejido periodontal, por lo que, al menos teóricamente, debería reflejar más exactamente lo que está ocurriendo allí. Sin embargo, el problema que plantea el líquido crevicular es la técnica de coleccionarlo, que es complicada, y si se establece como el método rutinario podría ser difícil para llevarlo a cabo en la práctica. Por el contrario, la saliva es abundante, y el método de coleccionarla muy simple y más fácil para el paciente. Además, pueden detectarse las mismas enzimas que en el líquido crevicular gingival, por lo que estos tests salivares tienen un futuro prometedor (2-4).

## CONCLUSIONES

Basándose en los resultados de este estudio se puede concluir que las actividades de las enzimas CK, LDH, AST, ALT, GGT, ALP y ACP están significativamente incrementadas en la saliva de los pacientes con EP comparándolas con las de personas sanas. Esto es probablemente consecuencia de los procesos patológicos en los tejidos periodontales, de donde se liberan y se mezclan con la saliva circundante. Se ha establecido la correlación entre la actividad de las enzimas y el IG. Después del tratamiento periodontal la actividad de las enzimas salivales examinadas ha disminuido como resultado de la reparación de los tejidos.

En base a los resultados de este estudio las enzimas salivales pueden ser consideradas como marcadores bioquímicos de la condición funcional de los tejidos periodontales; lo que proporciona nuevas oportunidades para profundizar en el diagnóstico y seguimiento de la eficacia del tratamiento de la EP.

## BIBLIOGRAFIA

1. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Br Med J* 1992; 305:207-18.
2. Numabe Y, Hisano A, Kamoi K, Yoshie H, Ito K, Kurihara H. Analysis of saliva for periodontal diagnosis and monitoring. *Periodontology* 2004;40:115-9.
3. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol* 2000;27:453-65.
4. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 2004;343:1-16.
5. Alonso de la Peña V, Diz Dios P, Lojo Rocamonde S, Tojo Sierra R, Rodríguez-Segade A. A standardised protocol for the quantification of lactate dehydrogenase activity in saliva. *S. Arch Oral Biol* 2004;49:23-7.
6. McCulloch MW. Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostics indicators of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1994;21:497-506
7. Nakashima K, Gannopolou C, Andersen E, Roehrich N, Brochut P, Dubrez B et al. A longitudinal study of various crevicular fluid components as markers of periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 1996;23:832-8.
8. Kuru B, Noyan V, Yilmaz S, Kadir T, Acar O, Buget E. The relationship

- of microbiologic data to aspartate aminotransferases enzyme activity in gingival crevical fluid. *Journal of Marmara University Dental Faculty* 1996;2: 491-8.
9. Oringer RJ, Howel TH, Nevins ML, Reasner DS, Davis GH, Sekler J et al. Relationship between crevicular aspartate aminotransferase levels and periodontal disease progression. *J Periodontol Res* 2001;72:17-24.
10. Shimada K, Miyuno T, Uchida T, Kato T, Ito K, Murai S. Relationship between levels of aspartate aminotransferase in gingival crevical fluid and conventional measures of periodontal status assessed using PocketWatch: a cross sectional study. *J Oral Sci* 1999;41:35-40.
11. Tsalikis L, Malaka E, Pavlitou E, Konstantinidis A. Aspartate aminotransferase levels in gingival crevicular fluid before and after periodontal treatment. *J Int Acad Periodontol* 2001;3:68-74.
12. Person GR, de Rouen TA, Page RC. Relationship between gingival crevicular fluid levels of aspartate aminotransferase and active tissue destruction in treated chronic periodontitis patients. *J Periodontol Res* 1990;25:81-7.
13. Barbosa SE, Salvador SL, Fogo JC, Marcantonio RA. Use of aspartate aminotransferase in diagnostic periodontal disease: a comparative study of clinical and microbiological parameters. *J Oral Sci* 2003;45:32-8.
14. Cesco RT, Ito IY, Albuquerque RF Jr. Levels of aspartate aminotransferase in saliva of patient with different periodontal conditions. *J Clin Periodontol* 2003;30:752-5.
15. Petrovich A, Podorozhania RP, Genesina TI, Beloklitskaia GF. Activity of glutamate dehydrogenase, gamma glutamil transferase and creatine kinase in saliva in gingivitis. *Patol Fiziol Eksp Ter* 1996;4:28-30.
16. Yan F. Alkaline phosphatase level in gingival crevical fluid of periodontitis before and after periodontal treatment. *Chung Hua Kou Chiang Hseueh Tsa Chin* 1995;30: 255-66.
17. Chapple ILC, Socransky SS, Dibart S, Glenwright ILD, Mathews JB. Chemiluminescent assay to alkaline phosphatases in human gingival crevical fluid: Investigations with on experimental gingivitis model and studies on the source of the enzyme within crevical fluid. *J Clin Periodontol* 1996; 23:587-94.
18. Nakashima K, Roehrich N, Cimasoni G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatases in gingival crevical fluid: their relation to periodontal status. *J Clin Periodontol* 1994;21:327-33.