

Estudio de la respuesta bioquímica de neutrófilos humanos frente a patógenos periodontales

CARMEN GLORIA RESTAINO BIANCHI

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER
EN BIOQUÍMICA**

Directores de Tesis: Dra. María Antonieta Valenzuela Pedevila Dr. Javier Puente
Piccardo

Santiago 2005

Comisión informante de tesis: Profesora Ana María Kettlun M. (Presidente) Profesora Mercedes Zaldívar S. Profesora Ana María Jabalquinto L.

..	1
AGRADECIMIENTOS .	3
RESUMEN .	5
ABSTRACT .	7
ABREVIATURAS . .	9
1. INTRODUCCIÓN .	11
1.1 GENERALIDADES SOBRE NEUTRÓFILOS .	11
1.2 FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA RESPUESTA ANTIBACTERIANA . .	14
1.3 FUNCIÓN Y PRODUCCIÓN DE IL-8 .	15
1.4 SECRECIÓN DE INTERMEDIARIOS DE OXÍGENO REACTIVOS (ROS) y ÓXIDO NÍTRICO (NO) . .	15
1.5 SECRECIÓN DE METALOPROTEINASAS (MMPs) . .	16
1.5.1 Patología de las metaloproteinasas de la matriz extracelular .	17
1.5.2 Propiedades bioquímicas de las MMPs .	17
1.6 PATÓGENOS PERIODONTALES Y ENFERMEDAD PERIODONTAL .	20
1.7 HIPÓTESIS . .	21
1.8 OBJETIVO GENERAL .	21
1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS .	23
2.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y GRUPO CONTROL . .	23
2.1.1 Criterios de exclusión .	24
2.1.2 Criterios de inclusión de Periodontitis del adulto . .	24
2.1.3 Criterios de inclusión del Grupo Control .	24
2.1.4 Severidad de la enfermedad periodontal .	25
2.1.5 Toma de muestra .	25
2.2 INCUBACIÓN DE SANGRE COMPLETA .	25
2.3 EXTRACTOS BACTERIANOS . .	25

2.3.1 Preparación de extractos bacterianos .	26
2.3.2 Detección de proteínas de extractos bacterianos . .	26
2.4 PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS .	26
2.5 RECuento DE NEUTRÓFILOS . .	27
2.6 INCUBACIÓN DE NEUTRÓFILOS PURIFICADOS . .	28
2.7 ZIMOGRAFÍA .	28
2.8 DETERMINACIÓN DE NO ₂ ⁻ y NO ₃ ⁻ POR ELECTROFORESIS CAPILAR .	29
2.9 DETERMINACIÓN DE IL-8 POR ELISA .	29
2.10 IMMUNO DOT BLOT .	29
2.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .	30
3. RESULTADOS . .	31
3.1 GRUPO DE SUJETOS SELECCIONADOS . .	31
3.2 RECuento DE NEUTRÓFILOS . .	31
3.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD METALOPROTEINÁSICA .	33
3.3.1 Análisis de la secreción de metaloproteinasas en sangre completa .	34
3.3.2 Análisis de la secreción de metaloproteinasas en neutrófilos purificados .	36
3.3.3 Comparación de actividad metaloproteínásica basal (sin estimular) de pacientes y controles .	39
3.4 DETERMINACIÓN DE IL-8 .	39
3.4.1 Análisis de secreción de IL-8 en sangre completa .	39
3.4.2 Análisis de la secreción de IL-8 en neutrófilos purificados .	41
3.5 DETERMINACIÓN DE OXIDO NITRICO .	44
3.6 COMPARACIÓN DE SECRECIÓN DE MMPs EN MEDIO RPMI Y PBS .	45
3.7 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE MMP-9 POR IMMUNO DOT BLOT .	46
4. DISCUSIÓN .	47
4.1 NEUTRÓFILOS Y METALOPROTEINASAS. .	48
4.1.1 Neutrófilos infiltrantes del tejido. .	49
Neutrófilos sanguíneos periféricos: .	50
4.2 SECRECIÓN DE IL-8 .	51

4.3 SECRECIÓN DE NO .	55
4.4 NEUTRÓFILOS PURIFICADOS . .	55
4.5 NEUTRÓFILOS Y ENFERMEDAD PERIODONTAL .	56
5. CONCLUSIONES . .	59
6. REFERENCIAS .	61

A Magdalena, Sebastián y Yadrán

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores guías: María Antonieta Valenzuela y Javier Puente por los gratos momentos compartidos, por el cariño y la amistad.

A la Dra. Ana María Kettlun por enseñarme las técnicas necesarias para este trabajo.

A las profesoras: Mercedes Zaldívar y Ana María Jabalquinto por su interés y sus valiosos aportes.

Al Dr. Jorge Gamonal por su importante colaboración.

Al Departamento de Inmunología, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Madrid, España.

A todos los amigos que participaron conmigo en este trabajo.

A mi familia por su apoyo e interés.

Este trabajo fue financiado con el Proyecto Fondecyt N° 102 0100.

RESUMEN

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) son un tipo de leucocito que tiene participación en la primera etapa de la inmunidad innata. Constituyen la primera línea de defensa del hospedero frente a un agente patógeno, pero la liberación de sus componentes puede causar destrucción de tejido. Estas células al activarse secretan citoquinas inflamatorias, fagocitan a las bacterias y las destruyen a través de agentes microbicidas como intermediarios de oxígeno reactivo (ROS) y óxido nítrico (NO) y, también, a través de la secreción de metaloproteinasas (MMPs). Las MMPs son enzimas hidrolíticas con características neutras que degradan colágeno, gelatina, laminina y otros componentes de la matriz extracelular, secretándose desde neutrófilos la MMP-8 (colagenasa) y la MMP-9 (gelatinasa B).

La periodontitis es una enfermedad que causa la destrucción del colágeno en el ligamento periodontal provocando inflamación. El proceso destructivo es el resultado de una compleja interacción entre estas bacterias, la inmunidad del hospedero y los sistemas inflamatorios. Las principales bacterias implicadas en la enfermedad periodontal son anaeróbicas y gram-negativas e incluyen *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*), entre otras. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), por parte de los neutrófilos lo realiza una importante familia de receptores llamada receptores de tipo Toll (TLR).

Los objetivos de esta tesis fueron: 1) estudiar la respuesta de los neutrófilos periféricos (circulantes) frente a periodontopatógenos como *Pg* y *Aa* y, además, de algunos de los PAMPs más conocidos como LPS de *Escherichia coli* (componente de la pared celular), Zymosan A (extracto de *Saccharomyces cerevisiae*) y la lectina fitohemaglutinina (PHA); y 2) comparar la respuesta de neutrófilos provenientes de pacientes con periodontitis con la de individuos sanos.

La respuesta de los neutrófilos frente a agentes potencialmente estimuladores o activadores se estudió, tanto en sangre completa como en neutrófilos purificados, a través del análisis de la secreción de la enzima MMP-9 y la citoquina IL-8, intentándose además medir la liberación al medio de óxido nítrico (NO). La actividad de MMP-9 se determinó por zimografía en geles de poliacrilamida en presencia de gelatina (colágeno desnaturalizado) como sustrato, en condiciones desnaturantes, lo que permite evaluar las formas activa y latente de la gelatinasa. Los niveles de IL-8 se determinaron utilizando el método ELISA. Los intentos de demostrar un aumento de liberación de NO en respuesta a los estimuladores fueron infructuosos, no obstante se trataron de cuantificar los niveles de sus metabolitos estables (nitrito y nitrato) por el sensible método de electroforesis capilar.

En sangre completa, al comparar la condición estimulada con la condición basal en ausencia de estimulador, PHA aumentó la liberación de MMP-9 en ambos grupos (sanos y pacientes). Por otra parte, LPS y *Pg* estimularon la secreción de IL-8 sólo en el grupo de pacientes. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con enfermedad periodontal y el grupo control de los individuos sanos en cuanto a la liberación de MMP-9 e IL-8.

Al trabajar con neutrófilos purificados, en ambos grupos LPS y *Pg* aumentó significativamente la liberación de MMP-9 respecto a la condición basal, encontrándose además un aumento significativo en el grupo de pacientes comparado con el grupo sano. La secreción de IL-8 respecto a la condición basal aumentó sólo en pacientes por efecto de LPS y Zymosan A. La comparación entre los dos grupos mostró diferencias significativas en la liberación de IL-8 al incubar con LPS, *Pg*, *Aa* y Zymosan A, observándose una mayor activación en los neutrófilos de

los pacientes. La secreción de IL-8 se encontró atenuada en pacientes, pero se observó un gran aumento en su secreción (activación) por todos los estimuladores estudiados (entre 3 y 7 veces), a diferencia del grupo control.

Los resultados en neutrófilos purificados apoyan la hipótesis propuesta de que este tipo de leucocitos periféricos en pacientes con periodontitis son más reactivos (hiper-reactivos) que los de individuos sanos. La determinación de la respuesta de los neutrófilos periféricos podría ser una herramienta útil para el seguimiento de la eficacia del tratamiento en los pacientes con periodontitis. La baja proporción de neutrófilos en las muestras de sangre completa no permitió observar esta hiper-reactividad, ni tampoco la respuesta estimuladora en general.

ABSTRACT

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are a kind of leukocyte involved in the early innate immune response. They constitute the first line of host defense against a pathogenic agent, but the release of their components may cause tissue destruction. When these cells are activated they release proinflammatory cytokines, they phagocyte bacteria and destroy them through microbicidal agents like oxygen intermediates (ROS), nitric oxide (NO) and, also, through the release of metalloproteinases (MMPs). MMPs are hydrolytic enzymes with neutral characteristics which are able to degradate collagen, gelatin, laminin and other extracellular matrix components, releasing from neutrophils MMP-8 (collagenase) and MMP-9 (gelatinase B).

Periodontitis is a disease that destroys collagen in the periodontal ligament producing inflammation. The destructive process is the result of a complex interaction between these bacteria, the host immunity and the inflammatory systems. The main bacteria involved in the periodontal disease are anaerobic and gram-negative and they include *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*), among others. Recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by neutrophils is carried out by an important family of receptors called Toll like receptors (TLR).

The objectives of this thesis were two: 1) to study the response of peripheric (circulating) neutrophils against periodontopathogens *Pg* and *Aa* and, also against some of well known PAMPs such like LPS from *Escherichia coli* (cell wall component), Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae* extract) and the lectin phytohemagglutinin (PHA); and 2) to compare the response of neutrophils from patients with periodontitis to those from healthy individuals.

The response of neutrophils against potentially stimulating agents or activators was studied in both whole blood and purified neutrophils, through the analysis of the release of the MMP-9 enzyme and the cytokine IL-8, trying to measure also the release of nitric oxide (NO) to the incubation medium. The activity of the MMP-9 was determined by zymography on polyacrylamide gels, including gelatin (denaturalized collagen) as a substrate, in denaturing conditions, to evaluate both the active and latent forms of the gelatinase. The IL-8 levels were assayed using the ELISA method. Attempts to demonstrate an increase in the release of NO in response to the stimulators were unsuccessful, even though the nitrite and nitrate determination was used in an attempt to quantify the levels of its stable metabolites by the sensitive method of capillary electrophoresis.

In whole blood, when comparing the stimulated condition with the basal condition in absence of a stimulator, PHA increased the release of MMP-9 in both groups (healthy and patients). On the other hand, LPS and *Pg* stimulated the release of IL-8 only in the patient group. Significant differences between the group of patients with periodontal disease and the control group of healthy individuals in terms of the release of MMP-9 and IL-8 were not found.

When working with purified neutrophils, in both groups LPS and *Pg* significantly increased the release of MMP-9 with respect to the basal condition; a significant increase in the patients group compared to the healthy group was also found. The release of IL-8 with respect to the basal condition increased only in patients due to the effects of LPS and Zymosan A. The comparison between the two groups showed significant differences in the release of IL-8, during incubation with LPS, *Pg*, *Aa* and Zymosan, with a greater activation in the neutrophils from patients. The secretion of IL-8 was reduced in patients, but with all the stimulators studied a larger secretion (activation) between 3 and 7 fold was observed in patient neutrophils as

compared to that of the healthy group.

The results in purified neutrophils support the proposed hypothesis that this type of peripheric leucocyte in patients with periodontitis is more reactive (hyper-reactive) than in healthy individuals. Determination of peripheral neutrophil response can be an useful tool for monitoring the efficacy of the treatment in periodontitis-affected patients. The proportion of neutrophils in whole blood samples was too low to observe this hyper-reactivity, or the stimulating response in general.

ABREVIATURAS

Aa: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

AP-1: factor nuclear

BCA: ácido bicinconánico

C: control

CD 31: molécula de adhesión

CXR1: receptor IL-8

CXR2: receptor IL-8

DE: desviación estándar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”

fMLP: N-formil-1-metionil-1-leucil-1-fenilalanina

GM-CSF: factor estimulador de colonias granulocito-macrófago

HIV: “human immunodeficiency virus”

ICAM-1: molécula de adhesión intermolecular-1

IFG-#: interferón #

IgG: inmunoglobulina G

IL: interleuquina

IL-8(e)/IL-8(b): IL-8 estimulada con respecto al valor basal

iNOS: enzima óxido nítrico sintasa inducible

IP: índice de placa

IRAK: quinasa asociada al receptor de IL-1

LFA-1: glicoproteína leucocitaria de adhesión cadena #

LPS: lipopolisacárido

MAP: proteína quinasa activada por mitógenos

MMP: metaloproteinasa

MMPasa(e)/MMPasa(b): actividad gelatinásica estimulada con respecto al valor basal

MyD88: molécula adaptadora

NADPH: fosfato dinucleótido de adenina nicotinamida

NF-AT: factor nuclear

NGAL: lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos

NF-#B: factor nuclear

NIC: niveles de inserción clínicos

NO: óxido nítrico
P: paciente
PA: periodontitis agresiva
PAG: periodontitis agresiva generalizada
PAL: periodontitis agresiva localizada
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos
PBS: amortiguador de fosfato salino hipotónico
PC: periodontitis crónica
PHA: fitohemaglutinina
Pg: Porphyromonas gingivalis
PMN: neutrófilos polimorfonucleares
proMMP: forma latente o zimógeno de MMP
PS: profundidad de saco
ROS: intermediarios de oxígeno reactivos
rpm: revoluciones por minuto
RPMI: medio de cultivo celular
SDS: dodecil sulfato de sodio
SPSS 8.0: software estadístico
TBS-T: solución de amortiguador salino con Tween 20 al 0,1%
TGF-#: factor de crecimiento transformante #
TIMP: inhibidor tisular
TLR: receptor de tipo toll
TNF-#: factor de necrosis tumoral #
TRAF 6: factor asociado al receptor de TNF
Z: Zymosan A

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES SOBRE NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMN), son células sanguíneas altamente especializadas que se caracterizan por un núcleo multilobulado (segmentado en 3 a 5 lóbulos interconectados) y un citoplasma granular (**Figura 1**). Gran parte de los componentes celulares del neutrófilo: superficie celular, gránulos citoplasmáticos y citosol, están implicados en la fagocitosis y destrucción de bacterias. Estas acciones están coordinadas, entre otras, por la liberación de enzimas, péptidos anti-microbianos y especies reactivas del oxígeno (ROS).



Figura 1: Morfología básica de un neutrófilo circulante: núcleo multilobulado y gránulos de secreción característicos.

Los neutrófilos son un tipo de leucocito que puede sintetizar proteínas en intervalos regulares, en una etapa temprana en su proceso de maduración en la médula ósea, y almacenarlas por varios días como grandes gránulos citoplasmáticos.

Cuando los neutrófilos son estimulados apropiadamente, se movilizan desde la sangre a los tejidos y, en segundos, pueden liberar sus contenidos a vacuolas endocíticas o, por fusión con la membrana plasmática, al exterior de la célula (Faurichou & Borregaard, 2003).

Aproximadamente el 55% a 60% de la médula ósea se dedica a la producción de neutrófilos. Abundan en la sangre donde tienen una vida media corta si es que no son reclutados a sitios de inflamación por quimioquinas y citoquinas específicas. Una vez reclutados, migran rápidamente de la sangre a los tejidos que, de otra forma, están desprovistos de neutrófilos (Zychlinsky y col., 2003). Los neutrófilos se encuentran en 3 ambientes: médula ósea, sangre y tejidos. Constituyen la primera línea de defensa del hospedero, pero la liberación al exterior de sus componentes puede causar destrucción tisular (Fredriksson y col., 2003).

Los gránulos de neutrófilos se pueden dividir en 4 poblaciones distintas (Faurichou & Borregaard, 2003):

- Azurófilos: contienen mieloperoxidasa.

- Específicos: contienen colagenasas, gelatinasas, entre otras proteínas y no contienen peroxidasa.
- Gelatinasas: son un subgrupo de gránulos específicos con alto contenido de gelatinasas o metaloproteinasas.
- Gránulos de secreción: son vesículas intracelulares altamente móviles.

Los neutrófilos pueden secretar sus gránulos independientemente. Los gránulos de secreción son los de mayor movilización, le siguen los gránulos de gelatinasa, luego los gránulos específicos y, finalmente, los azurófilos (Ford, 1999).

Los neutrófilos por interacción con una amplia variedad de estímulos, liberan agentes microbicidas y proinflamatorios al medio extracelular. Se han identificado 3 rutas distintas de secreción (Ford, 1999):

- Respuesta rápida (en segundos): liberación de compuestos recientemente sintetizados como intermediarios de oxígeno reactivos y derivados fosfolípidos.
- Respuesta en segundos o minutos: descarga de enzimas preformadas y proteínas almacenadas en gránulos intracelulares (desgranulación).
- Respuesta en pocas horas: la activación de transcripción de genes resultante en síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias.

La desgranulación tiene importancia en varios aspectos de la biología fagocítica incluyendo eliminación de patógenos, transmigración a tejido inflamado y, también, daño y reparación de tejido. Se induce por una amplia variedad de estímulos que interactúan con distintos receptores de superficie y pueden tener diferentes tipos de respuesta en los neutrófilos. Los estímulos que inducen desgranulación incluyen: factores quimiotácticos, quimioquinas y citoquinas.

Los neutrófilos interactúan con células endoteliales del tejido inflamado y son estimulados a desgranular y la desgranulación regula la adhesión de neutrófilos y la transmigración. La migración de neutrófilos en tejido inflamado ocurre en distintas etapas (Berton, 1999):

Los neutrófilos se adhieren y ruedan a través del endotelio inflamado como resultado de interacciones adhesivas mediadas por selectinas. Aquí los neutrófilos pueden ser estimulados para desgranular. La unión a L-selectina gatilla un aumento en Ca^{2+} libre citosólico y esto moviliza vesículas de secreción y gránulos específicos.

La unión a células endoteliales favorece la interacción de neutrófilos con sustancias quimiotácticas que gatillan señales activantes de la adhesión de integrinas por sus contrarreceptores endoteliales.

La activación de la adhesión de integrinas por ligandos promueve la firme adhesión de neutrófilos en la superficie endotelial.

Después de la adhesión firme, los neutrófilos migran al espacio subendotelial.

1.2 FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA RESPUESTA ANTIBACTERIANA

La fagocitosis la realizan los neutrófilos en la primera etapa de la respuesta inmune innata y los macrófagos en una etapa posterior (Abbas y col., 2000; Parker y col., 2005). Los neutrófilos y también los macrófagos, reconocen bacterias y productos bacterianos a través de diversos receptores cuya función es estimular la migración de las células al sitio de infección, promover la fagocitosis de bacterias y estimular la producción de sustancias microbicidas. Entre éstos, destacan los receptores para: opsoninas, proteínas del complemento, citoquinas, quimioquinas (especialmente IL-8) y péptidos que se inician con el residuo N-formilmetionil (como el N-formil-1-metionil-1-leucil-1-fenilalanina o fMLP), característico de la traducción en las proteínas bacterianas (Abbas y col., 2000). El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), y no de estructuras simples, por parte de los neutrófilos y de todas las células de inmunidad innata de vertebrados, ha puesto de manifiesto uno de los principales mecanismos de reconocimiento de los patógenos (Trevani y col., 2003; Parker y col., 2005). Los principales receptores que reconocen a los PAMPs son la familia de receptores del tipo Toll (TLR). Se han descrito más de una decena de estos receptores los que son casi todos expresados en neutrófilos. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) y el Zymosan A (extracto de *Saccharomyces cerevisiae*) son algunos de los PAMPs más estudiados los que actúan a través de receptores TLR4 y TLR2/6, respectivamente (Hoshino, y col., 1999, Beutler, 2000, Hayashi, y col., 2003). El reconocimiento de patrones moleculares conservados en microorganismos por estos receptores lleva a una cascada de transducción de señales que resulta en activación celular y liberación de citoquinas (Hayashi y col., 2003).

Entre las citoquinas más importantes que estimulan el proceso de migración de leucocitos a los sitios de infección se encuentran el TNF- α y quimioquinas, como IL-8, que se producen en respuesta a una infección (Silva y col., 2004). El TNF- α , estimula a las células endoteliales a expresar moléculas que intervienen en la unión de diferentes tipos de leucocitos. Dentro de 1 o 2 horas después de exposición a esta citoquina, las células endoteliales expresan E-selectina que media una unión inicial débil de neutrófilos a sitios de inflamación. En presencia de sangre que fluye, los neutrófilos que están poco unidos son impulsados a rodar a través de la superficie endotelial. Las integrinas aparecen 6 a 12 horas después de la exposición y median la unión estable de leucocitos al endotelio. La adhesión firme es seguida por la migración de leucocitos a través del espacio interendotelial (Abbas y col., 2000) (Figura 2). Como modelo clásico de activación de neutrófilos se utiliza lipopolisacárido (LPS) de bacterias (Sugita y col., 1998, Pugin y col., 1999). También se ha descrito la estimulación con Zymosan A (Hayashi y col., 2003) y con fitohemaglutinina (PHA) (Pugin y col., 1999).

1.3 FUNCIÓN Y PRODUCCIÓN DE IL-8

La reactividad de los neutrófilos está modulada por varias citoquinas. Las citoquinas proinflamatorias como interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) son activadores potentes, en cambio, las citoquinas antiinflamatorias, como interleuquina-10 (IL-10), tienen participación en la disminución de las funciones de neutrófilos. Entre las citoquinas, TNF- α e IL-8, son los mediadores proinflamatorios responsables de la activación y el reclutamiento que dirigen finalmente la progresión del proceso inflamatorio (Silva y col., 2004)

Las quimioquinas representan un grupo de citoquinas estructuralmente relacionadas cuya importancia en procesos inflamatorios se ilustra por su habilidad de reclutar subpoblaciones de leucocitos (Scapini y col., 2000). Los miembros de esta gran familia de moléculas consisten de proteínas de 8 a 14 kDa que comparten 20 a 70% de homología en la secuencia de aminoácidos. Los neutrófilos no son sólo productores, sino que también son los blancos primarios para IL-8, respondiendo a este mediador por quimiotaxis, liberación de enzimas provenientes de gránulos, estallido respiratorio de oxidasa (aumento de producción de peróxido), sobreexpresión de moléculas de adhesión en la superficie y aumento de adherencia en las células endoteliales no estimuladas (El Benna y col., 1995, Scapini y col., 2000). Los neutrófilos expresan 2 receptores para IL-8, llamados CXR1 y CXR2, y además, producen citoquinas de las cuales IL-8 es la más abundante (Marie y col., 1998).

Se ha demostrado que los leucocitos polimorfonucleares (PMN) pueden expresar y liberar biológicamente cantidades relevantes de IL-8 después de la exposición de LPS o fagocitosis de *S. cerevisiae* opsonizado con IgG (Scapini y col., 2000). La IL-8 derivada de neutrófilos puede servir para inmobilizar a las células que ya están presentes en tejido inflamado a través de desensibilización de receptores. Aunque no hay duda de que la IL-8 se sintetiza *de novo* y se libera al medio en respuesta a un estímulo dado, también se ha demostrado que la mayor parte de la IL-8 recientemente biosintetizada permanece asociada a la célula. Esta quimioquina puede potencialmente servir como un reservorio, con funciones de señalización cuando los neutrófilos apoptóticos son eliminados por macrófagos (Scapini y col., 2000).

1.4 SECRECIÓN DE INTERMEDIARIOS DE OXÍGENO REACTIVOS (ROS) y ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Los neutrófilos fagocitan las bacterias en vesículas donde estos gérmenes son destruidos. Su principal función efectora es destruir a las bacterias fagocitadas por fusión de lisosomas con fagosomas (fagolisosomas) y por producción de moléculas

microbicidas. Un mecanismo microbicida es la conversión catalítica de oxígeno molecular a radicales libres oxihaluros, que son agentes oxidantes altamente reactivos que destruyen microorganismos (Zekonis & Zekonis, 2004). El primer sistema es la fagocito oxidasa, enzima con múltiples subunidades que se expresa en fagocitos activados y que se ubica en las membranas plasmática y fagolisosomal. Esta enzima reduce el O_2 a ROS como radicales superóxidos usando NADPH como cofactor. El superóxido se dismuta enzimáticamente en peróxido de hidrógeno, que es usado por la mieloperoxidasa de los neutrófilos para convertir iones haluro, normalmente no reactivos, al ácido hipohaluro reactivo que es tóxico para la bacteria (Kobayashi y col., 2003). El proceso por el cual se produce ROS, se gatilla por ligandos activantes que se enlazan a receptores. Tanto TNF- α y LPS pueden activar a los neutrófilos a producir grandes cantidades de ROS en respuesta a otros estimuladores como el fMLP de bacterias y quimioquinas.

Además del sistema fagocito oxidasa, hay un segundo sistema generador de radicales libres, que es la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS). La iNOS es una enzima citosólica que se puede inducir en respuesta a estímulos inflamatorios como LPS, IFN- γ , TNF- α e IL-1- β (Batista y col., 2002). La iNOS cataliza la conversión de arginina a citrulina y se libera óxido nítrico gaseoso. El NO se puede combinar con peróxido de hidrógeno o superóxido generado por la fagocito oxidasa para producir radicales peróxidos altamente reactivos entre los que se encuentra el peroxinitrito, que puede destruir microorganismos. La iNOS y la fagocito oxidasa trabajan juntas para eliminar eficientemente a los microorganismos.

Cuando los neutrófilos y macrófagos son fuertemente activados, pueden dañar el tejido normal por liberación de ROS, NO y enzimas lisosomales (Kobayashi y col., 2003). Los productos microbicidas de estas células no distinguen entre tejido propio y microorganismos y si estos productos entran al medio extracelular son capaces de causar daño al tejido.

1.5 SECRECIÓN DE METALOPROTEINASAS (MMPs)

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular son una importante familia de endopeptidasas liberadas por varias células como leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales (Pugin y col., 1999; Ryan & Golub, 2000). Son proteasas que funcionan a pH neutro y utilizan varios constituyentes de la matriz extracelular como su sustrato. Las MMPs son proteasas que contienen zinc y tienen diferentes especificidades para sustrato. Estas enzimas se secretan como proenzimas o zymógenos y son activadas por otras enzimas proteolíticas para la digestión de colágeno. Existen inhibidores potentes naturales denominados inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs) que bloquean a las MMPs activadas (Ejeil y col., 2003). Las metaloproteinasas son producidas por células infiltrantes y también, por células residentes del periodoncio y tienen participación en eventos patológicos y fisiológicos.

Las principales MMPs en neutrófilos son MMP-8 (colagenasa) que está ubicada en

los gránulos específicos y MMP-9 (gelatinasa) que está predominantemente en los gránulos de gelatinasa (Faurischou & Borreggard, 2003). Mientras que MMP-8 es capaz de degradar colágeno intersticial, MMP-9 es una enzima gelatinolítica que degrada varias proteínas de la matriz extracelular, incluyendo colágeno de membranas basales (Apajalahti y col., 2003).

La matriz extracelular no solo consiste de colágenos, sino que además de proteoglicanos, laminina y fibronectina entre otros, que se deben remover primero para que la colagenasa tenga acceso al sustrato colágeno. En esta remoción también participan otras MMPs como la MMP-3 que actúa sobre laminina (Kettlun y col., 2003).

Los ligamentos periodontales y gingivales producen colagenasas que se cree que participan en el recambio normal del tejido (Dahan y col., 2001, Ejeil y col., 2003). Sin embargo, células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos activados secretan metaloproteinasas de la matriz extracelular, siendo la mayor fuente de MMP-8 y MMP-9, en enfermedades inflamatorias como periodontitis (Romanelli y col., 1999, Uitto y col., 2000, Kiili y col., 2002, Apajalahti y col., 2003). Estas enzimas son las principales degradadoras de colágeno en el tejido inflamado en gingivitis y periodontitis y se han detectado en el líquido gingival crevicular y la saliva.

1.5.1 Patología de las metaloproteinasas de la matriz extracelular

Existen algunas enfermedades que han sido asociadas con la degradación de colágeno de las matrices extracelulares. El remodelamiento de los tejidos se encuentra altamente regulado por un complejo sistema de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, lo cual involucra la producción de enzimas, activadores, inhibidores y moléculas regulatorias tales como citoquinas y factores de crecimiento (Woessner, 1991; Fowlkes & Winkler, 2002).

La degradación acelerada del tejido conectivo ocurre en situaciones patológicas tales como enfermedades periodontales y que pueden explicarse por una falla en los mecanismos normales de regulación (Birkedal-Hansen, 1995). Las endopeptidasas son enzimas claves en el proceso degradativo, ya que la matriz extracelular está compuesta principalmente por proteínas. Estas macromoléculas de la matriz extracelular pueden ser degradadas por algunos de los cuatro tipos principales de endopeptidasas: las metalo, serina, cisteína y aspártico proteinasas. Debido a las características neutras del fluido gingival crevicular, la destrucción de la matriz extracelular debería ocurrir a pH neutro, lo que implica que las proteinasas predominantes serían las MMPs y serina proteasas, las que participarían en las fases iniciales de la destrucción (Birkedal-Hansen, 1993; Nagase & Woessner, 1999).

1.5.2 Propiedades bioquímicas de las MMPs

Se han aislados 64 miembros de la familia de las metaloproteinasas de la matriz, desde plantas, invertebrados y vertebrados. Dentro de esta familia, las enzimas se han clasificado en subgrupos denominados colagenasas intersticiales (MMP-1, -8, -13),

gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelinas (MMP-3, -10, -11), metaloproteinasas unidas a membrana (MMP-14, -15, -16, -17), matrilisina (MMP-7) y metaloelastasa (Reynolds & Meikle, 1997).

Las MMPs se caracterizan por contener un sitio de unión Zn^{2+} dentro de su dominio catalítico y su estabilidad estructural se debe a la presencia del ión Ca^{2+} , por lo que pueden ser inhibidas con agentes quelantes del ión calcio.

Las enzimas que componen esta familia, poseen una alta similitud de secuencia de aminoácidos, ya sea dentro de cada grupo o entre grupos distintos (Reynolds & Meikle, 1997). Dentro de su secuencia se han descrito seis dominios (**Figura 3**):

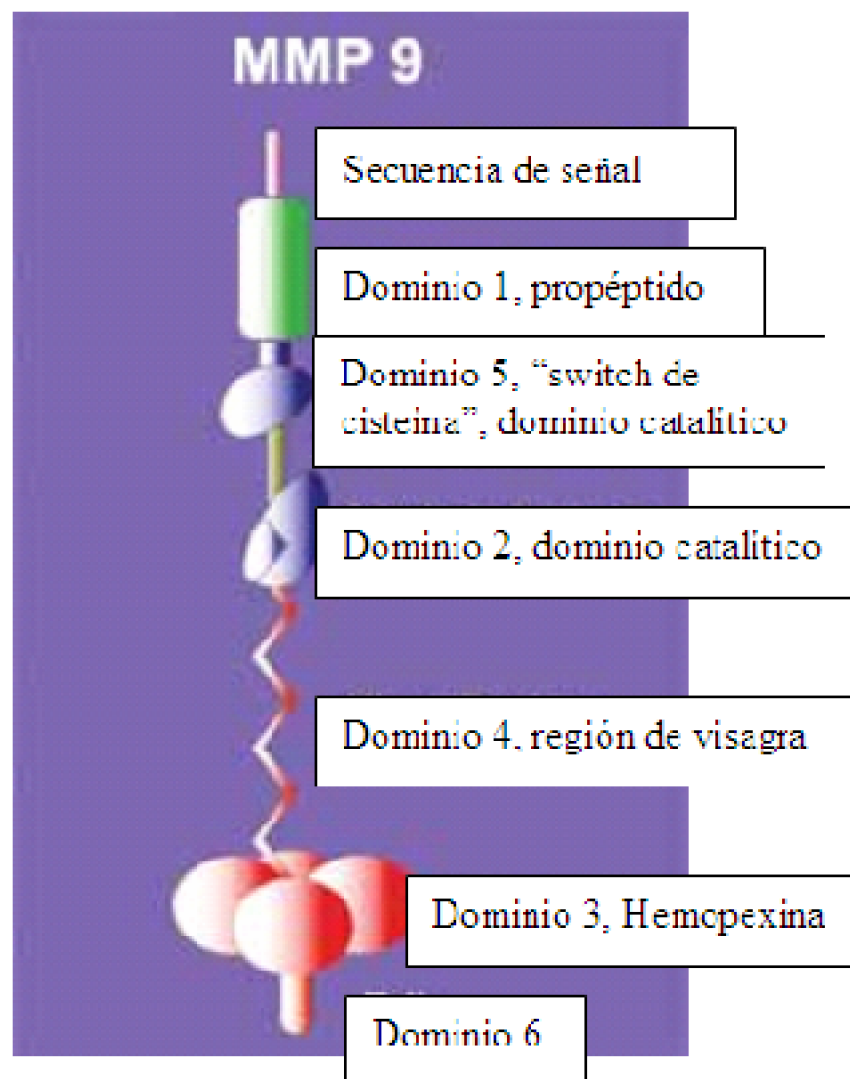


Figura 3: Representación de los distintos dominios de MMP-9.

Dominio 1: es un propéptido de aproximadamente 80 residuos en el cual se encuentra un residuo de cisteína altamente conservado que tiene relación con los estados de latencia de las metaloproteinasas.

- Dominio 2: corresponde al dominio catalítico que posee 3 histidinas altamente conservadas encargadas de la unión al ión metálico zinc y un residuo catalítico de ácido glutámico. Este dominio contiene una región de 160 residuos de aminoácidos que une los iones Ca^{2+} y Zn^{2+} .
- Dominio 3: de la región carboxilo terminal de 200-300 residuos aminoacídicos tipo hemopexina o vitronectina que contiene un puente disulfuro, el que interactúa con los sustratos peptídicos.
- Dominio 4: es una región rica en prolinas que conecta los dominios 2 y 3.
- Dominio 5: lo poseen las enzimas con actividad gelatinolítica donde se une el sustrato gelatina (colágeno desnaturalizado y parcialmente hidrolizado) y que está asociado con el dominio catalítico de la fibronectina.
- En el caso de las enzimas unidas a membrana, este dominio posee una secuencia adicional hacia la región carboxilo terminal que corresponde a una señal para unión a membrana (dominio 6).

Estas MMPs presentan regulación a varios niveles:

- a) Transcripcional: su expresión aumenta por efecto de hormonas, citoquinas y factores de crecimiento celular, agentes químicos como ésteres de forbol, colchicina debido a su efecto sobre las fibras de actina. Por el contrario su expresión disminuye con el TGF- β , ácido retinoico y los glucocorticoides (West-Mays y col., 1995).
- b) Formación de complejos con los TIMPs: los inhibidores titulares endógenos específicos para metaloproteinasas conocidos como TIMPs se unen no covalentemente a las formas activas y/o latentes de MMPs (Docherty y col., 1992, Gómez y col., 1997). Esta unión es a través de 2 residuos de cisteína de los TIMPs. Los TIMPs poseen en su estructura 6 puentes disulfuro (altamente conservados en los distintos TIMPs) que le confieren una alta afinidad hacia metaloproteinasas.
- c) Activación de la forma latente (zimógeno): las MMPs son sintetizadas en forma inactiva y en el medio extracelular se activan por proteólisis limitada por acción de otras MMPs y/o proteasas extracelulares (Mitchell y col., 1996).

Un desequilibrio entre los niveles de las MMPs y los TIMPs es consistente con la rápida degradación de la matriz extracelular (Eigel y col., 2003). Las MMPs y seril proteasas parecen tener relación con la destrucción de tejido en la periodontitis (Ingman y col., 1996). Existe evidencia de que la destrucción de tejido resulta de un desbalance de las metaloproteinasas sobre sus inhibidores titulares más que de una activación de las formas latentes de estas enzimas (Soell y col., 2002).

En algunas enfermedades, como en artritis reumatoídea y osteoartritis donde los niveles de MMPs están por sobre los niveles de sus inhibidores, se observa una degradación del cartílago (Mitchell y col., 1996).

1.6 PATÓGENOS PERIODONTALES Y ENFERMEDAD PERIODONTAL

La periodontitis crónica es una de las enfermedades más comunes que afectan a los seres humanos. Es irreversible y causa la destrucción de las fibras de colágeno en el ligamento periodontal formando un saco periodontal que rompe el sello en torno al diente, provocando inflamación. La patogénesis de la periodontitis está mediada por interacciones entre el hospedero y factores microbiológicos, además de factores de riesgo genéticos y medioambientales (Kantarci & Van Dyke, 2002). Es el resultado de un número finito de especies bacterianas dentro de un complejo biofilm en la superficie subgingival del diente. El proceso destructivo es el resultado de una compleja interacción entre estas bacterias, la inmunidad del hospedero y los sistemas inflamatorios. Las principales bacterias implicadas son anaeróbicas y gram-negativas e incluyen *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*) entre otras (Eley & Cox, 2003). La periodontitis asociada a la bacteria *Aa* produce una toxina que desgranula y lisa neutrófilos humanos (Claesson y col., 2002). La bacteria *Pg* puede alterar la secreción de las enzimas MMPs y causar activación en las células hospedero que conducen a la degradación de tejido (Pattamapun y col., 2003)

Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa contra colonias microbianas infecciosas en biopelículas (Gamonal y col., 2002), siendo éstos atraídos hacia tejido periodontal infectado por bacterias o tejido degradado. Como los neutrófilos, por sí mismos, causan daño al tejido y promueven su propia quimiotaxis, la acumulación de neutrófilos en sitios de inflamación se amplifica rápidamente. Sobre el 90% de leucocitos en el líquido gingival crevicular son neutrófilos (Uitto y col., 2003). Las aberraciones en la función de los neutrófilos pueden llevar a la destrucción y rápida progresión de la enfermedad periodontal debido a que entre las proteínas que secretan, se encuentran la lisozima, la mieloperoxidasa y la lactoferrina, las que actúan directamente sobre los patógenos bacterianos impidiendo su crecimiento (Uitto y col., 2003).

Las bacterias periodontopáticas, *Pg* y *Aa* entre otras, también producen enzimas proteolíticas e hidrolíticas, las que pueden tener participación en la enfermedad periodontal reduciendo la efectividad de la defensa del hospedero o degradando tejido del hospedero. Estas proteasas son capaces de degradar inmunoglobulinas, factores de aglutinamiento, inhibidores de proteinasas y componentes de tejido conectivo del hospedero. Ellas también, secundariamente promueven la degradación de colágeno por activación de pro-colagenasas del hospedero (Eley & Cox, 2003).

En muestras de saliva de pacientes con periodontitis se han realizado mediciones de actividad para gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y colagenasa (MMP-1), observándose aumento de la actividad de estas (Gangbar y col., 1990). En trabajos anteriores de nuestro grupo, se investigó la presencia de MMP-9 en pacientes con periodontitis en fluido gingival crevicular, mediante el uso de zimografía obteniéndose como resultado una

elevada actividad de ambas formas de esta enzima (MMP-9 y pro MMP-9) comparada con muestras tomadas de personas sanas (Teng y col., 1992, Pozo y col., 2005).

1.7 HIPÓTESIS

En la enfermedad periodontal se ha observado que los neutrófilos circulantes son hiper-reactivos, es decir, presentan una mayor respuesta frente a diferentes tipos de estímulos (Fredricksson y col., 2003). Este hecho ha sido también observado en nuestro laboratorio donde, en resultados preliminares de cultivos de sangre completa, se ha observado una mayor secreción de MMP-9 en respuesta a patógenos periodontales (Valenzuela y col., 2003).

En consecuencia, considerando que los neutrófilos poseen una gran variedad de receptores de reconocimiento para patógenos bacterianos, planteamos la siguiente hipótesis:

“Los neutrófilos son activados por patógenos periodontales, respuesta que se manifiesta en un aumento en la secreción de metaloproteinasas, IL-8 y NO. Esta respuesta está aumentada en neutrófilos de pacientes con enfermedad periodontal”.

1.8 OBJETIVO GENERAL

Demostrar si los neutrófilos, en presencia de patógenos periodontales (*Pg* y *Aa*), Zymosan A y LPS, son estimulados a liberar MMPs, IL-8 y NO y si hay diferencias entre los dos grupos estudiados (sujetos sanos o controles y pacientes con periodontitis).

1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la respuesta de neutrófilos presentes en sangre completa de sujetos controles y pacientes con periodontitis frente a patógenos periodontales (*Pg* y *Aa*) y otros estimuladores clásicos (LPS y PHA).

Esta respuesta se evaluará en base a la secreción de MMP-9, IL-8 y presencia de metabolitos estables del NO en un medio de cultivo celular en condiciones de tiempo en que sólo responde la población de neutrófilos.

Comparar la respuesta de los dos grupos estudiados (controles y pacientes) frente a los estimuladores usados en sangre completa.

Determinar la respuesta de neutrófilos aislados de sangre de controles y pacientes frente a patógenos periodontales (*Pg* y *Aa*) y otros estimuladores clásicos (LPS y

Zymosan A). La respuesta se evaluará en forma similar a lo propuesto para sangre completa.

Comparar la respuesta de los neutrófilos purificados de los dos grupos en estudio frente al efecto de los mismos estimuladores antes mencionados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y GRUPO CONTROL

El grupo de estudio estuvo compuesto por pacientes adultos con enfermedad periodontal moderada a avanzada y por sujetos sin enfermedad periodontal. Los participantes con enfermedad periodontal, fueron seleccionados en el Servicio de Atención Primaria de la Universidad de Chile, a cargo del Dr. Jorge Gamonal de la Facultad de Odontología. Esta selección se realizó de acuerdo a criterios de inclusión y exclusión de diagnóstico. El grupo control estuvo compuesto por voluntarios seleccionados de la misma Universidad. A todos los participantes, previo al inicio de la investigación, se les explicó el detalle y propósito de ésta, además de solicitarles su colaboración y un consentimiento informado.

Se registraron los siguientes parámetros a través de una sonda computarizada de tercera generación (Florida Probe):

- Placa bacteriana (IP): presencia v/s ausencia en seis puntos por cada pieza dentaria en boca.
- Sangramiento al sondaje: presencia v/s ausencia en seis puntos por cada pieza dentaria en boca.
- Profundidad de sondaje (PS).

- Niveles de inserción clínicos (NIC)

2.1.1 Criterios de exclusión

Los pacientes que presenten algunas de las siguientes variables fueron excluidos de la investigación :

Patología sistémica, a través del interrogatorio clínico inicial se descartaron las siguientes:

- Fiebre reumática
- Cardiopatía congénita
- Patología renal y/o hepática
- Hipersensibilidad a antibióticos
- Discracia sanguínea
- Terapia con anticoagulantes
- Transplantes y/o uso de inmunosupresores
- Terapia prologada con corticoides
- Historia clínica de cáncer
- Diabetes
- HIV+
- Hospitalizaciones en el último año calendario
- Utilización de antibióticos en los últimos 6 meses
- Con tratamiento periodontal previo

2.1.2 Criterios de inclusión de Periodontitis del adulto

- | | |
|---|----|
| Tener un mínimo de 14 dientes incluyendo 10 dientes posteriores | 1. |
| Tener 5 a 6 dientes con profundidad de saco mayor que 5 mm | 2. |
| No haber recibido tratamiento periodontal | 3. |

2.1.3 Criterios de inclusión del Grupo Control

- | | |
|---|----|
| Pacientes sistemáticamente sanos | 1. |
| Profundidad de sondaje menor a 3 mm | 2. |
| Ausencia de características inflamatorias de la encía o presencia de una inflamación leve | 3. |

Ausencia de evidencia radiográfica de pérdida ósea 4.

Esta selección se realizó de acuerdo a los criterios de inclusión establecidos en Armitage (1999) y actualizados por el comité terapéutico de la Academia de Periodontología de USA.

2.1.4 Severidad de la enfermedad periodontal

La severidad de los pacientes con periodontitis se determinó a través de la interpretación radiográfica y de los niveles clínicos de inserción, definiéndose como:

- i) Incipiente: Pérdida ósea y de inserción clínica menor o igual al 30% de la superficie radicular.
- ii) Moderada: Pérdida ósea y de inserción clínica mayor al 30%, pero no superior al 50% de la superficie radicular.
- iii) Avanzada: Pérdida ósea y de inserción clínica mayor al 50% de la superficie radicular.

2.1.5 Toma de muestra

Las muestras de sangre de pacientes y controles se extrajeron el mismo día del análisis. Los voluntarios fueron citados al Servicio de Atención Primaria de la Universidad de Chile, lugar en el que se les extrajo aproximadamente 15 mL de sangre venosa, por un profesional especializado. La sangre se mantuvo a 4°C en tubo anticoagulante hasta el momento del análisis.

2.2 INCUBACIÓN DE SANGRE COMPLETA

La muestra de sangre de voluntarios humanos sanos y pacientes afectados con periodontitis, se extrajo el día del análisis y se mantuvo en tubo anticoagulante. 1 mL de sangre completa se diluyó con medio de cultivo RPMI-164 con 10% suero fetal bovino preparado de la siguiente manera: 20 mL de suero fetal bovino, 200 µL de gentamicina 5 mg/mL, 2 mL de glutamina, 200 mM, completando 200 mL con medio RPMI-1640. Se utilizó una relación 1:4 (v/v) de muestra:medio RPMI. Se incubó 1 mL a 37°C por una hora. Se agregaron los extractos bacterianos en concentración 1:1000, LPS en concentración 0,8 µg/mL y fitohemaglutinina (PHA) 2 µg/mL. Se incubó por una hora a 37°C. La sangre incubada se centrifugó por 10 minutos a 1200 rpm (centrífuga de sobremesa Heraeus). El sobrenadante se traspasó a nuevos microtubos y se congeló a -20°C para análisis posterior.

2.3 EXTRACTOS BACTERIANOS

2.3.1 Preparación de extractos bacterianos

Los extractos bacterianos de *P. gingivalis* (*Pg*) y *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) fueron aportados por el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, Facultad de Odontología según descrito en la literatura (Loomer y col., 1995). *Aa* (cepa Y4) se hizo crecer en agar de soya tríptico enriquecido y caldo de soya triptona que contiene carbonato de sodio, L-cisteína, hemina y vitamina K. *Pg* (cepa A7A1-28) se cultivó en caldo Todd Hewitt enriquecido y con hidroxianisol butilado que contenía los mismos suplementos antes descritos. Las bacterias fueron cultivadas bajo condiciones anaeróbicas estrictas. Las bacterias fueron muertas al hervir por 10 minutos y luego lavadas 3 veces con PBS. La cantidad de extracto bacteriano se expresó de acuerdo a su contenido de proteína medido por el método de ácido bicinónico. La dilución de los extractos bacterianos se realizó en PBS al 1% (amortiguador de fosfato salino hipotónico, compuesto de 0,15 M NaCl, 12 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ a pH 7,4.).

2.3.2 Detección de proteínas de extractos bacterianos

Se realizó por análisis de proteínas utilizando el kit de Pierce (USA) basado en ácido bicinónico (BCA) que combina la capacidad reductora de Cu²⁺ a Cu⁺ por proteínas, en un medio alcalino, a través de detección colorimétrica (Smith y col., 1985). Se siguieron las instrucciones del fabricante realizando una curva estándar tomando concentraciones de 2 µg/mL a 20 µg/mL en un volumen de muestra de 0,5 mL. Las muestras se mezclaron con 0,5 mL de una solución preparada con 3 mL de solución alcalina con carbonato aportada por el kit, 2,88 mL de solución de BCA y 0,12 mL de solución de sulfato de cobre pentahidratado. Se incubó por media hora a 60°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se registró la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Se determinó la ecuación de la recta de acuerdo a los puntos obtenidos de absorbancia y concentración. Se tomaron concentraciones de los extractos bacterianos de 5, 10 y 20 µL, se completó a un volumen de 0,5 mL con agua destilada y se realizó el análisis de proteínas con BCA por espectrofotometría. De acuerdo a los valores obtenidos de absorbancia y a la curva estándar se determinó la concentración de proteínas en los extractos bacterianos.

2.4 PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos se purificaron siguiendo el protocolo descrito por Rose y col. (1992), según

se describe brevemente a continuación:

Un volumen de 15 mL de sangre anticoagulada, proveniente de individuos sanos y de pacientes, se diluyó en 15 mL de PBS 1% en tubo cónico de 50 mL.

La sangre diluida se colocó cuidadosamente sobre 12 mL de Histopaque 1077 (Sigma Chemical Histopaque. Co. USA) manteniendo una interfase marcada.

El gradiente discontinuo se centrifugó por 30 minutos a 1500 rpm (centrífuga de sobremesa Heraus) a temperatura ambiente, sin aplicar freno.

Se eliminó el sobrenadante del plasma y de Ficoll del tubo, de forma de no romper el sedimento de eritrocitos rico en neutrófilos.

Se diluyó el sedimento de eritrocitos en tubo cónico de 50 mL con un volumen igual de PBS 1%. El volumen final fue de aproximadamente 20 mL. Se agregaron 20 mL de solución de dextrano 3%, al sedimento resuspendido para precipitar los eritrocitos. El dextrano se preparó en NaCl 0,9%. Los eritrocitos sedimentaron a temperatura ambiente aproximadamente a los 20 min.

El sobrenadante, rico en neutrófilos, se removió cuidadosamente y se centrifugó a 1200 rpm (centrífuga de sobremesa Heraus) por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante.

Los eritrocitos contaminantes se lisaron por lisis hipotónica. Primero el sedimento se resuspendió con 10 mL de PBS 0,2% frío de hielo y luego, rápidamente (dentro de 30 s), se agregan 10 mL de PBS 1,6% frío de hielo para reestablecer la isotonicidad.

Para los casos en que la muestra aun contenía eritrocitos, se realizó una nueva lisis. Para esto 1 mL de la muestra se mezcló con 4 mL de amortiguador de lisis (155 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 , 0,1 mM EDTA ajustado a pH 7,4 con HCl). Se dejó 5 minutos en hielo con agitación ocasional. Se centrifugó a 1100 rpm (centrífuga de sobremesa Heraus) por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron golpeando suavemente la punta del tubo. Se lavó con 10 mL de PBS 1%. Se centrifugó a 1100 rpm (centrífuga de sobremesa Heraus) por 5 minutos a 4°C. Se lavó 3 veces más. Los neutrófilos puros se diluyeron en medio RPMI-1640 ó PBS 1%.

2.5 RECUENTO DE NEUTRÓFILOS

Se mezclaron 10 μL de muestra de neutrófilos purificados con 10 μL de azul de Tripán. Se colocaron 10 μL de la mezcla preparada en la cámara para recuento y se observó en microscopio. Se contaron las células brillantes descartando células azules, en caso que aparecieran, ya que correspondían a células muertas. Se tomó un promedio de 2 ó 3 recuadros de la cámara para recuento y se calculó el número de células por mL considerando el factor de dilución utilizado.

2.6 INCUBACIÓN DE NEUTRÓFILOS PURIFICADOS

De acuerdo al recuento celular, se diluyó la muestra de neutrófilos puros con medio RPMI-1640 ó PBS 1% obteniéndose una concentración de 1×10^6 de neutrófilos por mL. Los neutrófilos se incubaron 1 hora con los distintos estimuladores: extractos bacterianos (*Pg* y *Aa*), LPS y Zymosan A utilizando las mismas concentraciones que en la incubación de sangre completa. Los neutrófilos estimulados se centrifugaron por 10 minutos a 1200 rpm (centrífuga de sobremesa Heraeus). El sobrenadante se transfirió a microtubos y se congeló a -20°C para análisis posterior.

2.7 ZIMOGRAFÍA

Las proteínas se identificaron utilizando gel de poliacrilamida SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10% que contiene gelatina (1 mg/mL) (Valenzuela y col., 1999; Pozo et al., 2005).

Se utilizó una dilución de muestras de 1:20. Esta dilución se realizó con amortiguador pH 6,8 sin mercaptoetanol pero con SDS (SDS al 10%, Tris HCl 0,25 M pH 6,8, azul de bromofenol 1,44 mM). El gel se cargó con 5 μL de la muestra diluida. El gel separador y el concentrador se preparó al 10% y al 5% en poliacrilamida respectivamente.

Luego de la electroforesis, el gel se incubó 45 minutos con Triton X-100, 2,5%. Se mantuvo toda la noche (aproximadamente 20 h) para desarrollar la actividad enzimática, a 37°C , con 50 mL de una solución que contenía Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, con CaCl_2 5 mM y NaN_3 3,0 mM. El gel se tiñó con Azul de Coomassie y se destiñó con solución de ácido acético al 10%. La actividad proteolítica se detectó a través de las bandas no teñidas en un fondo azul. Para asignar los tipos de actividad gelatinásica se utilizó un control positivo que incluía una mezcla de MMP-2 y MMP-9 en sus formas latente y activa.

La banda proMMP-9 no está enzimáticamente activa en la muestra, pero estos zimógenos pueden ser detectados por zimografía en gel debido a que el procedimiento los activa. Se encuentra presente una banda adicional a 130 kDa cuando proMMP-9 está presente en gran cantidad. Esta banda de 130 KDa corresponde a la proMMP-9 unida a la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos. Estos geles se escanearon obteniéndose una imagen en blanco y negro. Las bandas gelatinolíticas se cuantificaron usando el software "Uni-Scan-it Gel Automated Digitizing System" y Adobe Photoshop (Adobe Software, Seattle, WA). Los valores de densidad se expresaron como unidades arbitrarias de densidad.

Este análisis se realizó para muestras incubadas de sangre completa y neutrófilos purificados, tanto de pacientes, como de controles.

2.8 DETERMINACIÓN DE NO_2^- Y NO_3^- POR ELECTROFORESIS CAPILAR

El óxido nítrico se determinó indirectamente midiendo sus productos estables: NO_2^- y NO_3^- mediante electroforesis capilar (Friedberg y col., 1997). Se utilizó un equipo de electroforesis capilar Modelo Quanta 4000 (Water Associates, Milford, MA, USA). Las mediciones se efectuaron a 214 nm aplicando un voltaje de 8 kV, lo que produce una corriente aproximada de 180 μA . Se utilizó un capilar de 50 cm de largo efectivo y de 75 μm de diámetro interno. Luego de cada corrida electroforética, el capilar se lavó sucesivamente por 2 minutos con NaOH 0,2 M, agua y amortiguador (electrolito de corrida). El electrolito de corrida de pH 7,4, está constituido por: NaCl 0,24 M, Na_2HPO_4 7,7 mM, NaH_2PO_4 4,17 mM y de polietilenglicol 6000 0,17 mM. Las áreas obtenidas se integraron con el programa "software" Millennium (Waters). Alícuotas de 30 μL de muestra se mezclaron con 60 μL de acetonitrilo y se agitaron en vortex por 30 s. La mezcla se centrifugó por 5 minutos a 13.000g y el sobrenadante se inyectó hidrodinámicamente por 50 s al capilar. Se utilizó un estándar de iones nitrato y nitrito en relación 2:1 para la identificación de señales. Se realizaron análisis para los sobrenadantes de las muestras de sangre completa y neutrófilos purificados.

2.9 DETERMINACIÓN DE IL-8 POR ELISA

Se realizó a través de un kit comercial de BioSource (USA), que consiste en un análisis inmuno-enzimático para mediciones cuantitativas de interleuquina-8 humana en suero, plasma, cultivo celular u otros fluidos biológicos siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 25 y 50 μL de muestra.

2.10 IMMUNO DOT BLOT

Con el objetivo de cuantificar la liberación de la enzima MMP-9, se realizó una prueba de diluciones con distintas concentraciones de muestra y de solución de anticuerpo monoclonal para determinar las condiciones apropiadas de trabajo. Para esto se colocaron las muestras en membrana de nitrocelulosa previamente remojado en solución de TBS-T (Tris HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM y Tween 20 al 0,1%). Estas membranas se incubaron por 4 horas en solución 12% de leche en polvo descremada disuelta en TBS-T. Se utilizó posteriormente una solución de TBS-T con leche al 6% para las distintas soluciones de un anticuerpo monoclonal antiMMP-9 de ratón. Una de las muestras se incubó sin el primer anticuerpo. Se incubó durante toda la noche con

agitación rotatoria suave en la cámara fría. Las membranas con anticuerpo se lavaron con TBS-T en un volumen mínimo de 4 veces el tamaño de la membrana. El lavado se realizó 4 veces por 15 minutos cada vez. El segundo anticuerpo se diluyó 1:10.000 en leche 6% preparada con TBS-Tween 0,2%. Las membranas se dejaron incubar con el segundo anticuerpo por 1 hora con agitación. Se lavó 4 veces por 10 minutos cada vez con TBS-Tween 0,2%. Se realizó el revelado usando quimioluminiscencia con los sustratos para la peroxidasa, H_2O_2 y luminol (Supersignal, West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce, USA) por 5 minutos. Luego se colocaron las membranas sobre una hoja de película Kodak (BioMax) por 1 hora y se reveló utilizando líquidos de revelado fotográfico.

2.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de pacientes y controles presentaron una distribución relativamente normal para metaloproteinasas. Para los análisis de IL-8 se obtuvieron datos que presentaban una amplia dispersión, lo que requirió de la normalización de datos a través de la función logaritmo. Se utilizó SPSS versión 8.0 de software estadístico. Para el análisis estadístico entre las poblaciones de muestras controles y de muestras patológicas, tanto de sangre completa como de neutrófilos purificados, se utilizó la prueba t de student de muestras independientes. Se consideró un nivel estadísticamente significativo con $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 GRUPO DE SUJETOS SELECCIONADOS

Los análisis de sangre completa se realizaron en 13 pacientes adultos, enumerados del 1 al 13 en la **Tabla 1**, que habían sido diagnosticados con periodontitis crónica (PC) o avanzada (PA). Para la preparación de neutrófilos purificados se obtuvo sangre de 10 pacientes adultos, enumerados del 14 al 23 en la misma **Tabla 1**, que habían sido diagnosticados con periodontitis crónica (PC), periodontitis agresiva generalizada (PAG) o periodontitis agresiva localizada (PAL). Los valores de los parámetros clínicos de los pacientes son considerablemente más altos de lo que se espera para un grupo control. Los individuos sanos tienen índice de placa menores a 30, el sangramiento es menor de 4%, la profundidad de saco (bolsillo) es menor de 3 mm y el nivel de inserción clínico es 0.

3.2 RECUENTO DE NEUTRÓFILOS

En individuos sanos se obtuvo un recuento celular promedio de 1.920.000 células/mL,

con una desviación estándar de 0,95 millones; en pacientes con enfermedad periodontal se obtuvo un recuento celular promedio de 2.940.000 células/mL, con una desviación estándar de 1,53 millones. Se espera que un individuo normal tenga aproximadamente entre 2.500.000 y 5.000.000 de neutrófilos por mL.

Tabla 1 Datos clínicos de los pacientes

Paciente N°	Diagnóstico	Edad (años)	Sexo	IP (%)	Sangramiento (%)	PS (mm)	NIC (mm)
1	PA	24	F	56,00	34,06	2,56	2,62
2	PA	26	F	35,90	50,60	3,11	3,19
3	PA	28	F	53,88	33,33	2,17	1,54
4	PA	32	M	61,53	50,64	4,05	3,80
5	PA	31	F	56,66	35,18	3,80	3,20
6	PA	34	F	64,54	44,79	4,40	4,20
7	PC	46	F	38,60	30,70	2,33	3,31
8	PC	51	F	32,35	22,05	2,62	4,46
9	PC	48	M	36,60	12,60	2,78	3,30
10	PC	45	F	54,44	43,21	3,34	3,65
11	PC	44	F	76,54	68,75	3,80	3,00
12	PC	37	F	94,04	89,28	3,40	3,00
13	PC	41	F	68,88	62,22	3,60	2,80
14	PC	40	M	66,00	78,00	3,64	3,42
15	PC	35	F	74,00	44,66	3,42	2,84
16	PC	44	F	64,00	44,00	3,12	3,44
17	PC	28	F	84,25	81,48	3,20	2,90
18	PAG	32	F	31,53	50,64	4,05	3,80
19	PAL	24	M	100,00	88,66	3,40	3,24
20	PAL	25	F	45,61	35,89	3,40	3,66
21	PAL	26	M	54,24	62,44	3,44	3,24
22	PC	45	F	88,09	75,00	3,66	3,84
23	PC	58	M	73,20	55,00	3,23	3,46
Promedio		36,70		61,34	51,88	3,33	3,30
D. E.		9,71		15,53	20,98	0,56	0,59

IP: Índice de placa PS: Profundidad de saco NIC: Nivel de inserción clínico D. E.: Desviación estándar

El menor número de neutrófilos obtenido experimentalmente se debe posiblemente a que hay pérdida de células en los distintos pasos del procedimiento de purificación, especialmente en la etapa final por lisis. Es interesante notar que el promedio de recuento celular de los casos patológicos es un 53% mayor que el promedio de recuento celular de las personas sanas. Esto se debe, probablemente, a que las personas enfermas producen y reclutan mayor cantidad de neutrófilos para defenderse de la infección.

3.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD METALOPROTEINÁSICA

En este trabajo se propuso estudiar el efecto estimulador de extractos bacterianos: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, LPS, fitohemaglutinina y Zymosan A sobre neutrófilos de individuos controles y pacientes con periodontitis utilizando 2 tipos de muestras: sangre completa y neutrófilos purificados. En el primer caso, que consiste en una población heterogénea de leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos), las condiciones de incubación y tiempo de estimulación, permite que la secreción sea principalmente de los gránulos de neutrófilos.

Los sobrenadantes de las muestras incubadas se diluyeron con amortiguador nativo utilizado según método de zimografía (sección 2.7). El análisis de zimografía se realizó inicialmente cargando los geles con volúmenes de muestra de entre 5 y 15 μL , junto con diluciones entre 1:20 y 1:50. Se encontró que con una dilución de 1:20 y aplicación de 5 μL se observaba una mayor linealidad en la respuesta gelatinolítica. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

De acuerdo a referencias de la literatura y a trabajos previos efectuados en nuestro Laboratorio, la concentración utilizada de LPS fue inicialmente de 50 ng/mL. En análisis posteriores se aumentó esta concentración hasta llegar a 0,8 $\mu\text{g/mL}$ debido a que se observó un mayor efecto de actividad gelatinásica sin cambios en la viabilidad celular. El tiempo utilizado para la incubación de muestras de sangre completa y neutrófilos, se estableció en una hora debido a que en la literatura, se reporta secreción de MMP-9 a partir de los 20 minutos. En una hora se demuestra que la actividad gelatinásica es completa (Pugin y col., 1999). El período de incubación de monocitos tratados con LPS debe ser mayor a 7 h para que empiece la secreción de MMP-9. La secreción es máxima después de 24 a 48 h, aunque con señales menos intensas que las de neutrófilos (Pugin y col., 1999). La rápida secreción de proMMP-9 por parte de los neutrófilos sugiere que la enzima está almacenada en los gránulos de neutrófilos y no es el resultado de síntesis *de novo* de proteínas.

En la **Figura 4** se muestra un patrón de actividad gelatinásica similar en sangre completa y neutrófilos. En ambos casos se observan las bandas correspondientes a proMMP-2 (72 kDa), proMMP-9 (92 kDa), complejo proMMP-9 asociado a lipocalina (130 kDa) y un dímero de proMMP-9 (sobre 200 kDa).

De estas bandas gelatinásicas se descartó que la proMMP-2 fuera liberada desde las muestras de sangre completa o neutrófilos purificados, porque al aplicar el medio RPMI-1640 con suero fetal bovino se observaba una banda de similar intensidad.

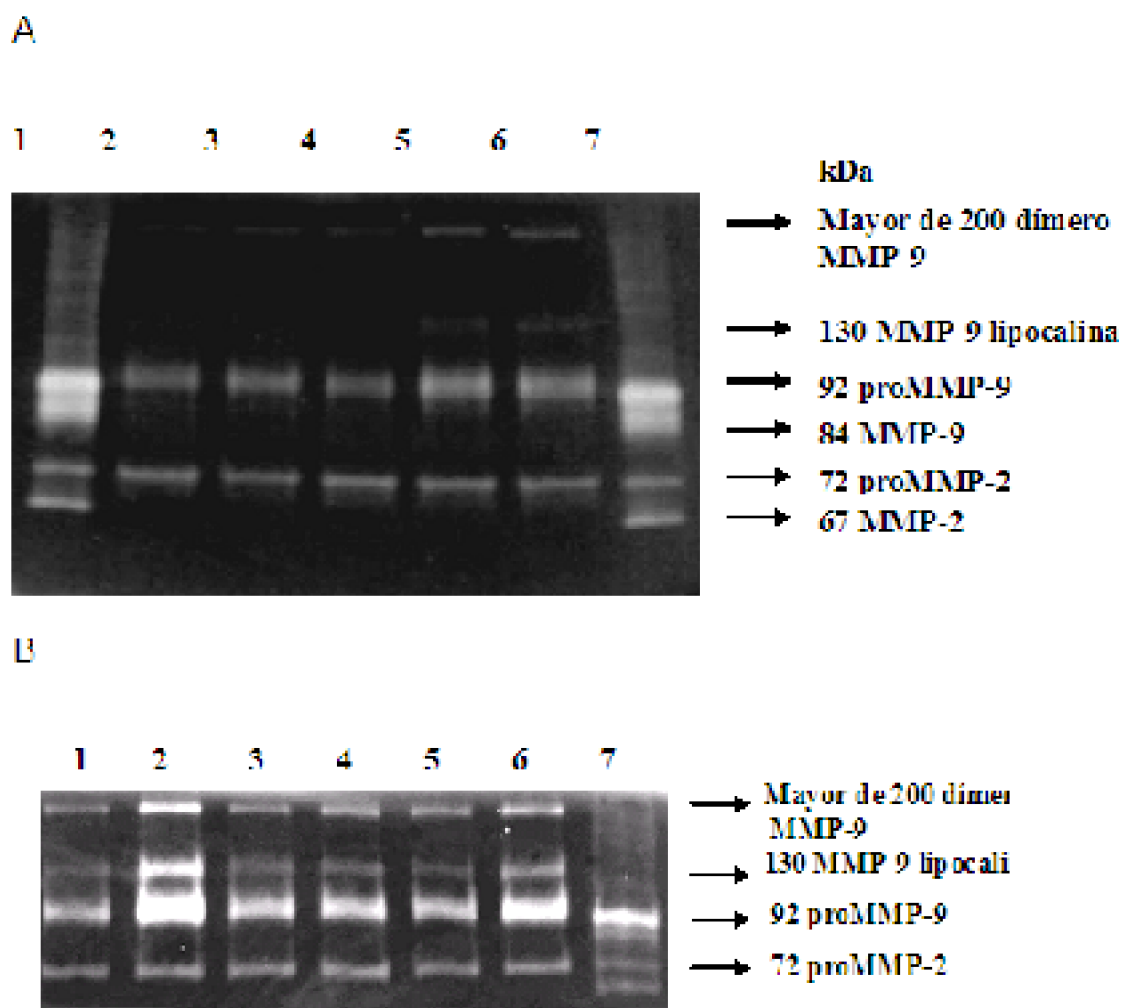


Figura 4: Actividad gelatinásica de muestras de sangre completa y neutrófilos en presencia y ausencia de estimuladores. (A) Sangre completa, (B) Neutrófilos purificados. En el gel A en los carriles 1 y 7 se aplicó control positivo (MMP-2/MMP-9), carril 2: muestra sin estimular, carril 3: muestra + PHA, carril 4: muestra + Pg, carril 5: muestra + Aa, carril 6: muestra + LPS. En el gel B en el carril 1: muestra sin estimular, carril 2: muestra + LPS, carril 3: muestra + Pg, carril 4: muestra + Aa, carril 5: muestra + (Pg+Aa), carril 6: muestra + Z, carril 7: control positivo (MMP-2/MMP-9), Z = Zymosan A.

Al comparar las intensidades relativas de proMMP-9, complejo proMMP-9 asociado a lipocalina y el dímero de proMMP-9, se encontró que las muestras de neutrófilos purificados liberaban una mayor proporción de estas dos últimas.

3.3.1 Análisis de la secreción de metaloproteinasas en sangre completa

A través de densitometría de la banda proMMP-9, se estableció la relación entre la condición estimulada y la condición basal (sin estimular) [MMPasa(e)/MMPasa(b)]. En la **Figura 5A** se muestra el efecto de los estimuladores para actividad gelatinásica. Los rangos observados en todos los casos son similares, siendo el estimulador LPS el que presenta una mayor variación en el grupo de pacientes.

Para establecer si hay diferencias en la respuesta de las muestras de controles o de pacientes, frente a la estimulación, se hizo un análisis estadístico de valores de MMPasa(e)/MMPasa(b) (test t de Student pareado, considerando 2 colas usando el software SPSS 8,0). Realizando un análisis estadístico dentro de un mismo grupo, se encontró que sólo PHA producía un efecto estimulador significativo ($P < 0,05$) respecto a los correspondientes valores basales, tanto en el grupo control, como en el patológico.

En la **Figura 5B** se representan los valores promedio de la relación de estimulación con el error estándar medio de ambos grupos, con los estimuladores estudiados. Al comparar las poblaciones entre pacientes y controles, no se encontró diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las condiciones utilizando el test t de Student para muestras independientes considerando distribución normal.

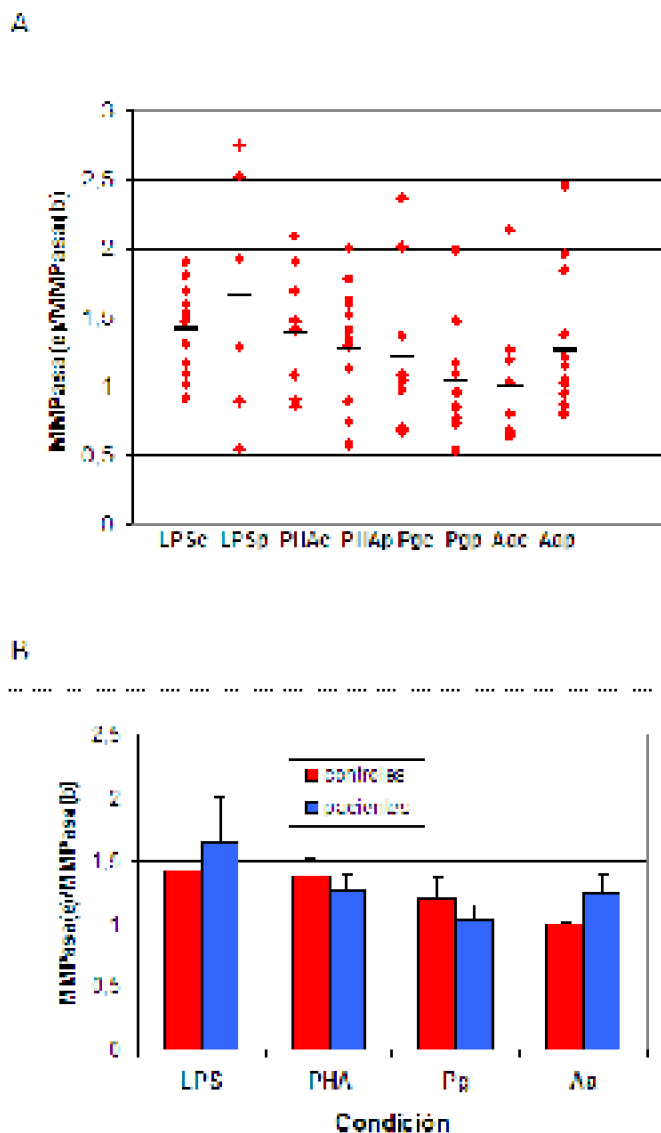


Figura 5: Efecto de diversos estimuladores sobre la secreción de MMPase en sangre completa de controles y pacientes.

Los resultados se expresan como la relación: secreción de MMPase estimulada/secreción MMPase basal: \square MMPase(e)/MMPase(b) \square . LPS = 0,8 μ g/mL, PHA = 2 μ g/mL, Pg = 0,359 μ g/mL, Aa = 0,070 μ g/mL. A) Datos obtenidos con las distintas muestras expresados como la relación MMPase(e)/MMPase(b). LPSc = LPS de controles, LPSp = LPS de pacientes, PHAc = PHA de controles, PHAp = PHA de pacientes, Pgc = Pg de controles, Pgp = Pg de pacientes, Aac = Aa de controles, Aap = Aa de pacientes. B) Comparación de la relación MMPase(e)/MMPase(b) entre los dos grupos. Los datos corresponden a los promedios \pm error estándar.

3.3.2 Análisis de la secreción de metaloproteinasas en neutrófilos purificados

En las muestras de neutrófilos purificados no se utilizó PHA, y en cambio, se incluyó Zymosan A que es un estimulador más clásico que el PHA (Hayashi y col. 2003). En la **Figura 6A** se muestra el efecto de estimuladores considerando la condición estimulada con respecto a la condición sin estimular, en cuanto a la liberación de la metaloproteinasa proMMP-9. En esta **Figura 6A** se aprecia que, en todos los casos existe una distribución de datos más amplia en los pacientes que en los controles. El hecho de que se aprecie una diferencia notoria en el rango de actividad gelatinásica de pacientes con respecto a controles, establece una diferencia con este mismo análisis en sangre completa (**Figura 5A**). Al comparar dentro de un mismo grupo la liberación de proMMP-9 en la condición estimulada respecto a la sin estimular, sólo en la población de neutrófilos de pacientes se encontraron diferencias significativas con LPS y Pg. Esto también constituye una diferencia con sangre completa.

La **Figura 6B** muestra los valores promedio con el error estándar medio de controles y de pacientes de las relaciones de la condición estimulada, con respecto a la condición sin estimular de la proMMP-9. En este caso se observó un aumento notorio del promedio del efecto estimulador de los pacientes en todas las condiciones, con respecto a controles, con excepción de Aa. La adición de una concentración 10 veces mayor de extracto de Aa no varió los resultados.

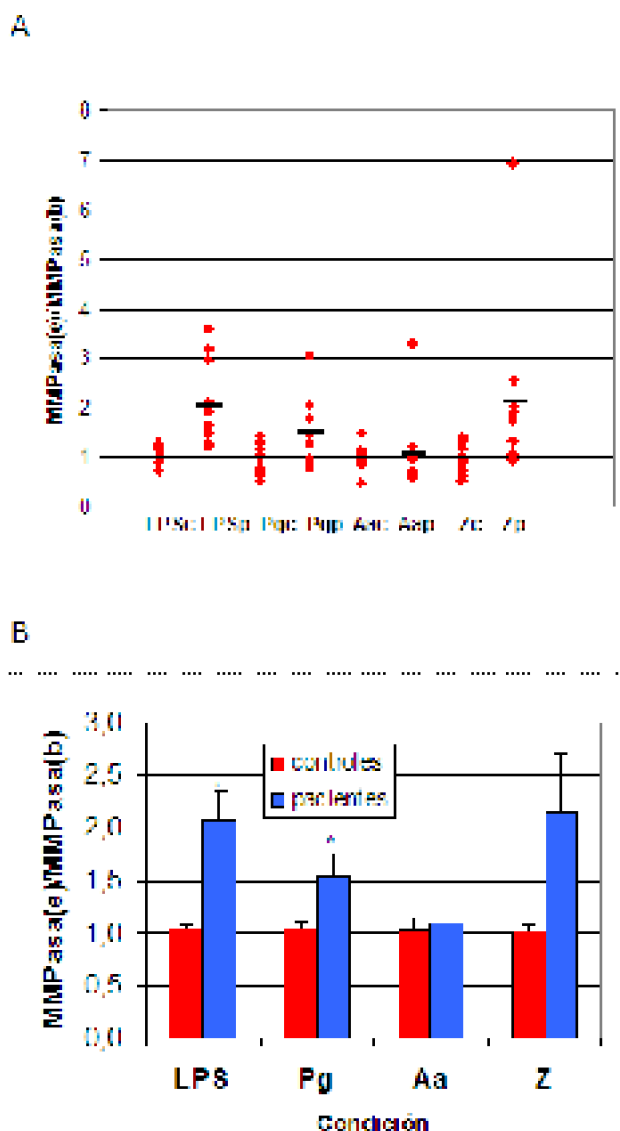


Figura 6: Efecto de diversos estimuladores sobre la secreción de MMPasa en neutrófilos purificados de controles y pacientes.

Los resultados se expresan como la relación: secreción de MMPasa estimulada/secreción MMPasa basal: \square MMPasa(e)/MMPasa(b) \square . LPS = 0,8 μ g/mL, Pg = 0,359 μ g/mL, Aa = 0,070 μ g/mL, Z = 100 μ g/mL. A) Datos obtenidos con las distintas muestras expresados como la relación MMPasa(e)/MMPasa(b). LPSc = LPS de controles, LPSp = LPS de pacientes, PHAc = PHA de controles, PHAp = PHA de pacientes, Pgc = Pg de controles, Pgp = Pg de pacientes, Aac = Aa de controles, Aap = Aa de pacientes. B) Comparación de la relación MMPasa(e)/MMPasa(b) entre los dos grupos. Los datos corresponden a los promedios \pm error estándar.

De acuerdo al test t de Student, al comparar las poblaciones de pacientes y controles entre sí, se encontraron diferencias estadísticamente significativas por efecto de incubación con LPS y Pg. El promedio de estimulación por Zymosan A, no obstante se ve elevado, no alcanzó una significancia estadística (P = 0,074). En este mismo estudio en sangre completa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para

ningún estimulador. Otra diferencia es que el error estándar observado con neutrófilos es considerablemente menor en controles que en pacientes.

Al analizar en conjunto la banda proMMP-9 con el complejo proMMP-9 asociado a lipocalina, el análisis estadístico dentro de un mismo grupo, mostró diferencias estadísticamente significativas respecto de la condición basal sólo para las muestras de pacientes estimuladas con LPS. Igualmente, sólo con LPS se encontró diferencia significativa entre grupos de controles y pacientes. La integración del área de esta banda complejada de proMMP-9 mostró ser muy irregular, lo que probablemente explica porqué se encuentran menores diferencias significativas debido al mayor error observado. En consecuencia es más adecuado medir solamente la secreción de la banda correspondiente a la proMMP-9 de 92 kDa.

3.3.3 Comparación de actividad metaloproteinásica basal (sin estimular) de pacientes y controles

El análisis zimográfico depende de varios factores, por lo que sólo tiene efecto comparativo para las muestras dentro de un mismo gel. Por esto se realizó un análisis de todas las muestras en las condiciones basales en un mismo gel (muestras basales de controles y pacientes). En la mayoría de los casos se obtuvieron valores similares al cuantificar la banda correspondiente a proMMP-9. El promedio de todos los casos analizados de pacientes fue de 24392 ± 8494 expresado en unidades arbitrarias (píxeles) con un rango de: 13767-41404.

Para el caso de controles el promedio fue de 34962 ± 23921 con un rango de 9484-78380. No se encontraron diferencias significativas entre muestras basales de paciente y controles.

3.4 DETERMINACIÓN DE IL-8

Otro de los mediadores de activación de los neutrófilos es la IL-8, que se espera podría aumentar su secreción por efecto de los estimuladores. En este caso también se utilizaron los sobrenadantes de las muestras incubadas de sangre completa y neutrófilos, cuantificando IL-8 por ELISA.

3.4.1 Análisis de secreción de IL-8 en sangre completa

Se presentan los valores de IL-8 de cada una de las muestras de 7 pacientes y de 5 controles, expresados en pg/mL en la **Tabla 2**. Se observa un gran intervalo de liberación de IL-8, debido a las considerables variaciones individuales en la liberación basal de citoquinas.

Tabla 2 Niveles de IL-8 secretados en ausencia y presencia de distintos estimuladores en las muestras de

sangre completa de controles y pacientes.

Controles	01	02	03	04	05		
basal	84,2	236,4	3,9	350,3	236,1		
LPS	248,1	289,7	131,7	319,4	416,9		
Pg	198,3	227,5	50,6	458,1	332,2		
Aa	183,6	262,5	78,3	447,8	302,5		
Z	176,4	242,5	161,7	380	270,3		
Pacientes	1	2	3	4	5	6	7
basal	1,7	3,4	15	45,6	1	91,9	1
PHA	11	138,1	212,2	100,8	3,4	363,9	9,9
LPS	-	68,6	140,8	-	13	209,7	-
Pg	4,4	53,6	134,7	110,6	5,4	300,3	150,3
Aa	53,1	66,1	141,4	141,4	12,2	254,4	158,9

PHA = 2 µg/mL, LPS = 0,8 µg/mL, Pg = 0,359 µg/mL, Aa = 0,070 µg/mL, Z = 100 µg/mL. Los resultados se expresan en pg/mL. (-): condición de estimulación no ensayada

Por disponibilidad de muestra solamente se compararon las condiciones con LPS, Pg y Aa. En la **Tabla 3** se puede apreciar que el promedio de las muestras estimuladas de pacientes con respecto al valor basal, es mayor que el promedio de las muestras estimuladas de controles con respecto al basal.

Tabla 3 Efecto de estimuladores sobre la secreción IL-8 de controles y pacientes en sangre completa.

Estimulador	Número de muestras	Promedio IL8(e)	Rango IL8(e)/IL-8(b)	Desviación estándar
LPS controles	5	8,14	0,9-33,8	14,4
LPS pacientes	4	11,23	2,3-20,2	7,5
Pg controles	5	3,82	1,0-13,0	5,2
Pg pacientes	7	26,98	2,4-150,3	54,6
Aa controles	5	5,2	1,1-20,1	8,3
Aa pacientes	7	33,86	2,8-158,9	56,0

Se considera la relación del valor estimulado con respecto al valor basal: [IL-8(e)/IL-8(b)].

Los análisis de IL-8 de sangre completa entregaron rangos muy amplios y una desviación estándar también muy grande (**Tabla 3**). Se estableció una comparación estadística tomando en cuenta la población de pacientes y de controles por separado, considerando el valor estimulado con respecto al valor basal. Para esto se requirió la normalización de datos a través de la función logaritmo. Se encontró diferencias estadísticamente significativas para LPS y Pgsólo en el grupo de pacientes.

Al comparar ambas poblaciones entre sí (controles y pacientes), no se encontró diferencia significativa con ninguno de los estimuladores utilizados.

3.4.2 Análisis de la secreción de IL-8 en neutrófilos purificados

Se presentan los valores de IL-8 en cada una de las muestras de 10 pacientes y 8 controles, expresados en pg/mL en la **Tabla 4**. Se observa que existe un rango mucho mayor de liberación de IL-8 en controles con respecto a pacientes.

Tabla 4 Niveles de IL-8 secretados en ausencia y presencia de distintos estimuladores en las muestras de neutrófilos purificados de controles y pacientes

Controles	01	02	03	04	05	06	07	08		
Basal	155,4	79,8	95,6	2020,4	462,6	375,4	1652	1603,3		
LPS	264,9	52,8	202,4	1979,6	692,9	479	1705,9	1594,1		
Pg	144,9	59,7	115,3	2045,4	460,6	349,2	1475,7	1308,6		
Aa	142,6	17,5	174,2	2080,3	560	279,8	1640,8	1491,4		
Z	335,7	-	-	1902	974,8	462,9	1480,9	1669,7		
Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Basal	19,2	24,6	19,1	8,5	453,2	7,1	11,5	4,5	332,3	118,8
LPS	236,8	122,6	225,8	77,4	660,9	103,9	84,6	15,4	710,5	267,2
Pg	221,9	100,6	89,1	11,3	636,3	3,4	13,2	10,8	264,9	150,1
Aa	264,5	23,7	117,3	12,3	598,4	5,4	12,8	11	413,7	195,4
Z	129	20,8	126,2	60,1	594	14,5	157,4	13,9	639,5	186,1

. LPS = 0,8 µg/mL, Pg = 0,359 µg/mL, Aa = 0,070 µg/mL, Z = 100 µg/mL. Los resultados se expresan en pg/mL. (-): condición de estimulación no ensayada

El análisis estadístico requirió la normalización de los datos a través de la función logaritmo. Al comparar la respuesta dentro de un mismo grupo frente a los estimuladores usados, se encontraron sólo diferencias significativas en la concentración de IL-8 liberada en el grupo de pacientes al ser estimulados con LPS y Zymosan A.

En la **Figura 7** se muestran los valores promedio de las concentraciones de IL-8 (pg/mL) con el error estándar medio de controles y pacientes en las condiciones sin estimular y con los distintos compuestos en estudio. Al efectuar una comparación de la concentración de IL-8 liberada entre las dos poblaciones (controles y pacientes), se encontró diferencias significativas con todos los estimuladores, con excepción de LPS (**Figura 7**) ($p = 0,054$).

Con el objeto de apreciar el efecto estimulador, los datos se expresaron también como la relación de la muestra estimulada con respecto al valor basal (IL-8(e)/IL-8(b)) (**Figura 8A**). En la **Figura 8B** se demuestra que se puede obtener una distribución normal al aplicar la función logaritmo a los valores obtenidos de IL-8(e)/IL-8(b) y, con esto, se puede utilizar el test t de Student para la determinación de diferencias estadísticamente significativas. En la **Figura 9** se establece una comparación del efecto estimulador de controles y pacientes, considerando el promedio de cada estimulador con respecto a su

valor basal y el error estándar medio.

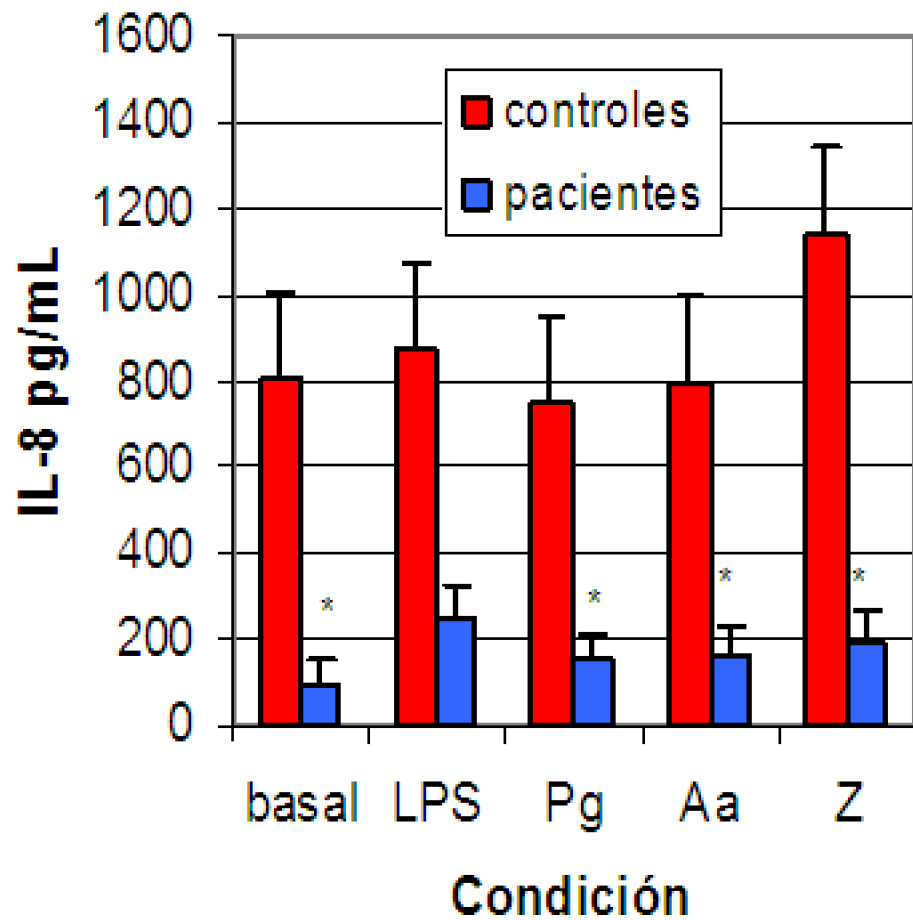


Figura 7: Valores promedio de los niveles de IL-8 en ausencia y presencia de distintos estimuladores de controles y pacientes en neutrófilos purificados.

Los valores corresponden a los promedios en pg/mL \pm error estándar. *: P < 0,05 entre grupos de pacientes y controles

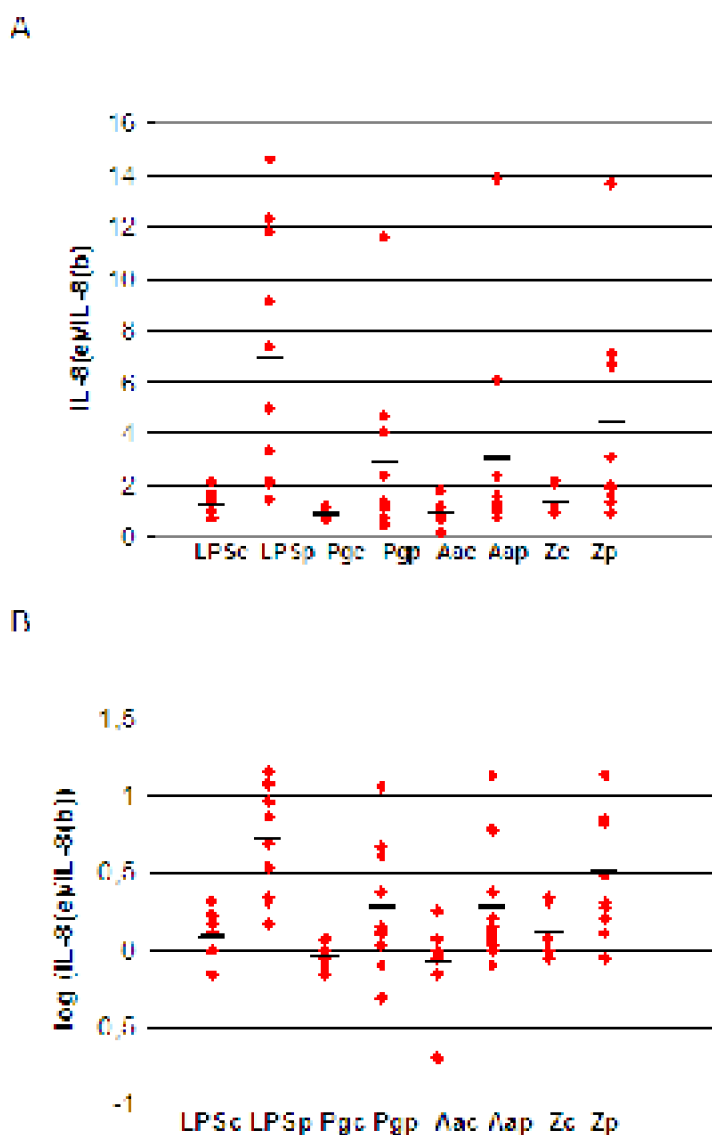


Figura 8: Efecto de diversos estimuladores sobre la secreción de IL-8 en controles y pacientes de neutrófilos purificados.

Se considera la relación del valor estimulado con respecto al valor basal (IL-8(e)/IL-8(b)) LPSc = LPS de controles, LPSp = LPS de pacientes, Pgc = *Pg* de controles, Pgp = *Pg* de pacientes, Aac = *Aa* de controles, Aap = *Aa* de pacientes, Zc = *Z* de controles, Zp = *Z* de pacientes. A) Datos obtenidos con las distintas muestras expresados como la relación IL-8(e)/IL-8(b). B) Datos obtenidos con las distintas muestras expresados como la relación \log IL-8(e)/IL-8(b)

Considerando el efecto estimulador de estos compuestos dentro de un mismo grupo se encontró diferencias estadísticamente significativas en las muestras de la población de pacientes estimulados con LPS y Zymosan, al igual que en el caso del análisis de los datos expresados en concentración.

Al efectuar una comparación entre las poblaciones de controles y pacientes, se encontró diferencias significativas con todos los estimuladores.

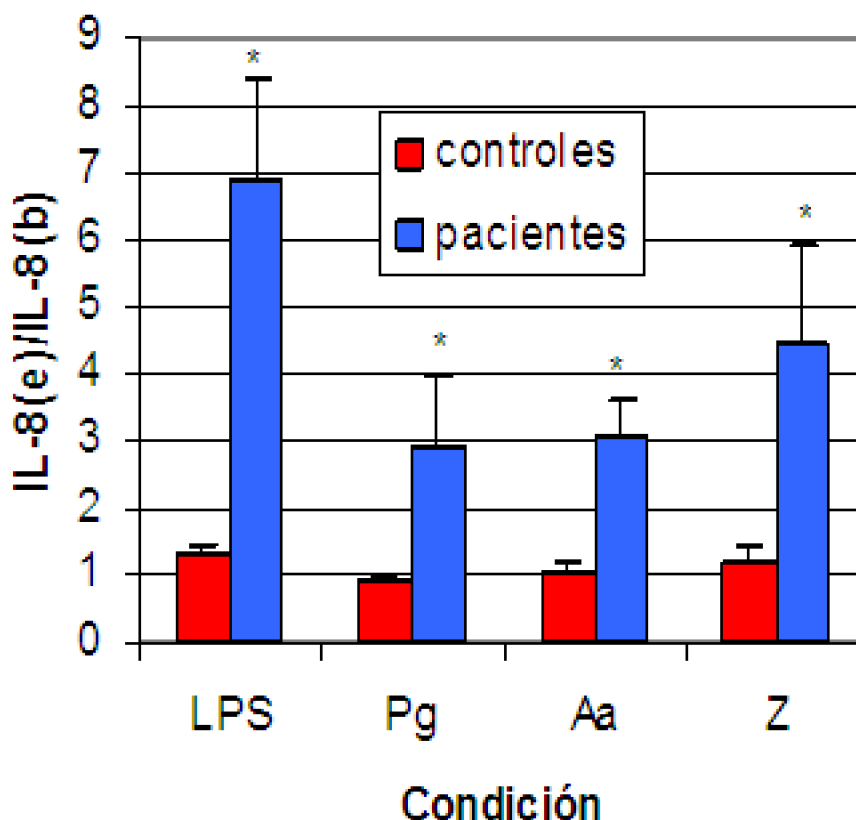


Figura 9: Efecto de diversos estimuladores sobre la secreción de IL-8 en neutrófilos purificados, de controles y pacientes.

Los valores corresponden a la relación IL-8(e)/IL-8(b) en promedio \pm error estándar.
 *: P < 0,05 entre grupos de pacientes y controles

3.5 DETERMINACIÓN DE OXIDO NITRICO

Los sobrenadantes de las muestras incubadas de sangre completa y neutrófilos purificados con RPMI se utilizaron en la determinación de los metabolitos estables del NO utilizando electroforesis capilar. Se esperaba observar las señales de nitrito y nitrato, que corresponden a los productos estables del NO. Al trabajar con los cultivos en medio RPMI sólo apareció la señal correspondiente a ión nitrato en cantidad apreciable. Al efectuar la electroforesis del medio solo, se encontró una gran interferencia por la presencia de nitrato en dicho medio (**Figura 10**), por lo que con estas muestras no pudo determinarse estos metabolitos del NO. Por esto se intentó realizar cultivos utilizando sólo PBS al 1% el cual no presentaba bandas de estos metabolitos del NO. Sin embargo, la serie de muestras analizadas mostró la presencia de cantidades de nitrato casi dentro del límite de sensibilidad del método (0,1 nmol/mL), lo que dificultó seriamente la determinación de cambios de NO.

3.6 COMPARACIÓN DE SECRECIÓN DE MMPs EN MEDIO RPMI Y PBS

Con el propósito de determinar si había diferencia en la potencialidad de secreción de los neutrófilos en los medios RPMI y PBS, se estudió la liberación de proMMP-9 en un control (C) y cuatro pacientes (P) (**Tabla 5**). Se observa en la **Tabla 5** que, en general, hay un mayor grado de estimulación utilizando medio RPMI para incubación de muestras comparado con PBS al 1%.

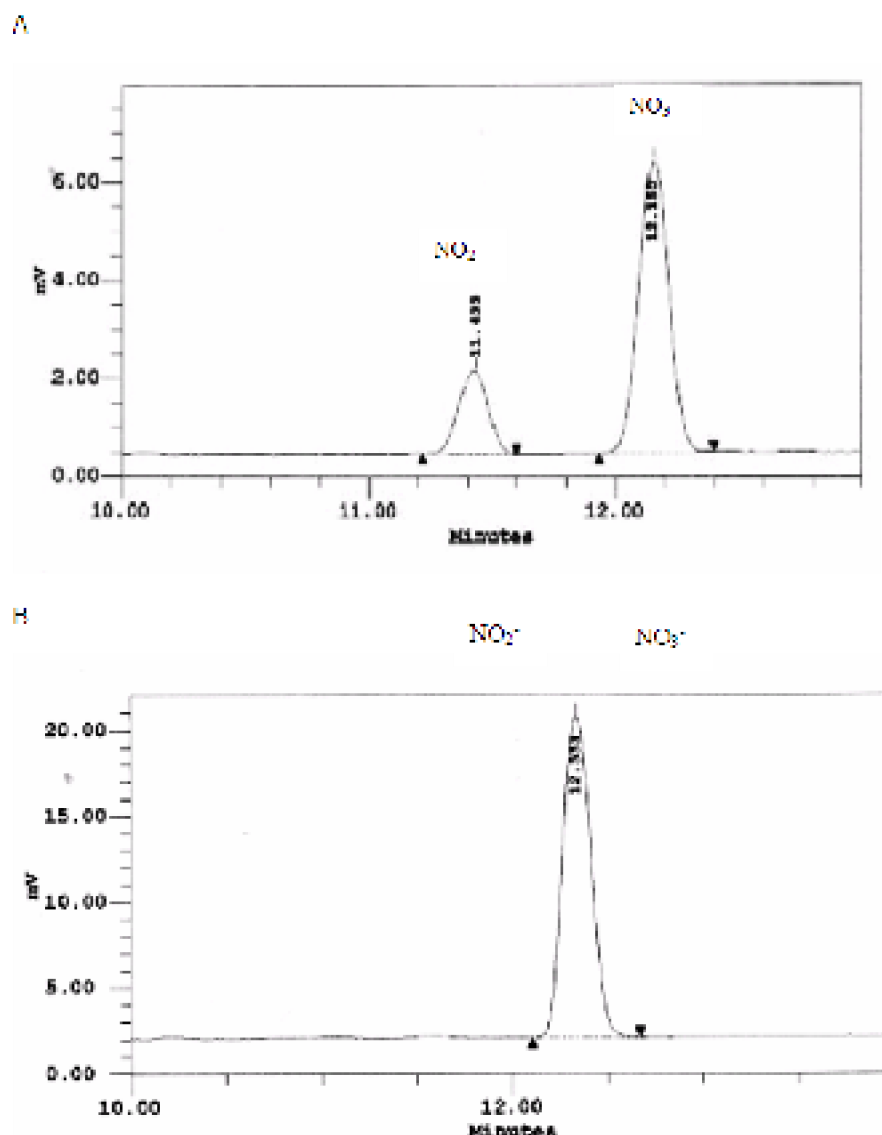


Figura 10: Señales de nitrito y nitrato por electroforesis capilar.

A) Estándares, nitrito: 2 nmol/mL, nitrato: 6 nmol/mL. B) Medio de incubación RPMI-1640, valor calculado 20 nmol/mL. El número señalado en cada banda

corresponde al tiempo de elución.

Tabla 5 Comparación de la relación MMPasa(e)/MMPasa(b) de muestras de neutrófilos purificados, diluidas ya sea en PBS 1% ó en RPMI para distintos estimuladores

	LPS (C)	LPS (P 1)	LPS (P 2)	LPS (P 3)	LPS (P 4)
PBS 1%	1,38	0,82	1,22	1,22	0.68
RPMI	0,98	2,97	1,29	1,5	1.23
	Pg (C)	Pg (P 1)	Pg (P 2)	Pg (P 3)	Pg (P 4)
PBS 1%	0,86	1,17	0,86	0,5	0.77
RPMI	1,34	2,07	1,79	1,48	1.00
	Z (P 1)	Z (P 2)	Z (P 4)		
PBS 1%	1,96	1,19	0.92		
RPMI	2,57	1,08	0.95		

C: Control P: Pacientes

3.7 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE MMP-9 POR IMMUNO DOT BLOT

Al observar un aumento de liberación de MMP-9 por zimografía pareció importante determinar si se debe a un aumento de la cantidad de enzima, por lo que se intentó cuantificar por inmunoanálisis. Lamentablemente no se observaron señales para ninguna de las diluciones de muestra utilizadas (2-10 μ L) a las distintas concentraciones de anticuerpo monoclonal antiMMP-9 (dil. 1:50-1:3000) que reconoce a las formas activas y latentes de MMP-9. Se intentó además, realizar una amplificación de señal con un tercer anticuerpo antiIgG (anticuerpo contra el primer anticuerpo que es monoclonal sin estar conjugado), pero tampoco se obtuvo un buen resultado.

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se propuso demostrar si los neutrófilos sanguíneos periféricos en presencia de: patógenos periodontales, *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, de los agonistas de TLR, Zymosan A y LPS y de la lectina fitohemaglutinina, eran estimulados a liberar metaloproteinasas, óxido nítrico e IL-8. Para esto se realizó una comparación en sangre completa y neutrófilos purificados de pacientes con enfermedad periodontal y controles normales. Como resultado del trabajo, se obtuvo que los neutrófilos de pacientes tienen una mayor respuesta que los neutrófilos de individuos normales en cuanto a la liberación de proMMP-9 e IL-8. Si bien este punto es claro con respecto a la secreción de la MMP-9, en el caso de la IL-8, el proceso inflamatorio desarrollado en la periodontitis atenúa parcialmente la producción de IL-8 de los neutrófilos de los pacientes en relación a los controles. Sin embargo, los neutrófilos de pacientes mantienen una mayor capacidad de respuesta, entre 3 a 7 veces mayor que los controles normales, frente a los estimuladores utilizados, incluyendo a los patógenos periodontales. Con esto se confirma la hipótesis con respecto a la hiper-reactividad de los neutrófilos, puesto que la respuesta aumenta en pacientes con enfermedad periodontal.

Los trabajos sobre la acción de patógenos periodontales en neutrófilos sanguíneos periféricos normales y de pacientes con enfermedad periodontal son muy escasos. Nuestra hipótesis sobre la hiper-reactividad de los neutrófilos de sujetos con periodontitis se sustentaba en resultados previos de nuestro Laboratorio de secreción de MMP-9 (Valenzuela y col., 2003) y en lo descrito en la literatura donde se ha descrito aumento de generación de radicales libres (Fredriksson y col., 2003; Zekonis & Zekonis, 2004).

La respuesta de los neutrófilos es muy importante en la inflamación y forma parte de la capacidad de reconocimiento por el sistema inmune innato de los patógenos bacterianos, proceso que recae especialmente en la familia de receptores TLR (Hayashi y col., 2003; Kopp & Medzhitov, 2003; Netea y col., 2004). La respuesta está influenciada por: el estímulo que inicia la cascada inflamatoria, el tipo de patógeno implicado y el tipo de receptor celular activado.

Mientras el sistema inmune innato es activado dentro de minutos luego de la invasión del agente infeccioso bacteriano, su acción será responsable durante las primeras horas y días iniciales de la infección; la respuesta inmune específica o adquirida requerirá de, al menos, varios días para empezar a actuar (Netea y cols. 2004). Una vez en el sitio de la infección, esto es en el espacio sub-endotelial, los neutrófilos se encuentran con la matriz extracelular, estructura que actúa como andamio para la adhesión celular (**Figura 11**). En este espacio secretan sus componentes, citoquinas, quimioquinas y enzimas degradativas (Vaday & Lider, 2000). La participación de estas células en el complejo proceso inflamatorio, termina con la muerte celular por apoptosis que representa un paso crucial en el mecanismo de resolución (término) de la inflamación. La función de los neutrófilos puede ser modulada aún en esta etapa, pues se ha descrito que la vida media de éstas células aumenta en el sitio de la infección, efecto mediado por citoquinas como GM-CSF (factor estimulador de colonias granulocito-macrofago)(Yasui y col., 2002).

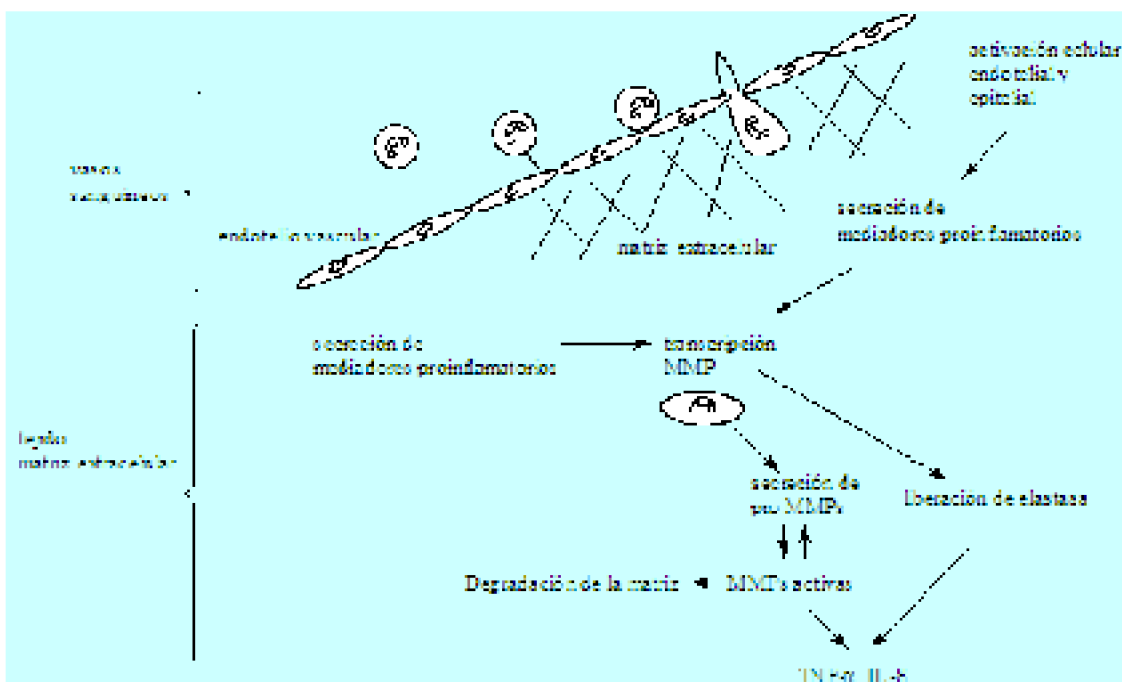


Figura 11: Representación esquemática de la trans migración celular de los neutrófilos desde la circulación a los tejidos.

4.1 NEUTRÓFILOS Y METALOPROTEINASAS.

4.1.1 Neutrófilos infiltrantes del tejido.

Como se mencionó en la introducción, un desbalance entre las MMPs y sus inhibidores titulares sería responsable de la destrucción de la matriz extracelular observada en los pacientes con periodontitis (Teng y col., 1992; Ingman y col., 1996; Romanelli y col., 1999; Atilla y col., 2001; Soell y col., 2002).

Al parecer, las metaloproteinasas derivan principalmente de leucocitos polimorfonucleares provenientes de los infiltrados inflamatorios. Por ejemplo, MMP-9 (gelatinasa B) y MMP-8 derivada de los neutrófilos, están presentes en el fluido gingival crevicular y en el tejido gingival en pacientes con periodontitis (Chen y col., 2000, Atilla, 2001, Pozo y col., 2005). Adicionalmente, como parte de la respuesta inmune, los leucocitos son atraídos y activados en la zona de infección como una manera de contrarrestarla. Estas células sanguíneas migran desde la circulación, debido a un aumento de la permeabilidad de las células hacia el líquido gingival crevicular (Korman y col., 1997).

El proceso destructivo se desarrolla mediante la degradación de la matriz extracelular y de la membrana basal en el tejido gingival asociado al diente. Esta destrucción del tejido ocurre debido a la activación de enzimas proteolíticas presentes, tanto en las células gingivales, como en las células reclutadas hacia la zona de inflamación. Estas proteínas, sintetizadas como zimógenos, son activadas mediante un procesamiento proteolítico en la encía, en el fluido gingival crevicular y en saliva completa. Su activación también puede ocurrir mediante la acción de otras enzimas proteolíticas, como son las proteasas secretadas por los patógenos dentales, favoreciendo la expansión de la placa hacia la zona apical (Okamoto y col., 1997, De Carlo y col., 1997). Hay estudios *in vitro* de activación de las formas de zimógeno de MMP-1, MMP-3 y MMP-9 al incubarlos con *P. gingivalis* (De Carlo y col., 1997).

Los antecedentes de nuestro grupo indican que los pacientes con periodontitis presentan altos niveles de metaloproteinasas junto con bajos niveles de TIMPs comparado con los controles normales, lo que reafirma la sospecha de un desequilibrio entre estas dos macromoléculas (Pozo y col., 2005). Por lo tanto, este desbalance jugaría un papel importante, tanto en la actividad de la enfermedad, como en la progresión de la misma (Knight y col., 1992).

En modelos animales se ha encontrado que MMPs y TIMPs participan en el proceso de reabsorción de hueso en tejido periodontal. Además del aumento de actividad de MMP-1, MMP-2 y TIMP-1, se ha encontrado aumento de la liberación de Ca^{2+} , procesos que serían modulados por la citoquina IL-1 y el factor de crecimiento epidermal. Esto también se ha observado en el remodelamiento de la encía después de la cirugía de implantes (Van der Zee y col., 1998).

En pacientes con periodontitis se investigó la presencia de MMP-9 en fluido gingival crevicular, mediante el uso de zimografía obteniéndose como resultado una elevada actividad tanto de la forma activa como la latente de la MMP-9 comparada con muestras tomadas de personas clínicamente sanas (Teng y col., 1992, Pozo y col., 2005).

En estudios realizados en los últimos años, se ha podido determinar que MMP-8 proviene principalmente de neutrófilos. Esta enzima es liberada desde los gránulos de secreción de los neutrófilos que llegan a la zona de inflamación y se encuentra presente como enzima activa (69 y 56 kDa) en el fluido gingival crevicular de los pacientes con periodontitis (Romanelli y col., 1999, Pozo y col., 2005). La enzima MMP-8 se secreta en el estado latente y se la describe generalmente, como una enzima de 85 kDa aproximadamente. Una vez que las células han infiltrado el tejido gingival, estas experimentan un proceso de activación proteolítica que disminuye su tamaño, encontrándose en, al menos, dos formas: aproximadamente de 69 y 56 kDa. A su vez, las proteasas bacterianas del saco periodontal disminuyen aun más la masa molecular hasta cerca de 56 kDa. El aumento en los niveles de esta enzima se debe al mayor número de neutrófilos presentes en la zona inflamada, más que a la síntesis *in situ* de esta proteína. En pacientes con gingivitis, esta enzima se encuentra como proenzima (estado latente de actividad, 85 kDa).

Otra MMP que también parece tener gran importancia dentro de la enfermedad periodontal es la colagenasa 13 (MMP-13) (Knauper y col., 1996; Uitto y col., 1998; Tervahartiala y col., 2000; Kiili y col., 2002). Esta enzima descrita últimamente, posee alta afinidad por fibras de colágeno así como por gelatina, por lo que se la ha asociado a tejidos como el cartílago en enfermedades de las articulaciones, donde el colágeno es uno de los principales constituyentes. En consecuencia, esta MMP también podría ser de gran interés en los procesos degradativos del tejido periodontal.

Neutrófilos sanguíneos periféricos:

La relación entre neutrófilos sanguíneos periféricos, metaloproteasas y enfermedad periodontal, también ha sido abordada, aun cuando el número de trabajos es menor (Ding y col., 1997, Mancini y col., 1999, Claesson y col., 2002). En el presente trabajo, las zimografías obtenidas de los análisis de sangre completa y de neutrófilos purificados muestran sólo la banda correspondiente a la forma latente de MMP-9 (proMMP-9, pro-MMP-9-lipocalina y dímero de proMMP-9), que fue determinada con el estándar para MMP-9/2, puesto que la forma activa no se visualizó en ninguno de los casos estudiados. Esto concuerda con el hecho de que dentro de los neutrófilos, sólo se encuentra la forma latente de la enzima, la que está almacenada en los gránulos de gelatinasa. Una vez que se produce el proceso de desgranulación hacia el exterior de la célula, la forma latente de la MMP-9 es susceptible de ser atacada por la enzima MMP-3 que se encuentra en la matriz extracelular, transformándola en su forma activa. La enzima MMP-3 inicialmente rompe la proMMP-9 para generar un intermediario de 86 kDa (Ogata y col., 1992). Esto genera un cambio conformacional en la proMMP-9 que hace que la enzima sea susceptible a una segunda ruptura por MMP-3, resultando en la conversión de una forma de 82 kDa proteolíticamente activa, a diferencia del intermediario inicial de 86 kDa.

Nuestros resultados de las zimografías muestran también una banda que corresponde a un dímero de MMP-9 mayor de 200 kDa y una banda que corresponde a proMMP-9 asociado a lipocalina, a 130 kDa, denominada NGAL (“neutrophil gelatinase-associated lipocalin”) (Olson y col., 2000). Esta última banda es característica

de neutrófilos, ya que este componente se encuentra en la matriz de los gránulos específicos (Ford, 1999).

El análisis zimográfico permite efectuar una relación entre la muestra estimulada con respecto a la muestra sin estimular dentro del mismo zimograma. Por las condiciones del análisis, no es posible hacer comparaciones entre distintos zimogramas. Existe gran variabilidad en cuanto a las áreas correspondientes a la banda proMMP-9, dentro del grupo de pacientes y del grupo de controles. Por esto se realizó un análisis comparativo de todas las muestras basales de pacientes y controles. Aquí se encontró que el promedio de la secreción de proMMP-9 de todos los pacientes estudiados, era menor que el promedio de todos los controles, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Se intentó además, en este trabajo, realizar un "dot blot" utilizando un anticuerpo monoclonal específico para MMP-9 que reconoce las distintas formas de MMP-9. Para ello se probaron distintas condiciones experimentales. Como resultado del análisis, sólo se observaron unas señales muy débiles en las condiciones más concentradas, lo que hizo imposible su cuantificación. Sin embargo, en la literatura hay algunos resultados descritos utilizando otro panel de anticuerpos policlonales lo que sugiere que los anticuerpos monoclonales ensayados no tuvieron un título adecuado para los niveles de MMP-9 presentes (Pugin y col., 1999).

De los resultados obtenidos de actividad metaloproteinásica, podemos concluir que en sangre completa no hubo cambios significativos en la secreción de MMP-9 frente a los estimuladores comparando controles con pacientes; en cambio en neutrófilos purificados hubo una significativa estimulación de la secreción por LPS y *Pg*. Dado que en los neutrófilos se han descrito la mayoría de los receptores TLR, es muy posible que el efecto de LPS y de *Pg* sea mediado a través de este tipo de receptores, efecto que se intentará resolver en el futuro. No resultaron muy eficientes como estimuladores en neutrófilos *A. actinomycetemcomitans* y Zymosan A, no descartándose el requerimiento de concentraciones mayores para ver algún efecto.

Los gránulos de gelatinasa son estimulados a secretar por el estímulo de mediadores inflamatorios microbianos como fMLP, LPS y Zymosan A que se unen a receptores Toll (TLR-2 y TLR-4) (Akira y col., 2001; Armant & Fenton, 2002; Akira, 2003). Los gránulos son movilizados hacia la membrana plasmática por elevación gradual del nivel intracelular de Ca^{2+} (Berton, 1999; Almkvist y col., 2001; Faurschou & Borregaard, 2003). Esto estaría mediado por activación de fosfolipasas que catalizan la formación de inositol-tris-fosfato (IP3) que a su vez gatilla la liberación de Ca^{2+} desde almacenamiento intracelulares hacia el citosol (Berton, 1999; Moraes & Downey, 2003; Kobayashi y col., 2003). En neutrófilos varias quinasas, incluyendo tirosina quinasas, estarían involucradas en la señal de desgranulación que ocurre coincidente con la etapa de fagocitosis en los neutrófilos activados por estimuladores. Este proceso requiere reordenamiento del citoesqueleto a fin de lograr la fusión de las membranas de los gránulos y plasmática (Berton, 1999).

4.2 SECRECIÓN DE IL-8

Realizando una comparación de la liberación de IL-8 en concentración (pg/mL), entre pacientes y controles, se puede observar que los pacientes tienen un valor basal mucho menor que los controles (**Figura 7**) y, si bien presentan una mayor respuesta frente al estímulo que los controles, no alcanzan a llegar a los mismos valores. La situación de que el valor basal es menor en pacientes que en controles, es también comparable a lo que ocurre con las metaloproteinasas; sin embargo, en este caso, el aumento de la secreción de IL-8 (entre 3 a 7 veces) por los estimuladores utilizados fue significativamente mayor que en los controles. La menor respuesta puede deberse a que los neutrófilos de los pacientes presenten un fenómeno similar a la tolerancia descrita recientemente en monocitos (West & Heagy, 2002, Muthukuru y col., 2005), es decir, la manifestación de un cierto grado de agotamiento en este tipo de células. Este efecto se ha observado en otros procesos infecciosos como sepsis y shock séptico en cuanto a la liberación de citoquinas por parte de los monocitos (Ertel y col., 1995; Kawasaki y col. 2001). Se ha descrito que la incubación de células sanguíneas mononucleares con LPS en períodos definidos de tiempo, produce una considerable disminución de las citoquinas estudiadas, TNF- α e IL-1 β , en pacientes con respecto a controles, para un tiempo de incubación de una hora (Ertel y col., 1995). Esto representa una situación comparable al trabajo que se realizó en este estudio. En pacientes con sepsis o luego de una cirugía mayor, la capacidad de la sangre completa para producir citoquinas proinflamatorias en respuesta a LPS se reduce. Esta hiporespuesta a endotoxina se correlaciona con la severidad de la sepsis y la magnitud de la cirugía (Kawasaki y col., 2001) y se ha denominado tolerancia al LPS, fenómeno que ha sido ampliamente descrito (West & Heagy, 2002).

Sin embargo, se ha demostrado en estudios también en muestras de pacientes con sepsis, que los neutrófilos no experimentan tolerancia al LPS antes descrito, en un sentido estricto debido a que el LPS es incapaz de desensibilizar estas células a un segundo desafío por LPS como está reportado para monocitos (Marie y col., 1998). Por lo tanto, es aún desconocido el mecanismo por el cual ocurre esta disminución de la respuesta. Similar a los resultados con MMPs las muestras de sangre completa no presentaron mayores cambios en la secreción de IL-8 al comparar las poblaciones de pacientes y controles. En cambio los neutrófilos purificados, respondieron prácticamente frente a todos los estimuladores utilizados, enfatizando nuevamente el posible papel de los receptores TLR. Las muestras correspondientes a controles de neutrófilos purificados, no presentan mayores variaciones entre el valor basal y los valores estimulados de IL-8 (**Figura 9**), la relación de estimulación con respecto al valor basal es cercana a 1 con todos los estimuladores utilizados. En cambio, las muestras correspondientes a pacientes, presentan una notoria hiper-reactividad, que se manifiesta en un aumento en la relación de estimulación con respecto al valor basal, entre 3 y 7 veces para los distintos agentes estudiados (**Figura 9**).

La liberación de IL-8 desde los neutrófilos se produce al unirse Zymosan A y LPS con

los receptores TLR-2 y TLR-4, respectivamente (Akira y col., 2001; Armand & Fenton, 2002; Akira, 2003; Kopp & Medzhitov, 2003). Hay diferencias en la respuesta de un determinado patógeno que puede interactuar con distintos TLRs (Pulendran y col., 2001). En la **Figura 12** se esquematizan las vías de transducción de señales mostrando las similitudes y diferencias de los TLR-2 y TLR-4. En ambos casos se puede decir que incluye la interacción con una molécula adaptadora (MyD88) y a continuación viene una cascada de reacciones donde participan varias quinasas (IRAK, quinasa asociada al receptor de IL-1), un factor asociado al receptor de TNF- α (TRAF-6), la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP quinasa), activación del factor nuclear (NF)- κ B y AP-1, junto con un aumento de la actividad de la proteína p38 (Cushieri y col., 2003).

Una diferencia entre estos dos receptores sería que TLR-4 induce la producción de IFN- γ y una mayor expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Akira, 2003, Armand & Fenton, 2002). Por otra parte TLR-2 induce la síntesis de una menor cantidad de TNF- α . Estos receptores reconocen componentes estructuralmente distintos en los patógenos, en el caso de *Pg* habría la participación de ambos receptores dependiendo de que componente del LPS correspondiente se trate, por ejemplo el lípido A, principal componente inmunomodulador que activaría a través de TLR-4, en cambio una lipoproteína lo hace vía TLR-2 (Akira y col., 2001; Kido y col., 2003; Hashimoto y col., 2004). No hay antecedentes de literatura en el caso de *Aa*.

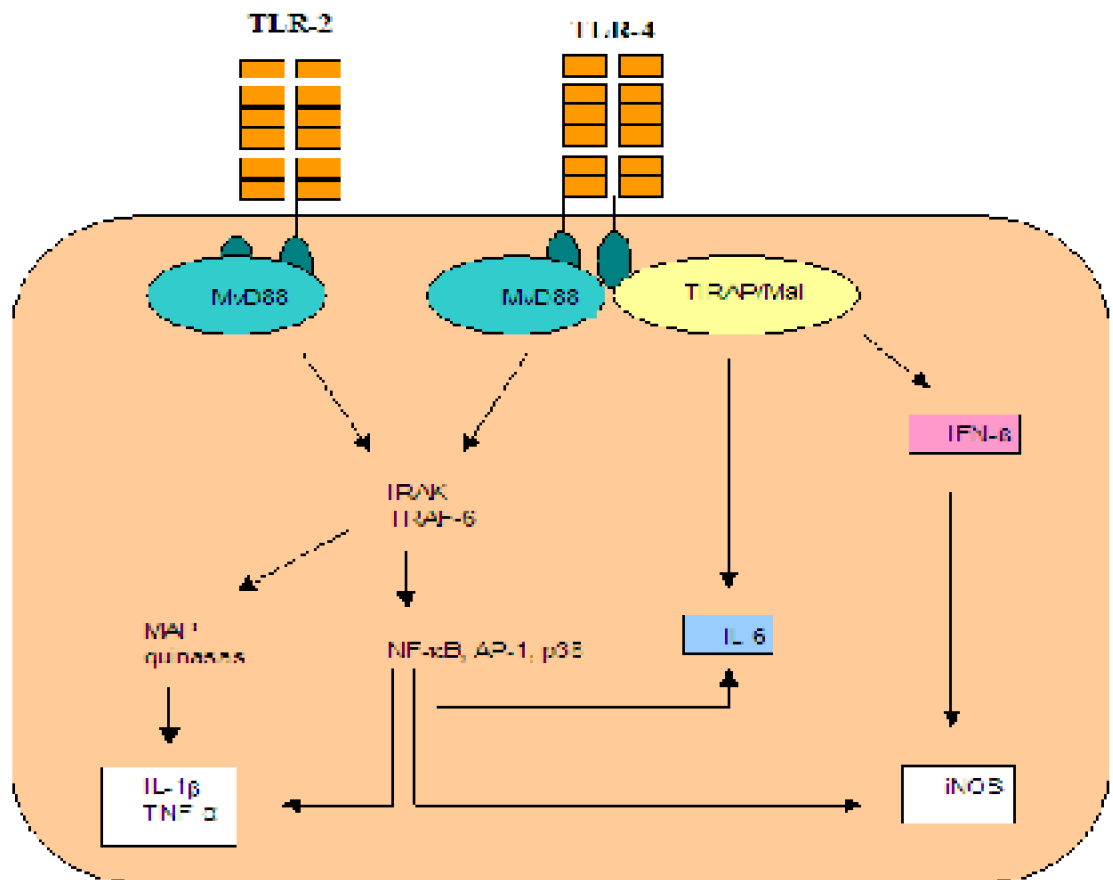


Figura 12: Representación esquemática de las vías de transducción de señales de los receptores TLR-2 y TLR-4.

Un aumento sostenido de Ca^{2+} intracelular también parece ser una señal fisiológica que regula la producción de IL-8 en neutrófilos periféricos, deducido de estudios *in vitro* de estimulación de la transcripción y síntesis de IL-8. Esto ocurre posiblemente a través de una vía dependiente de calcineurina que es una serina/treonina fosfatasa dependiente de calmodulina, que defosforila la forma citosólica del factor nuclear NF-AT y permite el transporte de dicho factor hacia el núcleo lo que ocurre en minutos aumentando la expresión génica (Kuhns y col., 1998).

Los neutrófilos no sólo producen y liberan IL-8, sino que también son los blancos principales de su acción, respondiendo a este mediador por quimiotaxis, liberación de enzimas desde los gránulos, aumento de la actividad respiratoria que produce ROS, aumento de la expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie y mayor adhesión endotelial (Scapini y col., 2000). Estos efectos transcurren a través de sus receptores CXCR1 y CXCR2 a los que se une con gran afinidad (Khandaker y col., 1999). Se ha

demostrado que estos receptores disminuyen sus niveles en la membrana del neutrófilo por acción de las metaloproteinasas liberadas por los neutrófilos (gelatinasa A y colagenasa-2 o MMP-8), lo que podría corresponder a un mecanismo de regulación durante las respuestas inmune e inflamatoria.

4.3 SECRECIÓN DE NO

Se esperaba encontrar la presencia de metabolitos estables del NO como producto de secreción desde los neutrófilos activados, puesto que se ha descrito que los periodontopatógenos estimulan la sobreexpresión de la óxido nítrico inducible en tejido gingival y glándulas acinares (Kendall y col., 2001; Batista y col., 2002; Slomiany & Slomiany, 2002). Además, en los neutrófilos humanos se ha encontrado que agonistas mediados por receptores como fMPL, LPS, Zymosan A y otros agentes inflamatorios aumentan la secreción de NO (Takeichi y col., 1998; Moilanem y col., 1999). El NO está involucrado en la quimiotaxis, fagocitosis y desgranulación de los neutrófilos activados.

Lamentablemente, la liberación de NO, de muestras de sangre completa y neutrófilos purificados, a través de la determinación de sus productos estables, nitrito y nitrato, no pudo cuantificarse debido a una interferencia en el medio de incubación (**Figura 10**) que consistía en una elevada cantidad de nitrato. Los intentos de realizar incubación de muestras en un medio distinto al RPMI-1640 y que cumpliera con la condición de que no presentara estos metabolitos entre sus componentes (PBS 1%) también resultaron infructuosos. Como resultado de éste análisis se obtuvieron bandas casi dentro del límite de la sensibilidad del método (0,1 nmol/mL), por lo que tampoco fue posible la cuantificación confiable de estos derivados del NO. La zimografía comparativa para los medios celulares RPMI-1640 y PBS 1% mostró en general, señales gelatinolíticas más débiles lo que indica que este medio tiene menor capacidad que RPMI-1640, para visualizar la activación de los neutrófilos y que por lo tanto, no permite estudiar la secreción de componentes celulares.

4.4 NEUTRÓFILOS PURIFICADOS

Los neutrófilos, como ya se ha señalado, actúan en la etapa temprana de la inmunidad innata, presentan un proceso de desgranulación y realizan fagocitosis para la destrucción de microorganismos, por lo tanto, tienen un papel preponderante en la enfermedad periodontal (Ford, 1999). Las células sanguíneas están compuestas por: eritrocitos, plaquetas y leucocitos entre los que se cuentan neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Los neutrófilos constituyen aproximadamente el 0,10% del total de las células sanguíneas (Sherman & Sherman, 1989), por lo que se encuentran muy diluidos en los análisis de sangre completa y por ello la gran mayoría de los trabajos actuales, se realizan con neutrófilos purificados (Marie y col., 1998; Claesson y col., 2002;

Hayashi y col., 2003; Silva y col., 2004). El proceso de purificación, si bien está descrito y estandarizado, ya sea utilizando gradientes de ficoll-hypaque o de percoll y posterior sedimentación en dextrano (Rose y col., 1992, Sabroe y col., 2004), debe efectuarse muy cuidadosamente para evitar la auto-activación de los neutrófilos que provoca una agregación irreversible.

El recuento celular de neutrófilos, realizado a partir de la purificación de éstas células provenientes de muestras de sangre, por tinción con azul de Tripán, entregó un promedio de células/mL en pacientes un poco mayor que para controles, aunque no significativa, lo que podría deberse a la situación de infección bacteriana presente en los pacientes con periodontitis.

4.5 NEUTRÓFILOS Y ENFERMEDAD PERIODONTAL

La importancia de este estudio consiste en la capacidad de determinar la estimulación de neutrófilos purificados con patógenos periodontales en pacientes con enfermedad periodontal, en base a la secreción de proMMP-9 e IL-8, y así contribuir a enfrentar en forma más adecuada el tratamiento del paciente. Para esto, se propone estudiar muestras de sangre del paciente antes de recibir tratamiento (pulido radicular con o sin tratamiento con dosis bajas de doxicilina) (Novak y col., 2002), con el objeto de determinar el nivel de hiper-reactividad de los neutrófilos. Después de períodos regulares de 2-6 meses de tratamiento con supervisión odontológica, se puede tomar nuevamente una muestra de sangre para el análisis respectivo. Se espera que la hiper-reactividad de los neutrófilos disminuya con el transcurso del tiempo si se mantienen las condiciones de tratamiento. Esto se debe a que existe un recambio constante de neutrófilos en el sistema circulatorio, ya que estas células se liberan a la sangre proveniente de la médula ósea y permanecen en circulación por aproximadamente 10 horas. En caso de que haya reacción inflamatoria, los neutrófilos infiltrantes pueden vivir hasta 48 h (Yamashiro y col., 2001). Después de llevar a cabo la función efectora, las células mueren por el proceso de apoptosis, facilitándose su eliminación por macrófagos evitando así, liberación de productos citotóxicos. Estos procesos permiten a los neutrófilos erradicar efectivamente microorganismos invasores mientras se minimiza el daño al tejido del hospedero (Moraes & Downey, 2003). Aproximadamente 100 billones de neutrófilos entran y salen del sistema circulatorio diariamente en adultos normales, por lo que el recambio de neutrófilos se produce regularmente.

Los neutrófilos expresan TLRs enumerados del 1 al 10, cuya estimulación puede dar cuenta de liberación (“shedding”) de L-selectina, reducción de la quimiotaxis, aumento de la fagocitosis, estimulación de la generación de superóxidos y producción de un sinnúmero de citoquinas y quimioquinas (Hayashi y col., 2003). Agonistas purificados son reconocidos por los distintos TLR, lo que demuestra lo variado de la respuesta celular, a diferencia del aumento de expresión de genes proinflamatorios que son menos diferenciados.

Nuestros resultados, midiendo la respuesta de los neutrófilos sanguíneos periféricos,

mostraron claramente que IL-8 es un mejor marcador que MMP-9. Es importante comprender los mecanismos que subyacen entre las interacciones de los neutrófilos y los diversos factores de virulencia microbiana para desarrollar estrategias terapéuticas más eficientes. Entre estos factores se encuentra en el caso de *Pg*: gingipaina, péptidos fimbriina, polisacáridos de la cápsula, lipopolisacáridos, actividades hemaglutinantes y hemolizantes, productos tóxicos del metabolismo, entre otros (Kantarci y col., 2002).

5. CONCLUSIONES

La comparación entre poblaciones de pacientes y controles en análisis de sangre completa, no mostró diferencias estadísticamente significativas frente a los distintos estimuladores en cuanto a la liberación de proMMP-9 y a la secreción de IL-8.

La comparación entre poblaciones de pacientes y controles en el análisis de neutrófilos purificados, mostró diferencias estadísticamente significativas para LPS y *Pg* en cuanto a liberación de la enzima proMMP-9. Al comparar las poblaciones de pacientes y controles dentro del grupo, se encontró un aumento significativo de la secreción de proMMP-9 por estimulación con LPS y *Pg* en pacientes.

La comparación dentro de cada grupo de la liberación de IL-8 por los neutrófilos purificados, mostró diferencia significativa para LPS y Zymosan. En cambio, en la comparación de los efectos estimuladores entre pacientes y controles, prácticamente todos los casos resultaron ser significativos.

Los resultados en neutrófilos purificados presentan una mayor respuesta secretora de proMMP-9 e IL-8 frente a los estimuladores utilizados, siendo la respuesta frente a éste último mucho mayor. El seguimiento de esta mayor respuesta aumentaría la sensibilidad de la determinación, por lo que se propone como un buen marcador sistémico de la periodontitis que podría medir la eficacia del tratamiento.

Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con la hipótesis propuesta sobre una hiper-reactividad de los neutrófilos periféricos de los pacientes con periodontitis.

6. REFERENCIAS

- Abbas A, Litchman A, Pober J. *Cellular and Molecular Immunology*, Fourth edition, Saunders, USA, 2000, pp 270-290.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: Critical Proteins Linking Innate and Acquired Immunity. *Nat. Immunol.*, 2001, **2**, 675-680.
- Akira S. Mammalian Toll-like Receptors. *Curr. Op. Immunol.*, 2003, **15**, 5-11.
- Almkvist J, Faldt J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Lipopolysaccharide-Induced gelatinase Granule Mobilization Primes Neutrophils for Activation by Galectin-3 and Formylmethionyl-Leu-Phe. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 832-837.
- Apajalahti S, Sorsa T, Ingman T. Matrix metalloproteinase -2, -8, -9 y -13 in Gingival Crevicular Fluid of Short Root Anomaly Patients. *Eur. J. Orthodont.*, 2003, **25**, 365-369.
- Armant MA, Fenton M. Toll-like Receptors: a Family of Pattern-Recognition Receptors in Mammals. *Genome Biol.*, 2002, **3**, 3011.1-3011.6.
- Armitage G. Development of a Classification System for Periodontal Disease and Conditions. *Ann. Periodontol.*, 1999, **4**, 1-6.
- Atilla G, Sorsa T, Ronka H, Emingil G. Matrix Metalloproteinases (MMP-8 y MMP-9) and Neutrophil Elastase in Gingival Crevicular Fluid of Cyclosporin-Treated Patients. *J. Periodontol.*, 2001, **72**, 354-360.
- Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric Oxide Synthesis and Severity of Human

- Periodontal Disease. *Oral Dis.*, 2002, **8**, 254-260.
- Berton G. Degranulation en *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 3^a ed., John I. Gallin & Ralph Snyderman, eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, pp 703-719.
- Beutler, B. Tlr4: Central Component of the Sole Mammalian LPS Sensor. *Curr. Opin. Immunol.*, 2000, **12**, 20-26.
- Birkedal-Hansen H. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases. *J. Periodontol.*, 1993, **64**, 474-484.
- Birkedal-Hansen H. Proteolytic Remodeling of Extracellular Matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1995, **7**, 728-735.
- Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix Metalloproteinase-8 Levels And Elastase Activities in Gingival Crevicular Fluid from Chronic Adult Periodontitis Patients. *J. Clin. Periodontol.*, 2000, **27**, 366-369.
- Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, Hanstrom L, Kalfas S. Release and Activation of Matrix Metalloproteinase 8 from Human Neutrophils Triggered by the Leukotoxin of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal Res.*, 2002, **37**, 353-359.
- Cushieri J, Gourlay D, García I, Jelacic S, Maier RV. Modulation of Endotoxin-Induced Endothelial Function bt Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Schock*, 2003, **20**, 176-182.
- Dahan M, Nawrocki B, Elkaim R, Soell M, Bolcato-Bellenim A, Birembaut P, Tenenbaum H. Expression of Matrix Metalloproteinases in Healthy and Diseased Human Gingiva. *J. Clin. Periodontol.*, 2001, **28**, 128-136.
- De Carlo AA, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and Novel Processing of Matrix Metalloproteinases by a Thiol-proteinase from the Oral Anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.*, 1997, **76**, 1260-1270.
- Ding Y, Haapasalo M, Kerosuo E, Lounatmaa K, Kotiranta A, Sorsa T. Release and Activation of Human Neutrophil Matrix Metalloproteinases during Phagocytosis of *Fusobacterium Nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *J. Clin. Periodontol.*, 1997, **4**, 237-248.
- Docherty A, O'Connell J, Crabbe T, Angal S, Murphy G. The matrix Metalloproteinases and their Natural Inhibitors: Prospects for Treating Degenerative Tissue Diseases. *Trends Biotechnol.*, 1992, **10**, 200-207.
- Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Healthy and Diseased Human Gingiva. *J. Periodontol.*, 2003, **74**, 188-195.
- El Benna J, Park J, Ruedi J, Babior B. Cell-free Activation of the Respiratory Burst Oxidase by Protein Kinase C. *Blood Cells Mol Dis*, 1995, **21**, 201-206.
- Eley BM, Cox SW. Proteolytic and Hydrolytic Enzymes from Putative Periodontal Pathogens: Characterization, Molecular Genetics, Effects on Host Defenses and Tissues and Detection in Gingival Crevice Fluid. *Periodontology 2000*, 2003, **31**, 105-124.
- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW.

- Downregulation of proinflammatory Cytoquine Release in Whole Blood from Septic Patients. *Blood*, 1995, **85**, 1341-1347.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil Granules and Secretory Vesicles in Inflammation. *Microbes Infect.*, 2003, **5**, 1317-1327.
- Ford D. *Developmental Biology of Neutrophils and Eosinophils, Basic Principal and Clinical Correlates*. 3^a ed., John I. Gallin & Ralph Snyderman, eds. Lippincott Williams & Willkins, Philadelphia, 1999, pp 13-30.
- Fowkles J, Winkler M. Exploring the Interface Between Metallo-proteinase Activity and Growth Factor and Cytokine Bioavailability, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, **13**, 277-287.
- Fredriksson MI, Gustafsson AK, Bergstrom KG, Asman BE. Constitutionally Hyperreactive Neutrophils in Periodontitis. *J. Periodontol.*, 2003, **74**, 219-224.
- Friedberg MA, Hinsdale ME, Shihabi ZK. Analysis of Nitrate in Biological Fluids by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatography*, 1997, **781**, 491-496.
- Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, Martínez B, Silva A. Delayed Neutrophils Apoptosis in Chronic Periodontitis Patients. *J. Clin. Periodontol.*, 2002, **30**, 616-623.
- Gangbar S, Overall C, McCulloch C, Sodek J. Identification of Polimorphonuclear Leukocyte Collagenase and Gelatinase Activities in Mouth Rinse Samples: Correlation with Periodontal Disease Activity in Adult and Juvenil Periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 1990, **25**, 257-267.
- Gómez D, Alonso D, Yoshiji H, Thorgeirsson U. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Regulation and Biological functions. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1997, **74**, 111-122.
- Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T. Separation and Structural Analysis of Lipoprotein in a Lipopolysaccharide Preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int. Immunol.*, 2004, **16**, 1431-1437.
- Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-Like Receptors Stimulate Human Neutrophil Function. *Blood*, 2003, **102**, 2660-2669.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Toll-like Receptor 4 (TLR4)-deficient Mice are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the LPS Gene Product. *J. Immunol.*, 1999, **162**, 3749-3752.
- Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinana DF, Konttinen Y, Sorsa T. Matrix Metalloproteinase and their Inhibitors in Gingival Crevicular Fluid and Saliva of Periodontitis Patient. *J. Clin. Periodontol.*, 1996, **23**, 1127-1132.
- Kantarci A, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated Host Response to *Porphyromonas gingivalis*. *J. Int. Acad. Periodontol.*, 2002, **4**, 119-125.
- Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical Stress Induces Endotoxin Hyporesponsiveness and an Early Disease of Monocyte mCD14 and HLA-DR Expression During Surgery. *Anesth. Analg.*, 2001, **92**, 1322-1326.
- Kendall HK, Marshall, RI, Bartold PM. Nitric Oxide and Tissue Destruction. *Oral Dis.*, 2001, **7**, 2-10.
- Kettlun AM, Cartier L, García L, Collados L, Vásquez F, Ramírez E, Valenzuela MA.

- TIMPs and MMPs Expresión in CSF from Patients with TSP/HAM. *Life Sci.*, 2003, **72**, 2863-2876.
- Khandaker MH, Mitchell G, Xu L, Andrews JD, Singh R, Leung H, Madrenas J, Ferguson SS, Feldman RD, Kelvin DJ. Metalloproteinases are Involved in Lipopolysaccharide- and Tumor Necrosis Factor- α - Mediated Regulation of CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Expression. *Blood*, 1999, **7**, 2173-2185.
- Kido J, Kido R, Suryono, Kataoka M, Fagerhol MK, Nagata T. Calprotectin release from Human Neutrophils is Induced by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide via the CD-14-Toll-like Receptor-Nuclear Factor kappaB Pathway. *J. Periodontal Res.*, 2003, **38**, 557-563.
- Kiili M, Cox S, Chen H, Walgren J, Maisi P, Eley B, Salo T, Sorsa T. Collagenase-2 (MMP-8) and Collagenase-3 (MMP-13) in Adult Periodontitis: Molecular forms and levels in Gingival Crevicular Fluid and Immunolocalisation in Gingival Tissue. *J. Clin. Periodontol.*, 2002, **29**, 224-232.
- Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson S, Stanton H, Hembry R, Murphy G. Cellular Mechanism for Human procollagenase-3 (MMP-13) Activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and Gelatinase A (MMP-2) are able to Generate Active Enzyme. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 17124-17131.
- Knight CG, Willenbrock F, Murphy G. A novel Coumarin-labeled Peptide for Sensitive Continuous Assays of the Matrix Metalloproteinase. *FEBS Lett*, 1992, **296**, 263-266.
- Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the Neutrophil-Mediated Inflammatory Response to Infection. *Microbes Infect*, 2003, **5**, 1337-1344.
- Kopp E, Medzhitov R. Recognition of Microbial Infection by Toll-like Receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003, **4**, 396-401.
- Korman K, Page R, Tonetti M. The Host Response to Microbial Challenge in Periodontitis Assembling the Players. *Periodontology 2000*, 1997, **14**, 33-53.
- Kuhns DB, Young HA, Gallin EK, Gallin JI. Ca²⁺-Dependent Production and Release of IL-8 in Human Neutrophils. *J. Immunol.*, 1998, **161**, 4332-4339.
- Loomer PM, Ellen RP, Tenenbaum HC. Characterization of Inhibitory Effects of Suspected Periodontopathogens on Osteogenesis *in vitro*. *Infect. Immun*, 1995, **63**, 3287-3296.
- Mancini S, Romanelli R, Laschinger C, Overall C, Sodek J, McCulloch C. Assessment of a Novel Screening Test for Neutrophil Collagenase Activity in the Diagnosis of Periodontal Disease. *J. Periodontol.*, 1999, **70**, 1292-1302.
- Marie C, Muret J, Fitting C, Losser MR, Payen D, Cavaillon JM. Reduced *ex vivo* Interleukin-8 Production by Neutrophils in Septic and Nonseptic Inflammatory Response Syndrome. *Blood*, 1998, **91**, 3439-3446.
- Mitchell P, Magna H, Reeves L, Lopresti-Morrow L, Yocum S, Rosner P, Geoghegan K, Hambor J. Cloning Expression and Type II Collagenolytic Activity of Matrix Metalloproteinase-13 from Human Osteoarthritic Cartilage. *J. Clin. Invest.*, 1996, **97**, 761-768.
- Moilanen E, Whittle B, Mondaca S. Nitric Oxide as a Factor in Inflammation. *Inflammation: Basic Principles and Clinical correlates*, 3rd ed., edited by John Gallin

- and Ralph Snyderman. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, pp 787-797.
- Moraes TJ, Downey GP. Neutrophil Cell Signaling in Infection: Role of Phosphatidylinositide 3-Kinase. *Microbes Infect.*, 2003, **5**, 1293-1298.
- Muthukuru M, Jotwani R, Cutler W. Oral Mucosal Endotoxin Tolerance Induction in Chronic Periodontitis. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 687-694.
- Nagase H, Woessner J. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 21491-21494.
- Netea M, Van der Graaf C, Van der Meer J, Kullberg. Toll-like Receptors and the Host Defense Against Microbial Pathogens: Bringing Specificity to the Innate-Immune System. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, **75**, 749-755.
- Novak MJ, Johns LP, Miller RC, Bradshaw MH. Adjunctive Benefits of Subantimicrobial Dose Doxycycline in the Management of Severe, Generalized, Chronic Periodontitis. *J. Periodontol.*, 2002, **73**, 762-769.
- Ogata Y, English JJ, Nagase H. Matrix Metalloproteinase 3 (Stromelysin) Activates the Precursor for the Human Matrix Metalloproteinase 9. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 3581-3584.
- Okamoto T, Akaike T, Suga M, Tanase S, Horie H, Miyajima S, Ando M, Ichinose Y, Maeda H. Activation of Human Metalloproteinases by Various Bacterial Proteinases. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 6059-6066.
- Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Coth M, Kotra LP, Massova I, Mobashery S, Fridman R. Characterization of the Monomeric and Dimeric Forms of Latent and Active Matrix Metalloproteinase-9. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 2661-2668.
- Parker LC, Whyte MK, Dowre SK, Sabroe I. The Expression and Roles of Toll-like Receptors in the Biology of the Human Neutrophil. *J. Leukoc. Biol.* **77** (publicación anticipada DOI:10.1189/jlb.1104636).
- Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P. Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in Human Periodontal Ligament Cells. *J. Periodontal Res.*, 2003, **38**, 115-121.
- Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B, Gamonal J. Longitudinal Analysis of Metalloproteinases. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Clinical Parameters in Gingival Crevicular Fluid from Periodontitis-affected Patients. *J. Periodontol Res.*, 2005, **40**, 199-207.
- Pugin J, Widmer MC, Kossodo S, Liang CM, Preas II HL, Suffredini A. Human Neutrophils Secrete Gelatinase B *In Vitro* and *In Vivo* in Response to Endotoxin and Proinflammatory Mediators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1999, **20**, 458-464.
- Puledran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from Distinct Pathogens Induce Different Classes of Immune Responses in vivo. *J. Immun.*, 2001, **167**, 5067-5076.
- Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology, Diagnosis of Periodontal Diseases. *J. Periodontol.*, 2003, **74**, 1237-1247.
- Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanism of Connective Tissue Matrix Destruction in Periodontitis. *Periodontology 2000*, 1997, **14**, 144-157.

- Romanelli R, Mancini S, Laschinger CM, Overall C, Sodek J, McCulloch CA. Activation of Neutrophil Collagenase in Periodontitis. *Infect Immun*, 1999, **67**, 2319-2326.
- Rose N, de Macario EC, Fohey J, Friedman H, Penn G. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, American Society for Microbiology. Washington D.C., 4^a Ed., 1992, pp 926-928.
- Ryan ME, Golub L. Modulation of Matrix Metalloproteinase Activities in Periodontitis as a Treatment Strategy. *Periodontology*, 2000, 2000, **24**, 226-238.
- Sabroe I, Prince LR, Dower SK, Walmsley SR, Chilverst ER, Whyte MK. What can we Learn from Highly Purified Neutrophils? *Biochem. Soc. Trans*, 2004, **32**, 468-469.
- Scapini P, Lapinet-Vera J, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The Neutrophil as a Cellular Source of Chemokines. *Immunol Rev*, 2000, **177**, 195-203.
- Sherman I, Sherman V. *Biology: a Human Approach*, Fourth Edition, Oxford, 1989, pp 280-281.
- Silva SO, Rodrigues MR, Ximenes VF, Bueno-da-Silva AE, Amarante-Mendes GP, Campa A. Neutrophils as a Specific Target for Melatonin and Kynuramines: Effects on Cytokine Release. *J. Neuroimmunol*, 2004, **156**, 146-152.
- Slomiany BL, Slomiany A. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide interferes with salivary glands mucin synthesis through inducible nitric oxide synthase activation by ERK and p38 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, **297**, 1149-1153.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeka NM, Olson BJ, Klenck DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, **150**, 76-85.
- Soell M, Elkaim R, Tenebaum H. Cathepsin C Matrix Metalloproteinases and their Tissue Inhibitors in Gingiva and Gingival Crevicular Fluid from Periodontitis-affected Patients. *J. Dent. Res.*, 2002, **81**, 174-178.
- Sugita N, Kimura A, Matsuki Y, Yamamoto T, Hiromasa Y, Hara K. Activation of transcription Factors and IL-8 Expression in Neutrophils Stimulated with Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*, *Inflammation*, 1998, **22**, 253-265.
- Takeichi O, Saito I, Okamoto Y, Tsurumachi T, Saito T. Cytokine Regulation on the Synthesis of Nitric Oxide *in vivo* by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes, *Immunology*, 1998, **93**, 275-283.
- Teng Y, Sodek J, McCulloch C. Gingival Crevicular Fluid Gelatinase and its Relationship Disease in Human Subjects. *J. Periodontal Res.*, 1992, **27**, 544-552.
- Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, Kallio P, Tornwall J, Srinivas R, Konttinen YT, Sorsa T. The *in vivo* Expression of the Collagenolytic Matrix Metalloproteinases (MMP-2, -8, -13 y -14) and Matrilysin (MMP-7) in Adult and Localized Juvenile Periodontitis, *J. Dent. Res.*, 2000, **79**, 1969-1977.
- Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, Raiden S, Geffner J. Bacterial DNA Activates Human Neutrophils by a CpG-Independent Pathway. *Eur. J. Immunol.*, 2003, **33**, 3164-3174.
- Uitto VJ, Overall C, McCulloch C. Proteolytic Host Cell Enzymes in Gingival Crevice Fluid. *Periodontology*2000, 2003, **31**, 77-104.
- Vaday GG, Lider O. Extracellular Matrix Moieties, Cytokines and Enzymes: Dynamic

-
- Effects on Immune Cell Behavior and Inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2000, **67**, 149-158.
- Valenzuela MA, Cartier L, Collados L, Kettlun AM, Araya F, Concha C, Flores L, Wolf M, Mosnaim A. Gelatinase Activity of Matrix Metalloproteinase in the Cerebrospinal Fluid of Various Patient Populations. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 1999, **104**, 42-52.
- Valenzuela MA, García L, Llanos D, Puente J, Puente M, Galleguillos M, Chaparro A, Gamonal J. Molecular Markers of Lymphocyte Activation in Periodontal Disease, and in Biological Fluids of Degenerative Diseases. LACE 2003, 9° Simposio Latinoamericano de la Electroforesis Capilar y Tecnología del Microchip en Biotecnología, Biomedicina, Biofarmacia e Industria. México, Diciembre 2003.
- Van der Zee U, Cansen I, Beertsen W, Everts V. EGF and IL-1 β Modulate the Release of Collagenase, Gelatinase and TIMP-1 as well as the Release of Calcium by Rabbit Calvarial Bone Explants. *J. Periodontal. Res.*, 1998, **333**, 65-72.
- West MA, Heagy W. Endotoxin Tolerance: A Review. *Crit. Care Med.*, 2002, **30**, S64-S73.
- West-Mays J, Strissel K, Sadow P, Fini M. Competence for Collagenase Gene Expression by Tissue Fibroblast Requires Activation of an Interleukine-1 β Autocrine Loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 6768-6772.
- Woessner, JF. Matrix Metalloproteinase and their Inhibitors in Connective Tissue Remodeling. *FASEB J*, 1991, **5**, 2145-2154.
- Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. Phenotypic and Functional Change of Cytokine-Activated Neutrophils: Inflammatory Neutrophils are Heterogenous and Enhance Adaptative Immune Responses, *J. Leukoc. Biol.*, 2001, **69**, 698-704.
- Yasui K, Sekigushi Y, Ichikawa M, Nagumo H, Yamazaki T, Komoyama A, Susuki H. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor Delays Neutrophil Apoptosis and Primes its Function Through Ia-type Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, **72**, 1020-1026.
- Zekonis G, Zekonis J. Effect of Bacterial Stimulants on Reactive Oxygen Metabolites from Peripheral Blood Neutrophils in Perodontitis. *Medicina*, 2004, **40**, 260-264.
- Zychlinsky A, Weinrauch Y, Weiss J. Introduction: Forum in Immunology on Neutrophils. *Microbes Infect.*, 2003, **5**, 1289-1291.