



UNIVERSIDAD DE CHILE
UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

“ESTUDIO DE LA ACTIVACION Y APOPTOSIS DE NEUTROFILOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL”

TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR AL TITULO DE BIOQUIMICO

SABRITA CHANDIA ESPINOSA

Profesor Patrocinante
Dr. Javier Puente Piccardo
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Directores de Tesis Profesor
Dr. Javier Puente Piccardo
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Dr. Jorge Gamonal Aravena
Facultad de Odontología

Financiada por: -CSIC-U de Chile
-Fondecyt 1050518

Santiago – Chile
Noviembre -2005

INDICE

	Pág.
INDICE	I
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	
V	

RESUMEN	VI
SUMMARY	VIII
ABREVIATURAS	X
1._INTRODUCCIÓN	
1.1_ Clasificación y caracterización de las enfermedades periodontales	1
1.2_ Patogénesis de la periodontitis	2
1.3_ Efecto de los patógenos periodontales	3
1.4_ Respuesta inmune innata: papel de los neutrófilos	4
1.5_ Papel de las moléculas de adhesión en los neutrófilos	6
1.5.1_ Receptor de superficie del neutrófilo L-selectina(CD62L)	6
1.5.2_ Receptor de superficie del neutrófilo Mac-1 (CD11b)	7
1.6_ Mecanismos de apoptosis del neutrófilo	8
1.7_ Hipótesis	9
1.8_ Objetivo general	9
1.9_ Objetivos específicos	9

2._ MATERIALES Y METODOS

11

2.1_ Criterios clínicos 11

2.1.1_ Grupo de pacientes 11

2.1.2_ Grupo control 11

2.2_ Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica 12

2.3_ Extracto bacteriano *P.gingivalis* 12

2.3.1_ Extracto bacteriano y viabilidad celular 13

2.3.2_ Detección de proteínas de extracto bacteriano 13

2.4_ Citometría de flujo 14

2.4.1_ Muerte por apoptosis (Método Sub-G₁) 14

**2.4.2_ Receptor de superficie L-selectivo (CD62L)
y Mac-1(CD11b)** 15

2.5_ Tinción de Giemsa 15

2.6_ Análisis de los datos 15

3._ RESULTADOS 16

3.1._ Selección de los grupos de trabajo 16

3.2._ Caracterización de neutrófilos 17

3.3_ Citometría de flujo 18

**3.3.1_ Receptor de superficie
L-selectina(CD62L)** 18

3.3.2_ Receptor de superficie Mac-1 (CD11b) 21

3.4_ Estudio de apoptosis de neutrófilos: método Sub-G ₁	24
4.-DISCUSIÓN	28
4.1_ Neutrófilos y periodontopatogenos en periodontitis	28
4.2_ Moléculas de adhesión Mac-1(CD11b) y L-selectina (CD62L)	29
4.3_ Apoptosis y enfermedad	30
4.4_ Influencia de la expresión de Mac-1 (CD11b) y L-selectina (CD62L) en la apoptosis de neutrófilos en la periodontitis	33
4.5_ Potenciales limitaciones de trabajo	34
5._ CONCLUSIONES	36
6._ REFERENCIAS	37

INDICE DE FIGURAS

Fig.1.1._ Esquema de una pieza dental	1
Fig.1.2_ Esquema progresión de la periodontitis	3
Fig.1.3._ Factores involucrados en la progresión de la enfermedad periodontal	4
Fig.3.2.1_ Esquema representativo de neutrófilos	18
Fig.3.3.1.1_ Histograma representativo del marcaje con CD62L	19
Fig.3.3.1.2_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD62L	20
Fig.3.3.1.3_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD62L	

frente a LPS <i>E.coli</i>	20
Fig 3.3.1.4_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD62L frente a extracto de <i>P. gingivalis</i>	21
Fig 3.3.2.1_ Histograma representativo del marcaje con CD11b	22
Fig 3.3.2.2_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD11b	23
Fig 3.3.2.3_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD11b frente a LPS <i>E.coli</i>	23
Fig 3.3.2.4_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD11b frente a extracto <i>P.gingivalis</i>	24
Fig 3.3.3.1_ Histograma representativo de apoptosis por método sub-G _{1/0}	25
Fig 3.3.3.2_ Porcentaje de células apoptoticas	26
Fig 3.3.3.3_ Porcentaje de células con LPS apoptotica Estimuladas <i>E. coli</i>	26
Fig 3.3.3.4_ Porcentaje de células apoptotica estimuladas con extracto de <i>P.gingivalis</i>	27

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características clínicas de los sujetos con periodontitis crónica y el grupo de los controles.	16
Tabla 3.2. Características de la población en estudio	17

ANEXOS

ABREVIATURAS.

Aa = *Actinobacillus actinomycetencomitans*

CD11b = Receptor de membrana del neutrófilo llamado Mac-1

CD14 = Receptor de membrana del neutrófilo

CD62L = Receptor de membrana del neutrófilo llamado L-selectina

CR = Regulador del complemento

E. coli = *Escherichia coli* Bacteria Gram negativa

EGF = Factor de crecimiento epidermal

GM-CSF = Factor estimulante de colonias granulocitos-monocitos

IL-8 = Interleuquina 8

LPS = lipopolisacáridos

PAMPs = Patrones moleculares asociados a patógenos

Pg = *Porphyromonas gingivalis*

PRR = Receptores de reconocimiento de patrones

TF = *Bacteroides forsythus*

TLR = Receptores tipo Toll

TNF α = Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

La periodontitis crónica es una enfermedad periodontal, caracterizada por la inflamación de la encía, iniciada por la placa microbiana y propagada por el hospedero, con la posterior destrucción de la estructura de soporte de los dientes. Los neutrófilos son la primera línea de defensa frente a patógenos como parte de la respuesta inmune innata. En la periodontitis los neutrófilos responden a la presencia de las bacterias anaerobias Gram negativas, que colonizan el tejido subgingival, que incluye a *Porphyromonas gingivalis*. Los neutrófilos reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), dentro de los cuales se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de los que forman parte los TLR. Una vez que los neutrófilos han reconocido al patógeno, se producen cambios en la membrana plasmática señal de su activación. Dentro de estos cambios se encuentran la disminución de L-selectina (CD62L), seguido por el incremento en la expresión de Mac-1 de la familia β_2 integrina (CD11b) en la superficie de los neutrófilos.

Después de la activación de los neutrófilos comienza el proceso apoptótico asociado con algunas funciones importantes, tales como adhesión y fagocitosis, las que eventualmente llevan a la resolución de la inflamación. En la periodontitis, los neutrófilos presentarían una desregulación en la apoptosis, acumulándose y aumentando el daño tisular.

De esta manera, nosotros proponemos que los pacientes con periodontitis crónica presentan activación y un retardo de la apoptosis de neutrófilos con respecto a los controles sanos. Como una forma de acercarnos a los cambios en el sistema inmune que hacen a un sujeto más susceptible a la periodontitis, se estudió la activación y apoptosis de neutrófilos en cultivo, de sangre periférica de individuos periodontalmente sanos y con periodontitis crónica. También estudiamos el efecto de LPS *Escherichia coli* y el extracto bacteriano de *P. gingivalis* sobre ambos grupos.

Los neutrófilos se purificaron desde sangre periférica de 11 pacientes con periodontitis crónica sin tratamiento y 8 controles periodontalmente sanos. Los neutrófilos purificados se incubaron con LPS *E. coli* o extracto de *P. gingivalis* por periodos de 0, 4 y 8 h, para posteriormente la determinación de los nivel relativos de expresión de CD62L y CD11b y apoptosis, por citometría de flujo.

Los resultados muestran una disminución de la expresión de CD62L y de CD11b en los neutrófilos de pacientes con respecto a los controles sanos en sus niveles basales. Además existe una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia media (MFI) en el tiempo de los niveles basales de CD11b en el grupo control. Al ser estimulados los neutrófilos de pacientes y controles con LPS *E. coli* o *P. gingivalis*, existe una disminución de MFI de CD62L y un aumento de CD11b en ambos grupos sin llegar a ser significativos estadísticamente frente *P. gingivalis*. Sin embargo, LPS *E. coli* alcanza significación estadística con respecto a los basales en pacientes y controles. MFI de CD11b y CD62 de pacientes y controles a las 8 h de incubación se igualan. Además, los neutrófilos de pacientes presentan un retardo apoptótico en sus niveles basales, con respecto a los controles, y que no es alterada por los estímulos de LPS *E. coli* o *P. gingivalis*. Este retardo de la apoptosis ayudaría al neutrófilo a demorar su acción en el tejido liberando el contenido de sus gránulos, contribuyendo al daño tisular y a la etiopatogénesis de la enfermedad periodontal.

SUMMARY

Study of the activation and apoptosis of neutrophils of the patients with periodontal disease.

Chronic periodontitis, a periodontal disease, is started by a microbial plaque and extended by the host itself. This disease is characterized by gingival inflammation leading to the destruction of the structure surrounding teeth. Neutrophils are the first line of defence of the innate immune system against pathogens. Neutrophils respond to Gram negative anaerobic bacteria like *Porphyromonas gingivalis* that colonize the subgingival tissue. These cells detect molecular patterns associated to pathogens (PAMPs), as the lipopolysaccharide (LPS), through pattern recognition receptors (PRR). Toll like receptors (TLR) belong to these kinds of receptors. Changes in the plasmatic membrane occur after pathogen recognition by neutrophils being one of them the changes in the expression of adhesion molecules: down regulation of L-selectin (CD62L) and up-regulation of Mac-1 (CD11b), a member of the β_2 family of integrins.

Immediately after neutrophil activation, begins the apoptotic process associated to important functions as cell adhesion and phagocytes leading to the resolution of inflammation. In periodontitis, neutrophils would have a deregulation of the apoptotic process accumulating in the site of infection and increasing the tissue damage.

As an approaching way to changes in the immune system that increase the susceptibility to periodontitis, we studied in peripheral blood neutrophils culture the activation and apoptosis process of healthy controls and chronic periodontitis patients. Also we studied the effect of LPS from *Escherichia coli* and bacterial extract of *P. gingivalis* on both groups. The aim of this thesis is to propose that neutrophils of the chronic periodontitis patients present activation and a delay in their apoptotic process in relation to healthy controls subjects.

Peripheral blood neutrophils from 11 patients with chronic periodontitis and 8 healthy controls without treatment were purified and incubated with LPS *E. coli*

or *P. gingivalis* extract by 0, 4 and 8 h. After that, the levels of expression of the CD62L and CD11b and apoptosis were determined by flow cytometry.

The results show a down regulation in the expression of the basal levels of CD62L and CD11b in the patient neutrophils in relation to the healthy controls. Also the mean fluorescence intensity (MFI) of the basal levels of CD11b during the study was significantly lower than that of the healthy control group. Neutrophils from both groups stimulated with LPS *E. coli* or *P. gingivalis* decreased the MFI of CD62L and increased MFI of CD11b (statistically significant with LPS *E. coli*). At 8 h of culture, MFI of CD62L and CD11b from patients and controls are the same. Neutrophils from the patients group, present a delay in their basal apoptosis in relation the control group, effect not modified by LPS *E. coli* or *P. gingivalis* extract. This apoptosis delay could help to the neutrophil to prolong their functions in the tissue releasing cytotoxic granule contents and contributing to tissue damage and to the etiopathogenesis of the periodontal disease.

1._INTRODUCCION

1.1_ CLASIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES.

Las enfermedades periodontales son un grupo heterogéneo de patologías caracterizadas por la inflamación de la encía y posterior destrucción de la estructura de inserción de los dientes (**Fig 1.1**) (Johansson y col., 2005; Mombelli y col., 2003). En la etiología de la enfermedad participan activamente la respuesta inmune desarrollada por el hospedero (Gajardo y col., 2005) frente a la presencia del biofilm de bacterias presente en la placa dental. Esta placa esta compuesta por más de 500 diferentes especies bacterianas organizadas en el área supra y subgingival (Gajardo y col., 2005) e incluye a *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Bacteroides forsythus* (Tf) y *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* (Aa), entre todas bacterias Gram negativas, anaerobias como las de mayor prevalencia (Pizarro y col., 1997). Las toxinas, que producen las bacterias en la placa dental, irritan la encía, provocando que éstas se desinserten de los dientes formándose bolsas o sacos periodontales, las cuales a su vez constituyen un reservorio de más toxinas, y bacterias, conduciendo a la destrucción del tejido conectivo y la

reabsorción del hueso alveolar a través de mecanismos directos e indirectos (Page y col., 1997).



Fig.1.1._ ESQUEMA DE UNA PIEZA DENTAL: En negrita se muestran las estructuras de soporte e inserción dental que se ven afectadas por la infección bacteriana y la respuesta de los neutrófilos a ésta.

El término enfermedad periodontal en estricto rigor se refiere a gingivitis y periodontitis. La gingivitis es una condición inflamatoria que afecta a la encía ubicada alrededor del diente, generada por la respuesta inmune directa al biofilm bacteriano, sin embargo, puede ser modificada por otros factores como el cigarrillo, ciertas drogas y cambios hormonales ocurridos en la pubertad y embarazo (Pizarro y col., 1997). Al igual que en la gingivitis, la periodontitis está influenciada por el sistema inmune y la respuesta inflamatoria desencadenada por la placa bacteriana, que ocurre en aproximadamente 35% de los adultos en los Estados Unidos (Gjerme y col., 2002). Pizarro y col. (1997), en un estudio realizado en Chile muestra que entre los 10 y 18 años el 10% de la población chilena sufre de periodontitis, con pérdidas de inserción ósea de 3 a 5 mm; entre los 35-44 años el 90% de los chilenos tienen la patología y después de los 65 años el 100% de la población está enferma. También se asocia la enfermedad al nivel socioeconómico de los pacientes chilenos, encontrándose que a la edad de

mayor prevalencia el 99,5%, 98,0% y el 56,0% de los individuos en estudio pertenecientes a baja, media y alta condición económica respectivamente presentan periodontitis (Pizarro y col., 1997).

1.2_ PATOGÉNESIS DE LA PERIODONTITIS.

La periodontitis puede ser considerada un proceso ciclico que experimenta periodos de exacerbación donde existe destrucción de tejido de soporte dental y presencia de inflamación aguda (Denisis, 2001). La enfermedad continúa con episodios de quietud en los cuales no hay evidencia de destrucción de tejido periodontal e incluso puede existir regeneración de tejido conectivo de inserción perdidos (Lindhe y col., 1983). Para que la enfermedad se desarrolle en un individuo, deben existir una serie de condiciones, tales como presencia de patógenos periodontales en cantidad suficiente para producir la enfermedad y un hospedero susceptible; esta susceptibilidad puede ser heredada o influenciada por factores ambientales (**Fig.1.2**) (Socransky y col., 1992; Quirynen y col., 2001).

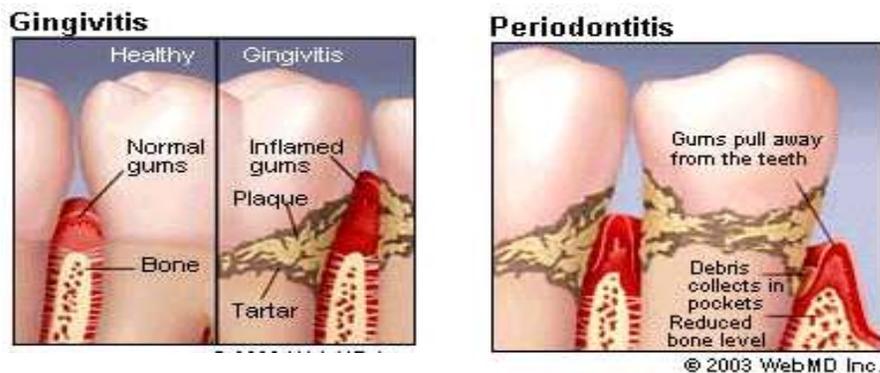


Fig.1.2_ ESQUEMA PROGRESION DE LA PERIODONTITIS: A la izquierda, la progresión desde una encía sana a la enfermedad periodontal llamada gingivitis, antecesora de la periodontitis, se observa el aumento del volumen de la encía enferma producto de la acumulación de tártaro (sarro, mineralización de la placa bacteriana) y a la derecha, la progresión de la enfermedad a periodontitis, se observa el aumento del tártaro, la aparición de la bolsa periodontal (espacio entre la encía y el diente) acompañado de destrucción del hueso alveolar.

1.3_ EFECTO DE LOS PATOGENOS PERIODONTALES.

Dentro de la patogénesis de la periodontitis se encuentra el papel de las bacterias, basado en los factores de virulencia que dependen entre otras cosas de su serotipo (Brogan y col., 1994), capaz de alterar el sistema de defensa del hospedero, por la habilidad de atacar las células epiteliales, y proteínas de la matriz extracelular; mediado por proteasas, colagenasas, endotoxinas (LPS), la producción de inhibidores quimiotácticos, sustancias metabólicas tóxicas (H₂S), proteínas inmunosupresoras, etc. (Gajardo y col., 2005). Como resultado de este daño se producen cambios vasculares y celulares en los tejidos periodontales, con la migración de células fagocíticas y formación de un infiltrado inflamatorio que incluye neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos T y B que se ubican dentro del tejido conectivo gingival (Gamonal y col., 2000). Con el tiempo se produce un incremento en el tamaño del infiltrado inflamatorio presente en el tejido conectivo con una mayor destrucción de la matriz extracelular (Page y col., 1982). Con ello se produce una mayor liberación y participación de mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas, metaloproteinasas y prostaglandinas, ocasionando la destrucción completa del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, lo que se traduce en definitiva en la pérdida del diente (Gamonal y col., 2001). Existe abundante evidencia que la destrucción de tejido en la lesión periodontal, resulta del reclutamiento de células inmunes activadas junto con el incremento en el número de neutrófilos presentes en el tejido periodontal (Zappa y col., 1991; Vernal y col., 2005; Goodson y col., 1982).

Sano

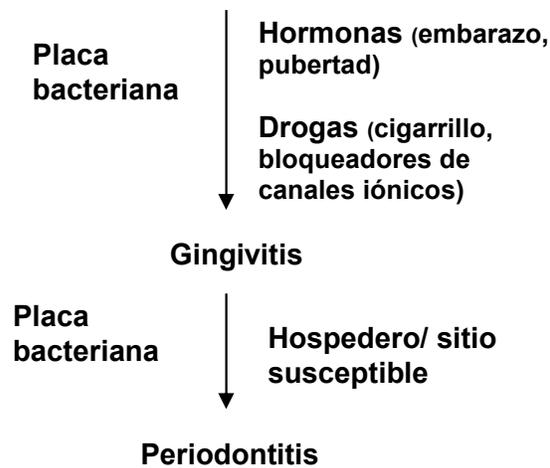


Fig.1.3._ Factores involucrados en la progresión de la enfermedad periodontal: Para que la encía de un sujeto sano se enferme y progrese hasta periodontitis, deben ocurrir una serie de eventos que en su conjunto favorezcan el desarrollo de la patología.

1.4_ RESPUESTA INMUNE INNATA: PAPEL DE LOS NEUTROFILOS.

Se describen dos ejes inmunológicos como responsables de la defensa de las estructuras periodontales frente a la agresión bacteriana: un eje localizado a nivel del tejido epitelial conformado por neutrófilos-complemento-anticuerpos, y un segundo localizado a nivel tejido conectivo constituido por macrófagos-citoquinas –linfocitos (Miyasaki, 1991). Los neutrófilos son parte del sistema inmune innato, que constituyen la primera línea de defensa del hospedero frente a la infección. Aun cuando un importante número de estas células migran hacia el surco gingival, la mayoría de las células permanecen en el tejido conectivo perivascular formando parte del infiltrado inflamatorio local (**Fig 1.3**) (Ogawa y col., 1990).

Los neutrófilos, representan aproximadamente el 65% de los leucocitos de la sangre, tienen un diámetro de 10-15 μm y un núcleo segmentado con 2-5 lóbulos interconectados. En su citoplasma se han descrito 4 tipos de gránulos.

Primarios o Azurofilos: son escasos en los estadios maduros, contienen mieloperoxidasa, enzimas antibacterianas, agentes microbiales, lisozima, enzimas lisosomales e hidrolasas ácidas. Secundarios o Específicos: son los más numerosos en los neutrófilos maduros; contienen lisozima, colagenasa, fosfatasa alcalina, lactoferrina, proteínas enlazantes B₁₂ y NGAL. Terciarios o Gelatinasa: contienen principalmente gelatinasa. Vesículas Secretoras: al parecer formado por endocitosis, contiene algunas proteínas plasmáticas.

Los neutrófilos reconocen constituyentes microbianos, lo que desencadena una respuesta celular y humoral. Los productos microbianos que activan esta respuesta son, los lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoico, lipoproteínas, DNA, glicolípidos, fragmentos de pared celular, que en conjunto reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y los receptores a los cuales se asocian se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR), de los que forman parte los receptores Toll (Carrillo-Esper y col., 2002). En el hombre, por su semejanza en estructura y función con el sistema Toll de *Drosophila* se denomina receptores tipo Toll (TLR), se han descrito 10 de estos receptores los cuales se han especializado en el reconocimiento de diferentes PAMPs. En el neutrófilo se expresan tres de ellos; TLR-1 y TLR-2 que reconocen peptidoglicanos de bacterias Gram positivas, TLR-4 específico para lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. Se ha descrito interacción de TLRs con varios receptores de membrana de neutrófilos, tales como CD14 que tiene gran afinidad por LPS de bacterias Gram negativas, es una proteína que se une a la membrana sin tener dominio intracelular por lo cual necesita el sistema transducional de TLR-2 y 4, formando complejos de suma importancia para la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria (Carrillo-Esper y col., 1990). Las integrinas β 2, CD11/CD18 forman complejos con TLR-4 cuya función es la señalización transmembrana incrementando la respuesta a LPS (Carrillo-Esper y col., 1989).

Una vez que los neutrófilos reconocen los PAMPs se movilizan al foco infeccioso. Este movimiento es dirigido por quimiotaxis, un gradiente químico que atrae a los neutrófilos, donde se incluyen el fragmento C5a y C3a del complemento a péptidos pequeños derivados de bacterias como N-formil-met-leu-

phe y lípidos derivados de bacteria, factor plaquetario, metabolitos de la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, especialmente el leucotrieno B4 y las quimioquinas, entre ellas IL-8 (Cicchetti y col., 2002).

1.5_ PAPEL DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS.

1.5.1_ RECEPTOR DE SUPERFICIE DEL NEUTRÓFILO L-SELECTINA (CD62L).

La migración de los neutrófilos ocurre bajo la modulación de expresión de molécula de adhesión. En particular, la disminución (“shading”) de L-selectina (CD62L), seguido por el incremento en la expresión de β_2 integrina CD11b/CD18 en la superficie de los neutrófilos (Gainet y col., 1990).

Los neutrófilos interactúan con células endoteliales del tejido inflamado donde se produce el fenómeno de rodamiento (“rolling”) y son estimulados a degranular por factores quimiotácticos, quimioquinas y citoquinas. La degranulación se regula por la unión de L-selectina a su ligando (adhesinas) lo que aumenta el Ca^{2+} libre citosólico que ayuda a movilizar vesículas de secreción y gránulos secundarios por el remodelamiento del citoesqueleto. CD62L se ha encontrado solo en leucocitos, y ha sido implicado en la adherencia de éstos al ganglio periférico linfático y luz endotelio-venosa (Lewisohn y col., 1987 y Spertini y col., 1991), con lo que participa en la entrada selectiva de los linfocitos en los ganglios linfáticos, y puede modular la adhesión leucocitaria al endotelio durante la inflamación. Las selectinas son una familia compuesta de tres proteínas designadas por el prefijo E (endotelio), P (plaqueta), y L (leucocito). El rasgo principal es que son proteínas ancladas en la membrana celular mediante una estructura común, formada por un fragmento extracitoplasmático NH_2 terminal que contiene el dominio tipo lecitina, un dominio tipo EGF (factor de crecimiento epidermal), 2-9 dominios tipo CR (regulador del complemento). La unión a células endoteliales favorece la interacción del neutrófilo con sustancias quimiotácticas que ayudan a la adhesión de integrinas por neutrófilos que promueven la firme adhesión al tejido endotelial para posteriormente migrar al espacio subendotelial (Rosales y col., 1995).

1.5.2_ RECEPTOR DE SUPERFICIE DEL NEUTRÓFILO Mac-1 (CD11b).

La familia $\beta 2$ integrinas son las responsables de la adhesión de leucocitos a células endoteliales. La integrina CD11/CD18 forman un heterodimero glicoproteico, la subunidad β (CD18) de 95kDa se une no covalentemente a varias subunidades α , como son CD11a, CD11b, CD11c (175, 165 y 150 kDa) (Sánchez-Madrid y col., 1983; Pietruska y col., 2005). Los leucocitos se adhieren al endotelio vascular como resultado de la interacción de CD11/CD18 con un sitio ligando sobre las células endoteliales, sobre todo con CD54 (molécula de adhesión intercelular-ICAM-1) (Springer., 1990; Pietruska y col., 2005). Mac-1 actúa interaccionando célula-célula, célula-sustrato y como receptor para el fragmento del complemento C3bi, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2) y CD50 (ICAM-3) pertenecientes a la familia de la inmunoglobulinas (Prieto y col., 1988).

En condiciones basales, las integrinas se encuentran en estado inactivo, y presentan una baja afinidad por sus ligandos, por lo que requieren una activación inducida por otras moléculas (factores solubles, citoquinas, etc.) que provocan un cambio conformacional en la estructura, el cual se traducirá en una mayor afección por su ligando y en algunas ocasiones en un aumento de la densidad antigénica de la molécula (Vignola y col., 1998; Pietruska y col., 2005).

La expresión alterada de estas moléculas de adhesión podría influir la migración y la inapropiada liberación de especies reactivas de oxígeno, iniciándose daño al tejido. En paralelo, niveles plasmáticos de L-selectina soluble reflejarían la interacción de células endoteliales y el daño endotelial. La disfunción de los neutrófilos llevaría a una destrucción inapropiada de tejido, lo que podría jugar un rol clave en la patogénesis de la enfermedad periodontal y podría estar envuelta en la severidad de la enfermedad (Gainet y col., 1999).

1.6_ MECANISMO DE APOPTOSIS DEL NEUTRÓFILO.

Para una correcta respuesta inmune se debe mantener un rango celular apropiado generado por la homeostasis de la población de neutrófilos, que es considerada el balance entre la producción y la muerte celular. La apoptosis es la forma más común de muerte celular fisiológica, por el cual el organismo elimina

las células no deseadas. Esta ocurre en diferentes estadios de la vida, desarrollo embrionario, remodelamiento tisular, regulación inmune, etc. Las células apoptóticas muestran una serie de eventos secuenciales, que comienzan por la activación de un receptor de muerte (FAS-CD95 y TNFR) y se evidencian bioquímicamente por la traslocación de las fosfatidilserinas desde la membrana interna a la externa de la bicapalipídica que conforma la membrana celular, condensación del DNA genómico, el que, posteriormente es fragmentado por acción de endonucleasas activadas formando lo se conoce como cuerpos apoptóticos, activación de la cascada de las caspasas, y la vías de señalización propias de la mitocondria (Schulze-Osthoff y col., 1998).

Los neutrófilos circulantes tienen una vida media corta y un comienzo del proceso apoptótico asociado con algunas funciones importantes, tales como adhesión y fagocitosis, las que eventualmente llevan a la resolución de la inflamación. Esta tendencia a sufrir apoptosis impide al neutrófilo que persista en el sitio de infección y limita su potencial proinflamatorio (Haslett y col., 2003; Cahit y col., 2001). Sin embargo algunas citoquinas como factor de necrosis tumoral α (TNF α), factor estimulante de colonias granulocitos-monocitos (GM-CSF) (Gamonal y col., 2003; Dibbert y col., 1999) y altos niveles de lipopolisacárido y lípido A de *P. gingivalis* podrían provocar un retardo en la apoptosis del neutrófilo por el incremento en la estabilidad mitocondrial, reducción de la actividad de la caspasa-3, y aumento en la producción de interleuquina 1 β , TNF- α e Interleuquina 8 por el neutrófilo (Murray y col., 2003). Otros estudios realizados con extractos de *A. Actinomycetemcomitans* demuestran que estas bacterias producen factores compuestos por proteínas que inducen muerte celular, por fragmentación de DNA y la activación de caspasa-3 (Arakawa y col., 2000).

Algunos autores han demostrado la presencia de células apoptóticas en biopsias gingivales de pacientes con periodontitis, mostrando que menos del 10% del total celular son células apoptóticas (Koulouri y col., 1999; Gamonal y col., 2003). Por otro lado, se ha observado que los neutrófilos circulantes son hiperreactivos, es decir, presentan una mayor respuesta frente a diferentes tipos de estímulos en la enfermedad periodontal (Fredricksson M., 2003; Restaino, 2005).

En relación a los antecedentes presentados, se formula la siguiente hipótesis de estudio:

1.7_ HIPOTESIS.

Los neutrófilos provenientes de sangre periférica de pacientes con periodontitis crónica, presentan un retardo en la muerte celular por apoptosis, activación de los receptores de adhesión Mac-1 (CD11b) y L-selectina (CD62L), en respuesta al patógeno periodontal *P. gingivalis*.

1.8_ OBJETIVO GENERAL.

Determinar el nivel de activación de receptores de adhesión y de la apoptosis de neutrófilos circulantes purificados de pacientes con periodontitis crónica e individuos periodontalmente sanos frente a LPS *E. coli* y extracto bacteriano de patógeno periodontal *P. gingivalis* .

1.9_ OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- a) Selección de pacientes con periodontitis crónica y de individuos periodontalmente sanos como controles.
- b) Purificación de neutrófilos circulantes y caracterización de los receptores L-selectina (CD62L) , Mac-1 (CD11b) y apoptosis.
- c) Estudio del efecto de los extractos de los patógenos periodontales sobre la modulación de la expresión de los receptores de membrana Mac-1(CD11b) y L-selectina (CD62L) de neutrófilos purificados de pacientes con periodontitis y controles sanos.

d) Estudio del efecto del extracto de los patógeno periodontal (*P. gingivalis*) sobre la apoptosis neutrófilos purificados de pacientes con periodontitis y controles sanos.

2._ MATERIALES Y METODOS.

2.1_ CRITERIOS CLINICOS.

1.- Selección de pacientes:

La selección y recepción de los pacientes con periodontitis crónica, se realiza en CDT Dr. Eloiza Díaz, SSMN, complejo hospitalario norte.

2.1.1_ GRUPO DE PACIENTES.

Los pacientes seleccionados deben cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

- a) Presencia de un mínimo de 14 dientes, excluyendo los terceros molares, de los cuales al menos 10 sean dientes posteriores.
- b) Pacientes con periodontitis crónica, que tengan al menos 5-6 dientes con bolsas periodontales de >5mm, con pérdida de inserción osea de >3mm, y pérdida de hueso determinada por métodos radiográficos.
- c) Ausencia de tratamiento periodontal.

- d) Sin enfermedad sistémica.
- e) Sin medicación de antibióticos o de antiinflamatorios no esteroideos en los últimos 6 meses.

2.1.2_ GRUPO CONTROL.

La selección del grupo control, se realizó entre sujetos voluntarios periodontalmente sanos, determinada por la ausencia de pérdida de inserción clínica asociada a infección y ausencia de bolsas periodontales.

El protocolo de estudio fue explicado a todos los pacientes y sujetos sanos y se firmó con ambos grupos el consentimiento informado. El protocolo establece que, dentro del periodo comprendido a las dos semanas siguientes a la detección de la patología todos los pacientes serían sometidos a tratamiento periodontal (**Anexo 1**).

2.2_ AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

Las muestras de sangre periférica se recogen en tubos heparinizados de 10 ml. Estas muestras son procesadas en tubos de centrifuga de 50 ml (Falcon) donde son diluidas 1:1 con amortiguador **PBS 1X**, para luego formar dos fases sobre Ficoll-Hypaque (Sigma) en dilución 1:2, obteniéndose un pellet de neutrófilos y eritrocitos luego de una centrifugación a 1500 rpm por 30 min (centrífuga de sobremesa Heraeus). El pellet resuspendido 1:1 en PBS 1X, se le adiciona 20 ml de dextrano al 3% en NaCl 0.9%. La fase de arriba de esta solución es rica en neutrófilos y es recuperada para centrifugación a 1500 rpm por 10 min. En el pellet resultante son lisados los eritrocitos con 1 mL de buffer de lisis (155 mmol/L NH₄Cl, 10 mmol/L Na₂CO₃, 0,1 mmol/L EDTA pH 7,4 ajustado con HCl) a 4°C por 5 min para ser centrifugado por otros 5 min a 1100 rpm, el pellet es lavado con 10 ml de PBS 1X por 3 veces. El pellet es resuspendido en 2 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1% glutamina, penicilina (100 UI/ml) y gentamicina (50 µg/ml).

Las células se cuentan en una cámara de Neubauer en una dilución 1:1 de la muestra con azul de tripán (Sigma). Se siembran 1x10⁶ células/ml en cada

pocillo de la placa, los estímulos son: LPS 1µg/ml, y extracto bacteriano de *P. gingivalis* (dilución 1:1000). Las células se incuban por 4 y 8h a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad.

2.3_ EXTRACTO BACTERIANO *P. gingivalis* (Pg).

Los extractos bacterianos se obtuvieron en el laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, a partir de la muestra proveniente de un paciente con periodontitis crónica. Las muestras microbiológicas provenientes de pacientes con periodontitis crónicas son diluidas a 10² y 10³ en un amortiguador de dilución, para posteriormente sembrarse en agar sangre (Blood agar N°2, Oxoid), 1% bacto agar (Becton Dickinson), con 0,005% de Hemina, 0,005% Menadiona y 5% de sangre equina mantenidas a 37°C en anaerobiosis por 7 días. Luego se selecciona por medio de una lupa, que permite identificar y cuantificar del porcentaje de colonias de bacterias Pg en la placa de cultivo. Se traspasan aquellas colonias interés a una placa de agar sangre, que son incubadas por 7 días a 37°C en anaerobiosis. Posteriormente, el cultivo se utiliza para ser congelado en criotubos con criobolas y para un cultivo líquido (Herat infusión agar (Becton Dickinson) suplementado con 0,005% de Hemina, 0,005% Menadiona) mantenido a 37°C en anaerobiosis por 7 días. Luego de completado su crecimiento, se centrifugan y resuspenden en amortiguador de lisis (buffer fosfato 0,1 M pH 7,2) y se sonicán por 15 min.

2.3.1_ EXTRACTOS BACTERIANOS Y VIABILIDAD CELULAR.

Para determinar la dilución de trabajo se realizan cultivos con neutrófilos, purificados de bolsa de donantes, a 0, 4 y 8 h con concentraciones crecientes del extracto bacteriano de *P. gingivalis* (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Pasadas las horas de incubación las células se centrifugan a 1500 rpm por 3 min a 4°C, se descarta el sobrenadante; se mantiene la temperatura a 4°C, se traspasan las células resuspendidas con 500 µl de PBS 1X a tubos de citometría y se agregan 10 µg/ml de Ioduro de Propidio (PI) para realizar el análisis de la fluorescencia por citometría de flujo. El PI es un intercalante del DNA. A medida que las células

comienzan a morir, la membrana celular se daña por lo que deja entrar mas IP a la célula por simple difusión, por lo tanto a mayor florescencia registrada por el citómetro de flujo hay mayor muerte celular.

2.3.2_ DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE EXTRACTO BACTERIANO.

Se realizo por análisis de proteínas utilizando el kit de Pierce (USA) basado en ácido bicinconinico (BCA) que combina la capacidad reductora de Cu^{2+} a Cu^{+} por proteínas, en un medio alcalino, a través de detección colorimetría. Se siguieron las instrucciones del fabricante realizando una curva estándar tomando concentraciones de 2 $\mu g/ml$ a 20 $\mu g/ml$ en un volumen de muestra de 0,5 ml. Las muestras mezcladas 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 incubo por media hora a 60°C. Se dejo enfriar a temperatura ambiente y se registro la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Se determinó la ecuación de la recta de acuerdo a los puntos obtenidos y absorbancia y concentración. Se tomaron concentraciones de los extractos bacterianos de 5, 10 y 20 μl , se completo a un volumen de 0,5 ml con agua destilada y se realizo el análisis de proteínas con BCA por espectrofotometría. De acuerdo a los valores obtenidos de absorbancia y a la curva estándar se determino la concentración de proteínas del extracto bacteriano de *P. gingivalis*.

2.4_ CITOMETRIA DE FLUJO.

2.4.1_ MUERTE POR APOPTOSIS (Método Sub-G1).

Inmediatamente después de purificados los neutrófilos y posterior a las 4 y 8 horas de incubación se centrifuga a 1500 rpm por 3 min a 4°C (centrifuga sobremesa Heraus), se descarta el sobrenadante; a las células resuspendidas en

PBS 1X luego de ser permeabilizadas con etanol 70% a 4°C por 1 hora mínimo se le agrega RNAasa (0,5 mg/ml) (Sigma) en concentración 0,5 mg/ml por tubo a temperatura ambiente, luego de 30 min son marcadas con IP (10 µl/ml)(Sigma). Se analizan estas células marcadas por el citómetro de flujo (Becton Dickinson) por el software CellQuest. Los neutrófilos son células diferenciadas, por lo que salen del ciclo celular a G₀, teniendo la misma concentración de DNA que si se encontrara en G₁, y a medida que las células comienzan a morir, el DNA genómico celular, se compacta y fragmenta, teniendo así mayor impedimento estérico para que se intercale el IP. Por lo que el citómetro nos entrega una imagen, en la que vemos una emisión que nos indica las células que se encuentran en G_{0/1} del ciclo celular vivas, el RNA no degradado por sobre este umbral y a menor emisión las células apoptóticas.

2.4.2_ RECEPTOR DE SUPERFICIE L-selectina (CD62L) Y Mac-1 (CD11B).

Las células obtenidas después de centrifugación a 1500 rpm por 3 min a 4°C; sin incubación e incubadas 4 y 8 horas, se descarta el sobrenadante, se marcan con el cromóforo verde (FITC Pharmingen) anti-CD62L, y cromóforo naranja [Phycoerythrin (PE), Pharmingen] uniéndose a CD11b, se incuban por 30 min a temperatura ambiente y oscuridad, luego las células son lavadas con PBS 1X y centrifugadas a 1500 rpm por 3 min para descartar partículas de cromóforo que no se unieron al receptor; las células son fijadas en paraformaldehído 1% para posteriormente ser traspasadas a tubos de citometria (Becton Dickinson) y diluidas con 300 µl de PBS 1X, y entregadas al citómetro, para su análisis por el respectivo. Haciendo un control interno de autofluorescencia (células sin el marcador) ubicado antes de 10¹ para cada uno de los estímulos y basales.

2.5_ TINCIÓN DE GIEMSA.

Una vez resuspendidos los neutrófilos puros en medio de cultivo RPMI 1640 completo se toman 20 µl de la muestra y se extiende en un porta objeto con un

cubre objetos, se deja secar a temperatura ambiente, luego se sumerge el porta en la solución Giemsa 5% en etanol 70% (Sigma) por 20 min para luego fijarlo en metanol al 96%.

2.6_ ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Las mediciones realizadas a ambos grupos, pacientes con periodontitis crónica y controles periodontalmente sanos, se analizaron calculando el promedio +/- la desviación estándar. Las mediciones a ambos grupos se comparó utilizando el test-t Student pareado y no pareado además del test de ANOVA, para los datos que aprobaron el test de normalidad. Para aquellos datos que no pudieron ser normalizados después de la transformación de los datos, se realizó un test no paramétrico llamado test de Kruskal-Wallis. Todos los test estadísticos fueron realizados en el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.0.

3._ RESULTADOS.

3.1._ SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE TRABAJO.

Los análisis de neutrófilos purificados de sangre periférica se realizaron a partir del grupo de pacientes que incluyó a 11 pacientes adultos diagnosticados con periodontitis crónica y 8 sujetos pertenecientes al grupo control periodontalmente sanos seleccionados según los criterios de inclusión descritos en la sección 2.1. Dentro de ambos grupos los hombres son un número

restringido, siendo 2 en el grupo pacientes y 3 en el grupo control. Los valores de los niveles de inserción clínico promedio por grupo y el promedio de profundidad de bolsa periodontal en boca, entre otros datos clínicos, se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Características clínicas de los sujetos con periodontitis crónica y el grupo de los controles. Datos corresponden a los valores promedios \pm desviación estándar y su significación estadística.

CARACTERISTICA	GRUPO PACIENTES (n=11)	GRUPO CONTROL (n=8)	SIGNIFICACION ESTADISTICA
Edad (años)	41,09 \pm 5,43	38,45 \pm 7,79	No Significativo
% Mujeres	81,81(9)	62,5 (5)	
Bolsa Periodontal (mm)	3,06 \pm 0,45	1,98 \pm 0,41	p = 0.002
Nivel de Inserción Clínico (mm)	3,28 \pm 0,81	0,62 \pm 0,35	p = 0.001
Índice de Placa	61,43 \pm 9,05	18,10 \pm 9,8	p = 0.002
Sangramiento al Sondaje (%)	48,35 \pm 17,98	8,44 \pm 10,10	p = 0.005

3.2._ CARACTERIZACION DE NEUTRÓFILOS.

Inmediatamente después de la purificación de neutrófilos de sangre periférica de los sujetos enfermos y sanos (sección 2.2), se procede a la caracterización de la población en estudio. Lo primero consistió en cuantificar las células, lo que arrojó que en individuos sanos y de enfermedad periodontal no existe diferencia lo que permite descartar neutropenia (**Tabla 3.2**).

Los neutrófilos se caracterizaron por medio de citometria de flujo donde se pudo distinguir a una sola población celular mostrada en la **Figura 3.2.1**, que corresponde a los neutrófilos purificados. Con este mismo fin se realizo la tinción celular como se especifica en la sección 2.5.

TABLA 3.2. CARACTERISTICAS DE LA POBLACION EN ESTUDIO: Datos corresponden a los valores promedios \pm desviación estándar.

CARACTERISTICA	RANGO NORMAL	PACIENTES (n=11)	CONTROLES (n=8)
----------------	--------------	---------------------	--------------------

Recuento neutrófilos	1,5x10 ⁶ – 7,5x10 ⁶	2,9x10 ⁶	3,04x10 ⁶
Desviación Standard		1,73	2,11

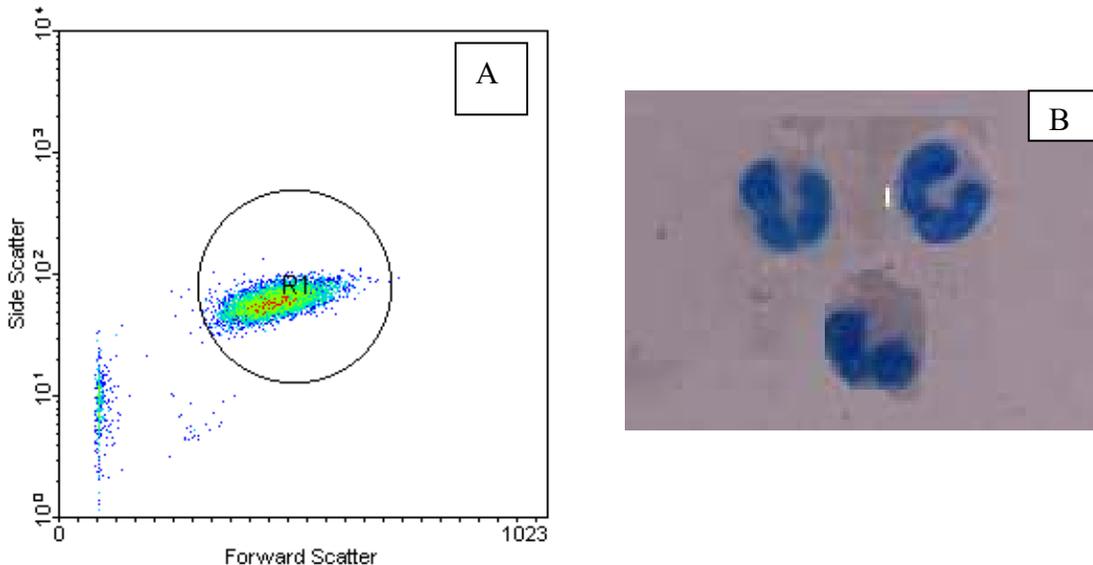


Fig. 3.2.1_ Esquema representativo de neutrófilos. (A) Diagrama de densidad de citometria de flujo de la población de neutrófilos purificados identificada por tamaño celular (“forward scatter”) versus complejidad celular (“side scatter”) encerrada en un círculo. (B) Tinción Giemsa de neutrófilos purificados, donde se observan los núcleos multilobulados.

3.3_CITOMETRIA DE FLUJO

3.3.1_ RECEPTOR DE SUPERFICIE L-SELECTINA (CD62L)

Para analizar la expresión del receptor de adhesión CD62L, se hizo primero la incubación de neutrófilos, por 0 (T0), 4 (T4) y 8 h (T8). Transcurrido el tiempo de cultivo, se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) de acuerdo a lo indicado en la sección 2.4.2. En un histograma representativo de neutrófilos estimulados se observa la disminución en MFI con respecto a los neutrófilos no estimulados (**Fig. 3.3.1.1**).

Con el objetivo de estudiar el efecto del tiempo sobre la expresión de CD62L en neutrófilos del grupo pacientes y controles sin estímulo (basales) se

compararon estadísticamente estos dos grupos a los tiempos T0, T4 y T8. Los resultados muestran una mayor expresión inicial de CD62L en neutrófilos de controles en comparación con los de pacientes (**Figura 3.3.1.2**). Esta diferencia es estadísticamente significativa a T0 y T4 con un $p < 0,02$ y $p < 0,01$ respectivamente; a T8 los valores del grupo control disminuyen igualándose a los valores de pacientes, no alcanzando significación estadística.

La **Figura 3.3.1.3** muestra el gráfico de expresión del receptor de superficie CD62L sobre neutrófilos de controles y pacientes frente al estímulo de LPS *E. coli*, donde se observa una clara disminución estadísticamente significativa ($p < 0,02$) de ambos grupos frente al estímulo, comparados con su respectivo basal. La expresión de CD62L fue medida al estimular los neutrófilos de ambos grupos con extracto de *P. gingivalis*, se observó una disminución en el tiempo en ambos grupos, sin alcanzar significación estadística, (**Figura 3.3.1.4**).

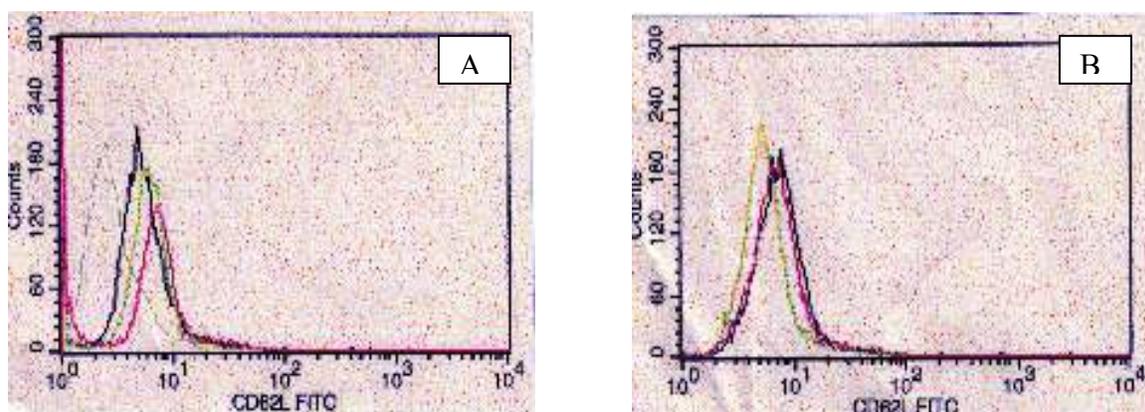


Fig 3.3.1.1_ Histograma representativo del marcaje con CD62L. Los neutrófilos purificados se marcan con anticuerpo anti-CD62L, basales y estimulados con LPS (1 μ g/ml) y extracto de *P. gingivalis* (dilución 1:1000), analizados por citometría de flujo. (A) Incubación celular por 4h. (B) incubación celular 8h. --- autofluorescencia, ---- basal, ---- estímulo con LPS *E. coli*, ---- estímulo con extracto de *P. gingivalis*.

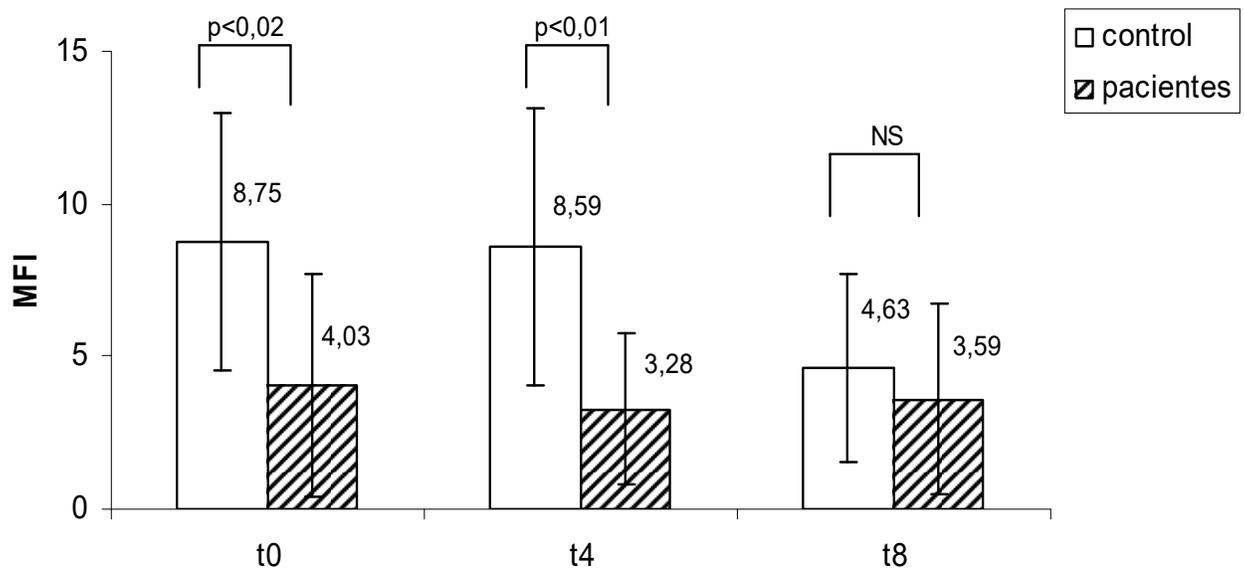


Fig 3.3.1.2_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD62L. Valores promedio basales de expresión del marcador de superficie CD62L en neutrófilos del grupo pacientes y grupo control a T0, T4 y T8 analizados por el t-test Student no pareado. El test de Anova se utilizó para el análisis de los valores basales de controles y basales de casos por separado, todos los datos aprobaron el test de normalidad. \square =comparación entre las dos barras indicadas. $|$ = desviación estándar. El número sobre las barras, indica el valor promedio. NS = estadísticamente no significativo.

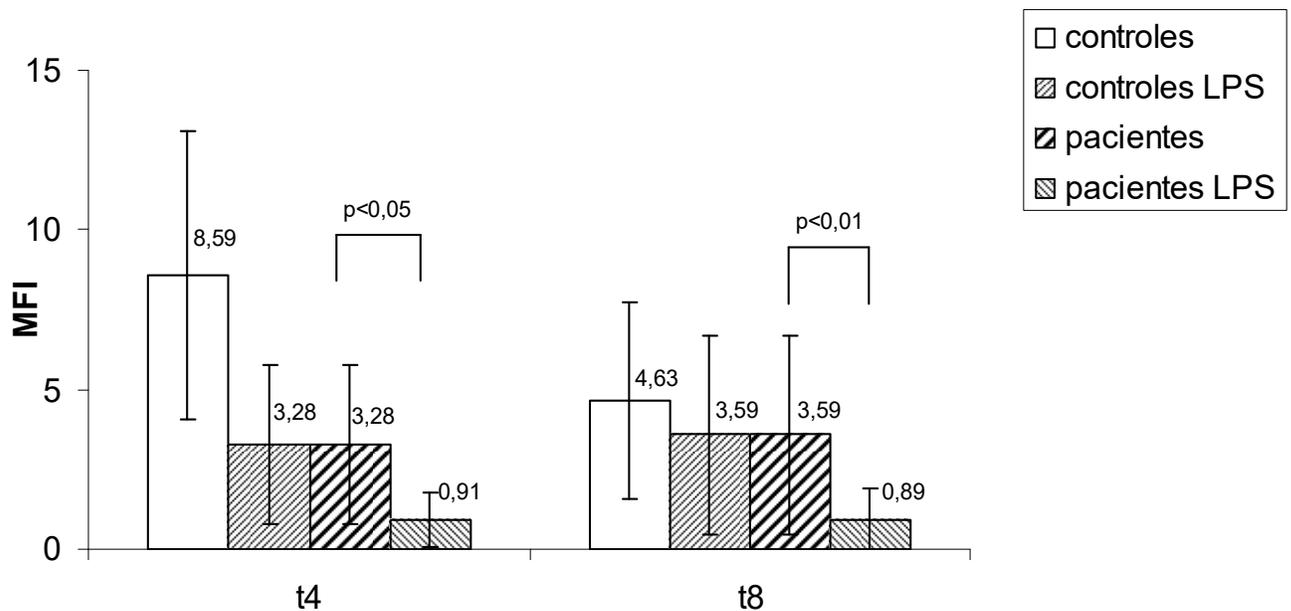


Fig 3.3.1.3_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD62L frente a LPS *E.coli*. Expresión del marcador de superficie CD62L en neutrófilos, valores basales y estimulados con LPS *E.coli* (1µg/ml) de grupo casos y grupo control a T4 y T8. Los datos de los pacientes fueron analizados por el test de Kruskal-Wallis (test no paramétrico) y test de ANOVA para los controles. \square =comparación entre las dos barras indicadas. $|$ = desviación estándar. El número sobre las barras, indica el valor promedio.

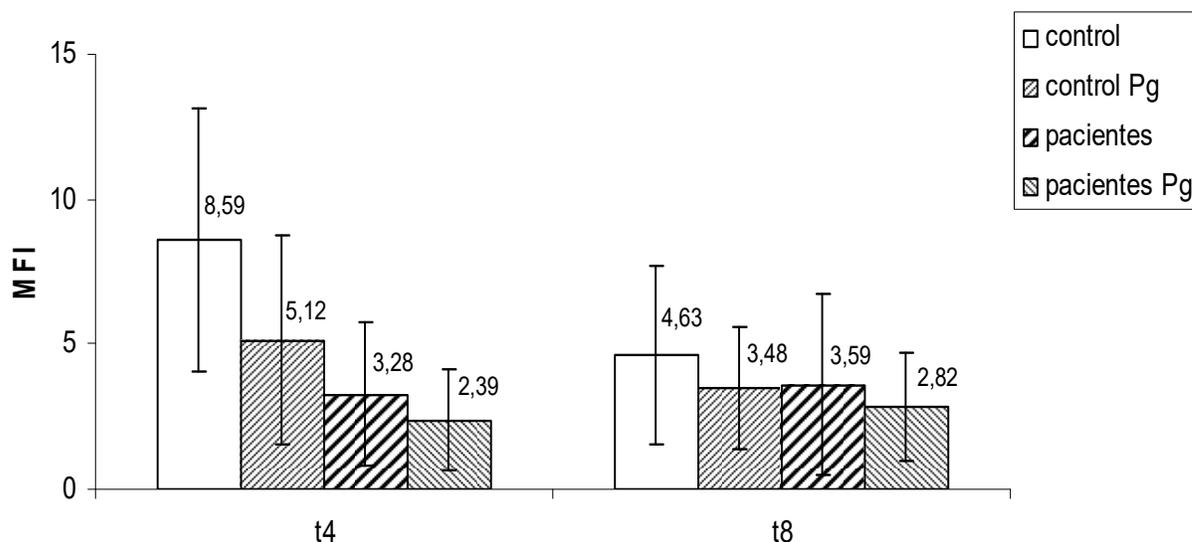


Fig 3.3.1.4_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD62L frente a extracto de *P. gingivalis* . Expresión del marcador de superficie CD62L en neutrófilos, valores basales y estimulados con extracto de *P. gingivalis* (dilución 1:1000) de grupo pacientes y grupo control a T4 y T8. Los datos basales controles-*P. gingivalis*, pacientes-*P. gingivalis* fueron analizados por Kruskal-Wallis (test no paramétrico). |—| = desviación estándar. El número sobre las barras, indica el valor promedio.

3.3.2._ RECEPTOR DE SUPERFICIE Mac-1 (CD11b)

La expresión del receptor de adhesión CD11b, se realizó midiendo la intensidad de fluorescencia media (MFI) de acuerdo a lo indicado en la sección 2.4.2. En la **Fig. 3.3.2.1.** se representa un histograma típico del desplazamiento de MFI de neutrófilos estimulados con respecto a un basal. El efecto del tiempo sobre la expresión de CD11b en neutrófilos del grupo casos y control se midió por el cambio en la MFI a T0, T4 y T8. Los resultados muestran una mayor expresión inicial de CD11b en neutrófilos de controles en comparación con los pacientes (**Figura 3.3.2.2**), que disminuye en el tiempo. Esta diferencia entre los controles y pacientes es estadísticamente significativa a los tiempos T0 y T4, ya que a T8 los niveles de controles se igualan a los de pacientes.

Si los neutrófilos son estimulados con LPS *E. coli* (**Figura 3.3.2.3**), en el grupo control y el grupo pacientes, observamos un aumento de la expresión de CD11b a los tiempos de incubación, estadísticamente significativos en el grupo control ($p < 0,001$) y grupo pacientes ($p < 0,01$). Existe una disminución de MFI en los neutrófilos estimulados con LPS *E. coli* desde las 4 a las 8 h en ambos

grupos, con un $p < 0,001$ en el grupo control. Al enfrenar los neutrófilos al extracto de *P. gingivalis* (Figura 3.3.2.4) se observa un aumento en la MFI, siendo estadísticamente significativa la relación de los valores basales del grupo control y los estimulados del mismo a lo largo del tiempo de incubación. La MFI de neutrófilos estimulados de controles disminuye desde las 4 a las 8 h ($p < 0,001$). En el grupo pacientes se encontró significación estadística entre el basal a 8 h y el estímulo de la misma hora ($p < 0,01$).

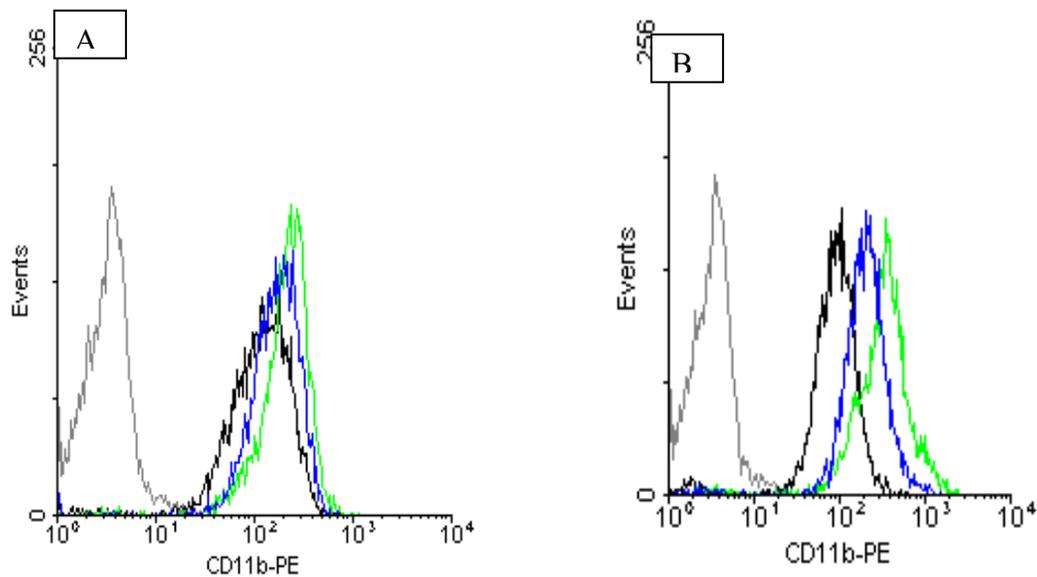


Fig 3.3.2.1_ Histograma representativo del marcaje con CD11b. Los neutrófilos purificados se marcan con anticuerpo anti-CD11b, basales y estimulados con LPS *E.coli* (1 μ g/ml) y extracto de *P. gingivalis* (dilución 1:1000), analizados por citometría de flujo. (A) Incubación celular por 4 h. (B) incubación celular por 8 h. --- autofluorescencia, ---- basal, ---- estímulo con LPS *E. coli*, ---- estímulo con extracto de *P. gingivalis*.

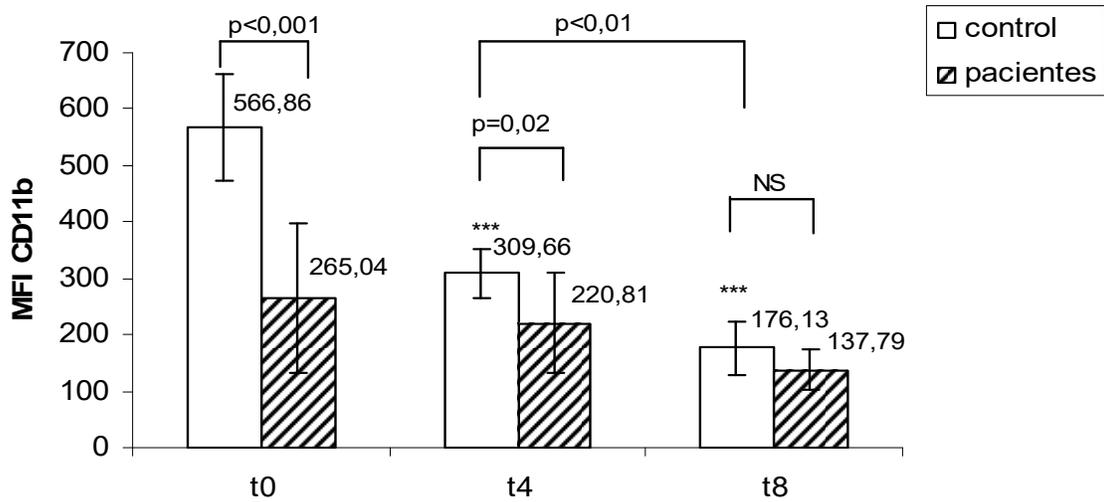


Fig 3.3.2.2_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD11b. Valores basales de expresión del marcador de superficie CD11b en neutrófilos del grupo pacientes y grupo control a T0, T4 y T8. Los datos de los basales controles y pacientes fueron analizados por t-test Student no pareado. El test de ANOVA se utilizó para el análisis de los de controles y pacientes en el tiempo, todos los datos aprobaron el test de normalidad. \square = comparación entre las dos barras indicadas. $|$ = desviación estándar ***= significación ($p<0,001$) con respecto al basal T0 del grupo control. El número sobre las barras, indica el valor promedio.

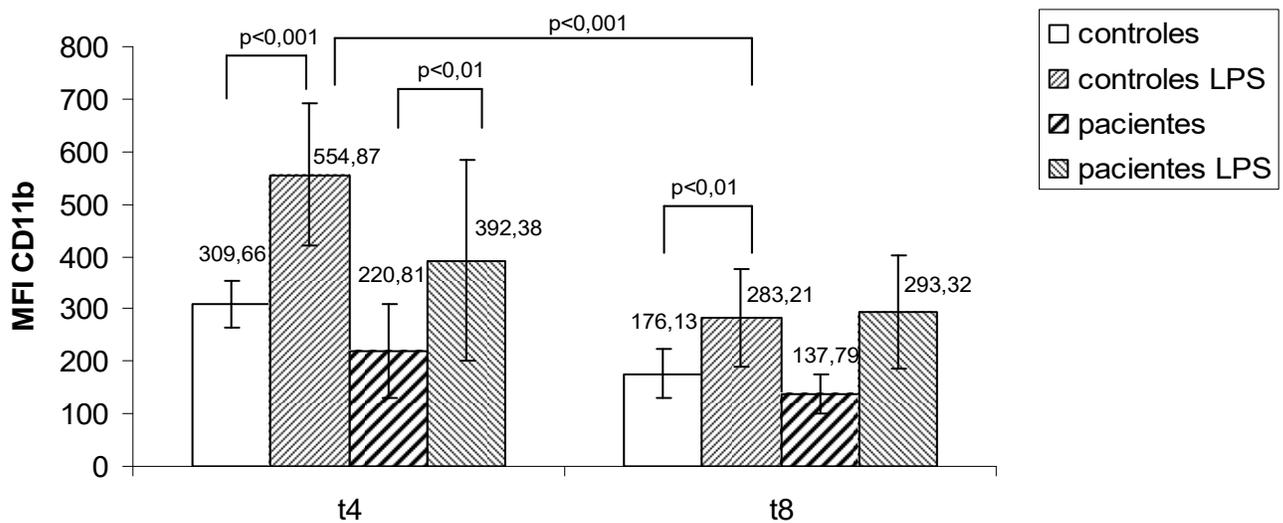


Fig 3.3.2.3_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD11b frente a LPS *E.coli*. Expresión del marcador de superficie CD11b en neutrófilos, valores basales y estimulados con LPS *E.coli* (1,0 $\mu\text{g/ml}$) de grupo pacientes y grupo controles a T4 y T8. Los datos se analizaron por el test de ANOVA para el grupo control, y t- Student pareado para el grupo pacientes. Todos los datos aprobaron el test de normalidad. \square = comparación entre las dos barras indicadas. $|$ = desviación estándar. El número sobre las barras, indica el valor promedio.

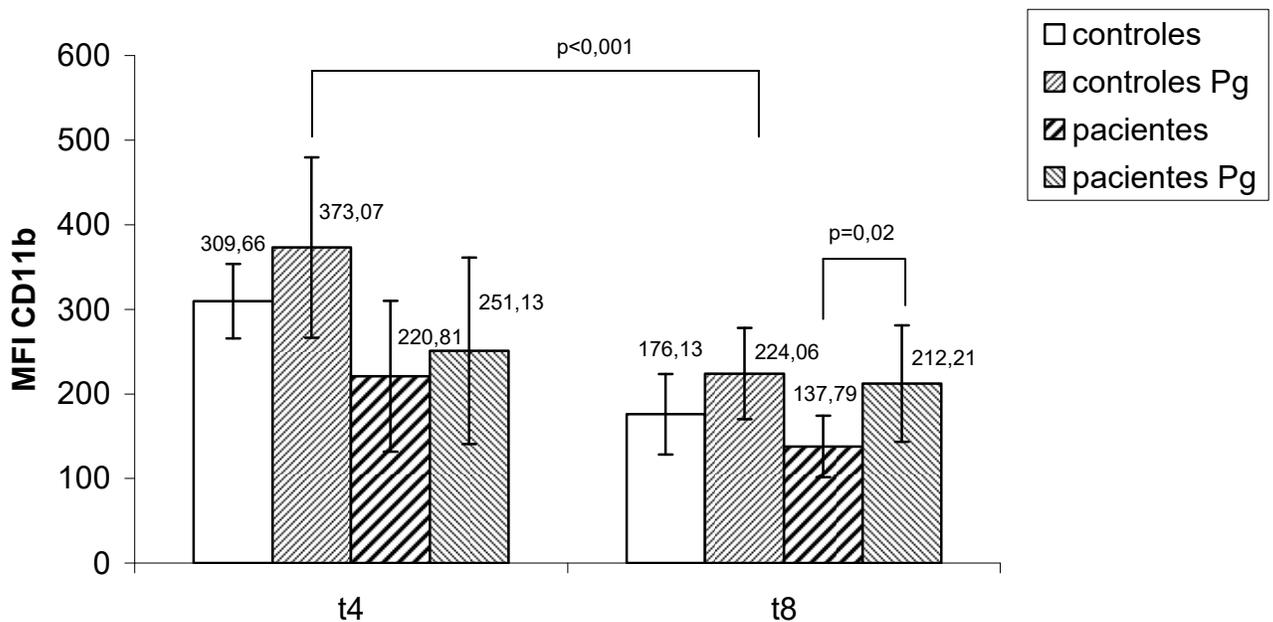


Fig 3.3.2.4_ Intensidad de Fluorescencia (MFI) CD11b frente a extracto *P. gingivalis* . Expresión del marcador de superficie CD11b en neutrófilos en basales y estimulados con *P. gingivalis* (dilución 1:1000I) de grupo casos y grupo control a T4 y T8. los datos se analizaron por el test de ANOVA para el grupo control, y t- Student pareado para el grupo casos. Todos los datos pasaron el test de normalidad. \square =comparación entre las dos barras indicadas. $|$ = desviación estándar. El número sobre las barras, indica el valor promedio.

3.4._ ESTUDIO DE APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS: METODO SUB-G_{1/0}.

La apoptosis se midió por el método sub-G₁ que permite detectar apoptosis con un solo fluorocromo, el Ioduro de Propidio de acuerdo a lo indicado en la sección 2.4.1. a T0, T4 y T8. La **Fig 3.4.1** muestra un resultado representativo de la apoptosis de neutrófilos de pacientes (A) y controles (B); de acuerdo a lo observado solamente los neutrófilos de controles presentan apoptosis basal.

La apoptosis en el grupo control se encuentra aumentada con respecto al grupo pacientes desde el T0. La apoptosis de neutrófilos de pacientes aumenta e iguala a la del grupo de control (**Fig. 3.4.2**), a las 8 horas de incubación. El estudio del efecto de LPS *E. coli* y extracto de *P. gingivalis*, no alteró el porcentaje de apoptosis de los neutrófilos de ambos grupos (**Fig. 3.4.3 y Fig. 3.4.4**).

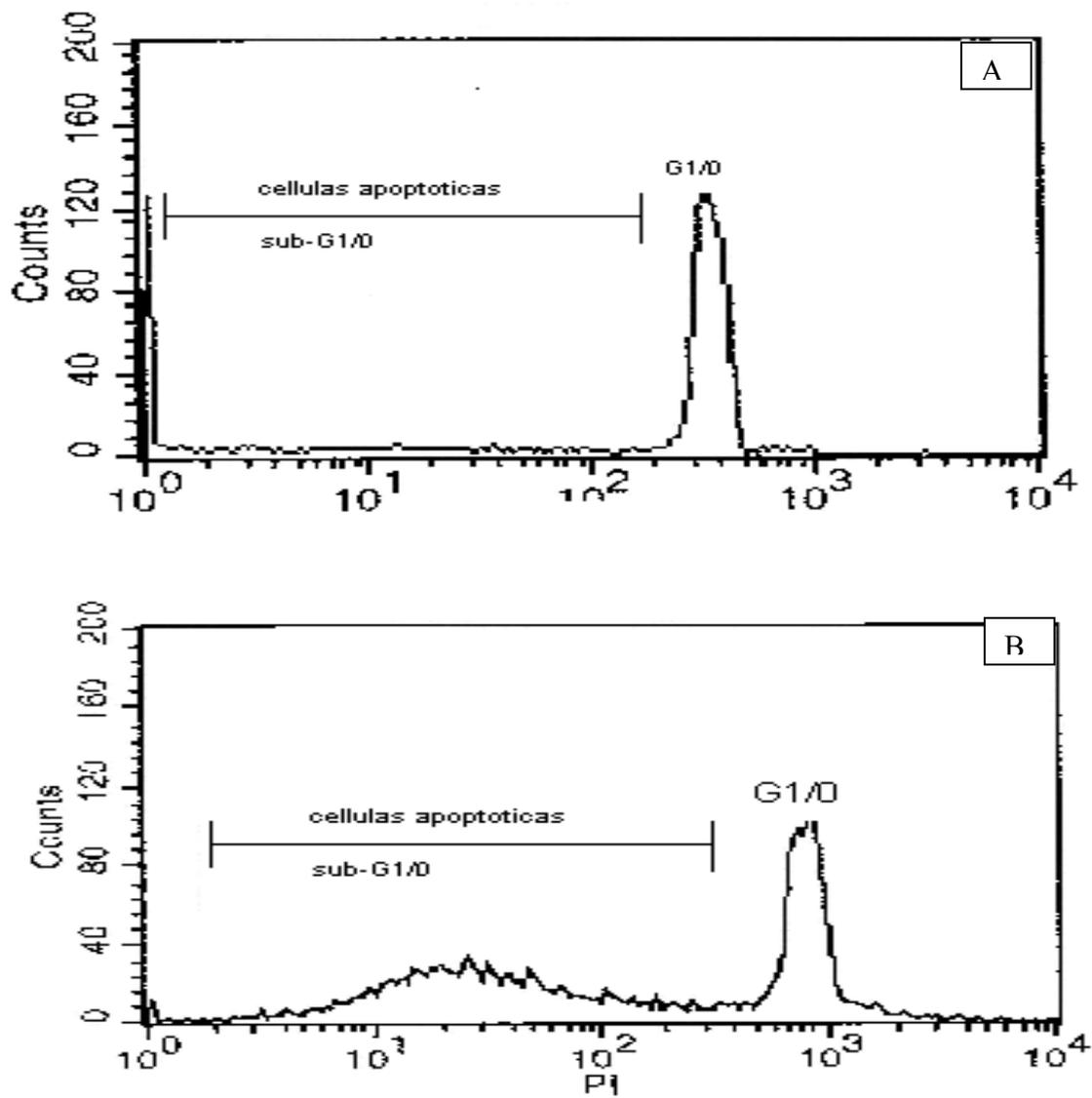


Fig 3.4.1_ Histograma representativo de apoptosis por método sub-G_{1/0}. Los neutrófilos purificados de controles y pacientes se marcan con PI (10 µg/ml), en presencia de RNAasa (0.5 mg/ml), determinando su porcentaje apoptótico por medio del método sub-G_{1/0}. (A) Región sub-G₁, neutrófilos de pacientes, no se observa población apoptótica. (B) Región sub-G₁, neutrófilos de controles, se encuentran las células muertas en la región sub-G₁ señalada.

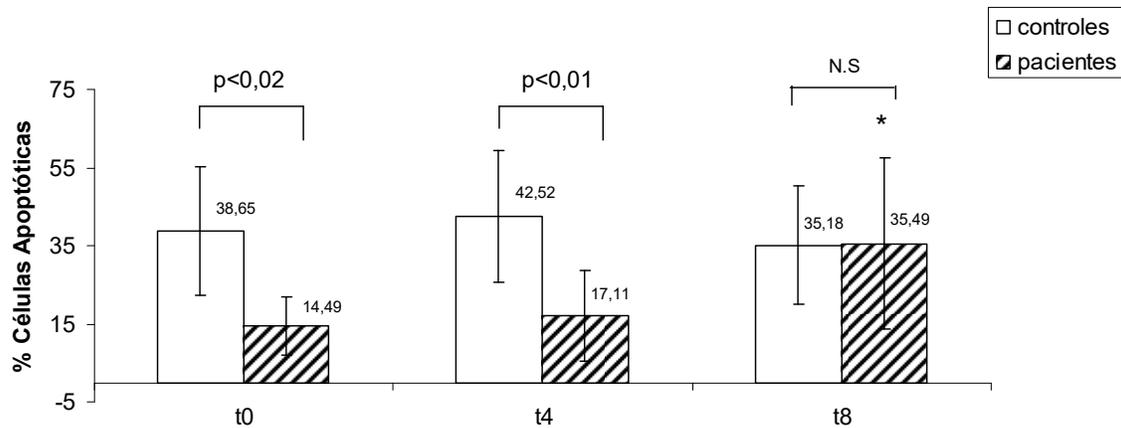


Fig 3.4.2_ Porcentaje de células apoptóticas. La apoptosis se midió en neutrófilos de pacientes y controles a los tiempos indicados según el método sub- $G_{0/1}$. Los datos se analizaron por t-Student no pareado, todos los datos pasaron el test de normalidad. \square = comparación entre las dos barras indicadas. $|$ = desviación estándar. El número sobre las barras, indica el valor promedio. NS = estadísticamente no significativo.

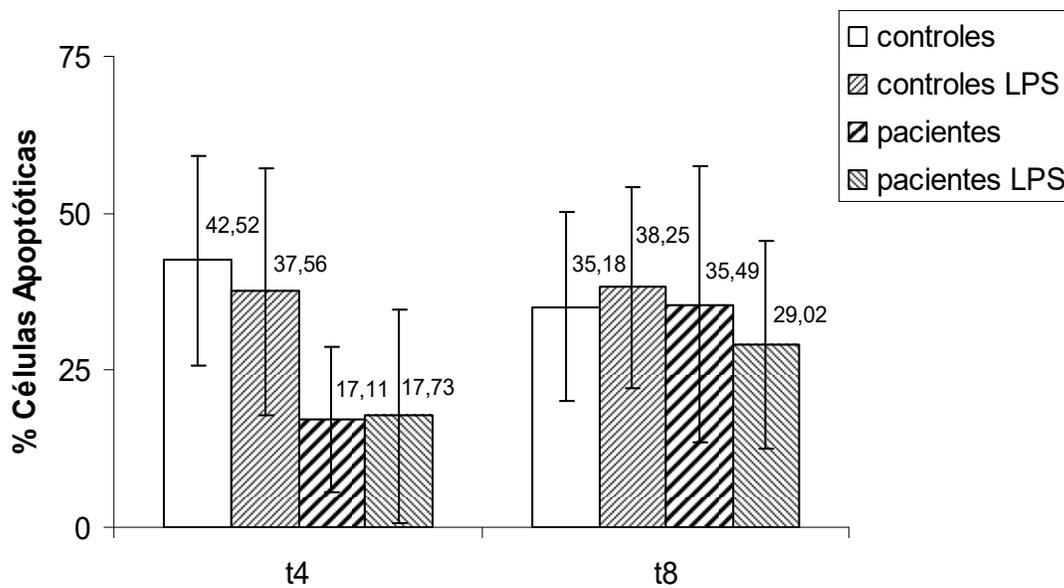


Fig 3.4.3_ Porcentaje de células apoptóticas estimuladas con LPS *E. coli*. La apoptosis se midió en neutrófilos estimulados con LPS *E. coli* ($1\mu\text{g/ml}$) y comparado con los respectivos basales a los tiempos T4 y T8 del grupo pacientes y grupo control según el método de sub- $G_{0/1}$. Los datos se analizaron por ANOVA, todos los datos pasaron el test de normalidad. $|$ = desviación estándar. El número sobre las barras, indica el valor promedio.

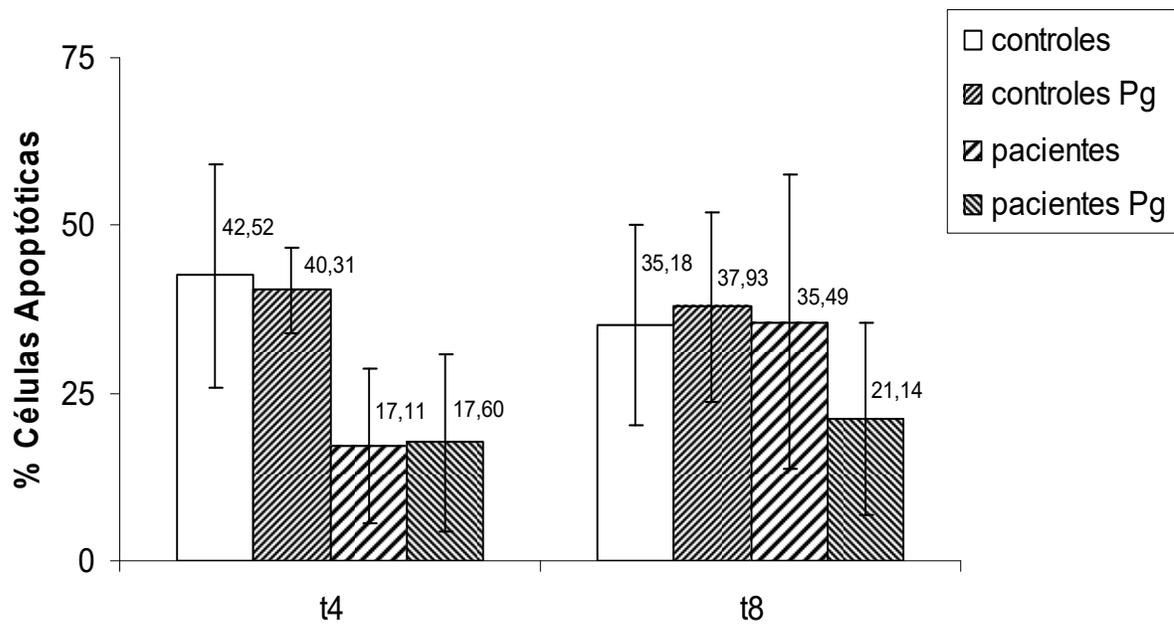


Fig 3.4.4_ Porcentaje de células apoptóticas estimuladas con extracto de *P. gingivalis* . La apoptosis se midió en neutrófilos estimulados con extracto de *P. gingivalis* (dilución 1:1000), comparados con los respectivos niveles basales de tiempo del grupo pacientes y grupo control según el método de sub-G_{0/1}. Los datos se analizaron por ANOVA, todos los datos pasaron el test de normalidad. |—| = desviación estándar. El número sobre las barras, indica el valor promedio.

4.-DISCUSIÓN.

4.1_ NEUTRÓFILOS Y PERIODONTOPATOGENOS EN PERIODONTITIS.

Los neutrófilos son importantes mediadores de la respuesta inmune innata, la primera etapa de la inmunidad anti-bacteriana. El interés de este trabajo radica en la participación de estas células en la defensa del organismo y en su capacidad de reconocimiento frente a patógenos infecciosos, dentro de los cuales se encuentran los periodontopatogenos, bacterias anaerobias que activan la

respuesta inflamatoria a través de los neutrófilos. Las bacterias al adherirse a la superficie del diente dificultan la respuesta fagocítica de los neutrófilos (Claesson y col., 2002). La bacteria periodontal *P. gingivalis*, es capaz de incrementar la producción de IL-8 desde los neutrófilos en pacientes con periodontitis progresiva. El LPS de esta bacteria induce al neutrófilos a liberar de H₂O₂ (radicales de oxígeno) (Gainet y col., 1999). En el estudio de Fredriksson (2003), se publica que la liberación total (extra e intracelular) de H₂O₂ desde los neutrófilos de pacientes con periodontitis, fue significativamente más alta *in vitro* después de su activación con bacterias opsonizadas con respecto a los controles.

En la enfermedad periodontal, la disfunción de neutrófilos conduciría a una destrucción inapropiada del tejido, teniendo un papel en la patogénesis de la enfermedad y en la severidad de la misma (Gainet y col., 1999). Algunos autores han publicado que neutrófilos de pacientes con periodontitis tienen una respuesta inmune normal o incluso elevada; sin embargo otros autores sostienen que neutrófilos activados y en reposo tienen disminuida su actividad inmune. Es decir, no solamente la respuesta observada es muy compleja, sino que también va a depender de la etapa en que se estudie esta patología (Gainet y col., 1999; Fredriksson y col., 2003).

4.2_ MOLÉCULAS DE ADHESIÓN MAC-1 (CD11b) Y L-SELECTINA (CD62L).

4.2.1 Expresión de CD11b. En pacientes post-operados, el daño en el tejido ha sido asociado con una alta expresión de CD11b sobre la superficie de neutrófilos, en intervalos de 1-4 h (Fassbender y col., 1999).

En pacientes con shock séptico los niveles de expresión de CD11b fueron incrementados con respecto a los niveles del grupo control. En este estudio se asoció la mayor expresión de la integrina con la reducción de la quimiotaxis del neutrófilo (Ahmad y col., 2004).

Se estudiaron los niveles de mRNA de CD11b y CD16 en neutrófilos de periodontitis agresiva, crónica y controles sanos, no encontrándose diferencias significativas (Kubota y col., 2000). Los valores de la MFI de CD11a, CD11b y CD11c, en monocitos y los niveles de CD11b de linfocitos de pacientes con

periodontitis agresiva fueron significativamente más altos que en los controles (Pietruska y col., 2005).

En nuestro trabajo los niveles de MFI de CD11b en neutrófilos de pacientes con periodontitis crónica muestran una expresión disminuida a lo largo del tiempo, la que en el grupo control va disminuyendo en forma significativa hasta las 8h de incubación donde la expresión se iguala. El LPS de *E. coli* estimula los neutrófilos de ambos grupos, pero solo en los controles este aumento tiene significación estadística. El extracto bacteriano de *P. gingivalis* también estimula pero en muy baja proporción a los neutrófilos de ambos grupos. Estos resultados sugieren que los neutrófilos en esta patología podrían tener una quimiotaxis y una adhesión al endotelio disminuida.

4.2.2. Expresión de CD62L. Los cambios en la densidad celular de CD62L son estrechamente reflejados en la respuesta de CD11b. Los bajos niveles de L-selectina llevan a una reducción en la habilidad de “rolling” y migración celular; esta observación puede tener importancia en el reclutamiento leucocitario en la inflamación y el daño celular (Fassbender y col., 1999). El “cross-linking” de L-selectina induce alteraciones fisiológicas importantes en neutrófilos, incluyendo cambios en sus propiedades y alteraciones en la distribución y activación de CD11b, durante la interacción entre el endotelio y el lecho microvascular, selectinas e integrinas participan secuencialmente en la localización de neutrófilos en los sitios inflamatorios (Simon y col., 1999).

Además de encontrarse unida a la membrana plasmática, CD62L se encuentra de forma soluble, por lo que los niveles plasmáticos de la forma soluble reflejarían la interacción de células endoteliales y daño endotelial. Estos niveles se han visto disminuidos en periodontitis progresiva, sugiriendo la unión de L-selectina soluble para activar las células endoteliales (Gainet y col., 1999).

Entre los escasos trabajos de este marcador de neutrófilos y enfermedad periodontal, la MFI de L-selectina (CD62L), se encontró disminuida en pacientes con periodontitis con respecto a los sujetos sanos. Mostrando una desregulación del corte de L-selectina (Pietruska y col., 2005; Gainet y col., 1999).

Nosotros encontramos que CD62L de los pacientes se encuentra muy disminuido. El grupo control va disminuyendo su expresión en forma significativa

hasta las 8h de incubación donde MFI de pacientes y controles es similar. Al ser estimulados los neutrófilos de ambos grupos con LPS *E.coli* o extracto de *P. gingivalis*, la expresión de CD62L disminuye en el tiempo comparado con las células no estimuladas, lo que se encuentra acorde con otros resultados de la literatura. La disminución de MFI de CD62L no alcanza a ser estadísticamente significativa. Esta expresión disminuida de CD62L en pacientes con periodontitis crónica podría traducirse en una menor capacidad del neutrófilo para su reclutamiento en el tejido.

4.3_ APOPTOSIS Y ENFERMEDAD

De forma simple, las enfermedades en las que la apoptosis se ha implicado pueden dividirse en dos grupos: aquellas en las que ocurre un incremento en la muerte celular (y por tanto una apoptosis hiperactiva) y enfermedades asociadas con inhibición de la apoptosis, en este grupo se incluyen aquellas enfermedades en las que hay una acumulación excesiva de células (cáncer, enfermedades autoinmunes). Clásicamente se pensaba que en estas enfermedades ocurría una acumulación excesiva de células por una proliferación celular aumentada. Hoy se sabe que esta acumulación celular sería consecuencia de una deficiente apoptosis. Un aumento en la apoptosis celular también se ha involucrado en la etiopatogenia de diferentes enfermedades. Por ejemplo, la muerte celular por apoptosis de eosinófilos parece colaborar de forma activa en la resolución de la inflamación, característica del asma bronquial. Igualmente, la apoptosis de los eosinófilos también parece involucrarse en la resolución de la rinitis y la dermatitis alérgica. La apoptosis de los eosinófilos puede desempeñar un papel relevante en la enfermedad alérgica (Ramírez y col., 1999).

La participación de neutrófilos en el complejo proceso inflamatorio incluso, con un papel activo en el mecanismo de resolución de la inflamación, con la muerte de neutrófilos por apoptosis. La función de los neutrófilos puede ser modulada en esta etapa, por mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios. Se ha descrito que la vida media de estas células aumenta en el sitio de la infección, por un efecto mediado por citoquinas como GM-CSF (Ramírez y col., 1999; Simon y col., 1999). Participan también estos factores de supervivencia, en la inducción de la

expresión de genes antiapoptóticos y en la reducción o inactivación de moléculas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Baunmann y col., 2003). El neutrófilo al fagocitar la bacteria intacta gatilla una apoptosis acelerada de si mismo como respuesta a una exitosa misión ayudando a la resolución de la inflamación (Power y col., 2004).

Se ha demostrado que los neutrófilos de pacientes infectados con algunas bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Porphyromonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus pneumoniae*) presentan una apoptosis acelerada. Donde *E. coli* no promueve directamente la apoptosis de neutrófilos. Pero si, aumenta la expresión de FasL (receptor de muerte) en monocitos (Nwakoby y col., 2001).

En un estudio con *Chlamydia pneumoniae* (bacteria intracelular), se demostró que el LPS de esta bacteria inhibe la apoptosis espontánea de los neutrófilos, de manera tiempo-dosis dependiente. Para descartar que el efecto antiapoptótico se debiera a una respuesta específica para patógenos intracelulares se trabajó con LPS *E.coli* (típica bacteria extracelular) y se comprobó que también retarda la apoptosis de neutrófilos. En este mismo estudio se demostró que IL-8 inhibe la apoptosis de neutrófilos (Zandbergen y col., 2004). El LPS inhibe la apoptosis de neutrófilos preferencialmente a través de la estabilización de la membrana plasmática y posterior inhibición de la caspasa-3 (Power y col., 2004).

Altos niveles de LPS y lípido A de *P. gingivalis* retardan la apoptosis de neutrófilos, pero inducen la apoptosis de linfocitos, además incrementan la producción de Interleuquina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF- α) e Interleuquina-8 (IL-8) desde los neutrófilos. Un retardo en la apoptosis podría prolongar una repuesta inflamatoria aguda, aumentando el daño tisular. Se ha mostrado recientemente que el LPS de *P. gingivalis* se une al receptor TLR2, que no es el receptor común para LPS de bacteria Gram negativas como lo es TLR-4. Incluso se ha planteado que LPS de *P. gingivalis* podría ser antagonista de TLR4 (Murry y col., 2003). La función de los receptores CD14 y TLR-2, es modular la apoptosis del neutrófilo en respuesta a lipoproteína bacteriana (Power y col., 2004).

Gamonal y col., encontraron una correlación entre el retardo en el proceso apoptótico del neutrófilo en el tejido periodontal con un incremento en los niveles

de TNF- α , GM-CSF en fluido crevicular gingival y una baja expresión de Bax (molécula proapoptótica), lo que sugiere un posible papel de estos mediadores en la patogénesis de la periodontitis (Gamonal y col., 2003). En nuestro trabajo observamos una disminuida muerte por apoptosis basal en los neutrófilos de pacientes con periodontitis con respecto a los controles sanos. Esta condición disminuida desaparece a las 8 h donde la apoptosis de los pacientes aumenta, alcanzando a los controles, que han mantenido una constante de muerte cercana al 35%. El que los neutrófilos de pacientes este disminuida, desde la toma de muestra, podría implicar un retardo en los mecanismos de apoptosis lo que estaría contribuyendo al daño tisular en esta patología. La permanencia del neutrófilo activado por mayor tiempo en el tejido, permitiría al neutrófilo liberar constantemente sus agentes bactericidas, los que junto con ayudar a la eliminación, en parte, de las bacterias presentes en el sitio de infección, afectarían a las células del tejido conectivo (soporte del diente), induciendo el nivel de inflamación crónico en esta patología. Sin embargo, los neutrófilos de pacientes y controles no presentaron aumento en la apoptosis al ser estimulados con LPS *E. coli* y extracto bacteriano de *P. gingivalis*. Lo que podría deberse a la concentración de los estímulos durante la incubación. Siendo entonces una respuesta dosis dependiente o podría ser que los tiempo de exposición de los neutrófilos a los dos estímulos podrían no ser suficientes.

4.4_ INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE MAC-1 Y L-SELECTINA EN LA APOPTOSIS DE NEUTROFILOS EN LA PERIODONTITIS.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se caracteriza por una anormal respuesta inflamatoria frente a contaminantes pulmonares principalmente humo de tabaco. Un rasgo de esta respuesta inflamatoria es la acumulación de los neutrófilos en el pulmón (Noguera y col., 2004). La retirada de los neutrófilos (“clearance”) desde los tejidos ocurre normalmente por la fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos por parte de los macrófagos. Bajo condiciones normales, los neutrófilos son células de vida media corta, condición dada como un resultado

de la activación de la muerte celular por apoptosis (Akgul y col., 2001; Ross y col., 2004). El estudio realizado en pacientes y controles con EPOC, mostró un incremento en la apoptosis con el tiempo en cultivo en todos los grupos en estudio, lo que indica que no existe apoptosis anormal. Al medir la expresión de los marcadores de activación, se observó un aumento de Mac-1 (CD11b) y una disminución de L-selectina (CD62L) en los pacientes con EPOC (Noguera y col., 2004). En otro trabajo relacionado, se estudió la expresión de CD11b y CD62L sobre leucocitos de pacientes con periodontitis agresiva, y se observó incremento significativo de CD11b de linfocitos y neutrófilos. Este aumento fue acompañado del deterioro en la quimiotaxis en los neutrófilos en estos pacientes. La disminución en el corte de CD62L, se debió principalmente al bloqueo de la actividad lítica de las proteasas, causada por inhibidores tisulares de metaloproteínasa-3 (Pietruska y col., 2005). Un estudio en ratones con deficiencia en selectinas, reveló que L-selectina (CD62L) es responsable por la presencia prolongada de neutrófilos en los capilares sanguíneos (Doyle N y col., 1997). En teoría esto puede deberse al reclutamiento reforzado de neutrófilos y/o en el retardo de su "clearance" desde el tejido. En esta patología (EPOC) los niveles de Mac-1 se encontraron más altos y los de L-selectina más bajos a lo largo del proceso apoptótico. La expresión alterada de Mac-1 (CD11b) podría alterar la habilidad del macrófago para reconocer y fagocitar neutrófilos apoptóticos, incrementando así su potencial daño al tejido por liberación de su contenido proinflamatorio (Noguera y col., 2004).

Los resultados muestran un posible rol del neutrófilo en la patogénesis de la periodontitis. La iniciación de la apoptosis en neutrófilos es normalmente asociada con un deterioro en las funciones de esta célula. Este deterioro ocurre para limitar su habilidad para dañar el tejido durante el proceso apoptótico. Los neutrófilos circulantes de pacientes con periodontitis crónica en nuestro estudio presentaron una expresión disminuida de L-selectina y Mac-1. Esto sugiere que los neutrófilos todavía pueden contribuir al daño en el tejido de pacientes con periodontitis crónica. Pues si los neutrófilos expresan menor proporción de marcadores de activación (CD62L y CD11b), indicarían a su entorno que no se encuentran activadas evitando así entrar en un proceso de muerte por apoptosis. Además

podrían evitar el “clearance” de células apoptóticas realizada por el macrófago y así permanecer mas tiempo en el tejido, produciendo mayor daño tisular característico de esta patología.

4.5_ POTENCIALES LIMITACIONES DE TRABAJO.

Una de las limitaciones de nuestro trabajo, fue el estudio de la apoptosis de neutrófilos *in vitro*, lo que nos da un contexto alejado de las condiciones medio ambientales normales de estas células. Ya sean, otros mediadores inflamatorios, factores de crecimiento, moléculas activadoras, células que ayudarían al correcto desarrollo de la respuesta del neutrófilo. Por lo que su ausencia podría estar alterando los resultados obtenidos en este trabajo, lo que explicaría el por que a las 8 h de incubación la muerte por apoptosis de neutrófilos del grupo pacientes se iguala a la del grupo control. Además, en este estudio los neutrófilos fueron sometidos a un estrés extra, como es el método de purificación. En el estudio realizado por Álvarez-Larran (2005) se demuestra que la expresión normal de CD11b en neutrófilos, fue alterada por el método de lisis de eritrocitos aumentando la expresión del receptor con respecto a las muestras no lisadas, lo que lleva a pensar a los autores que la lisis podría activar las células. Por último, se debe mencionar que, el estudio fue realizado en neutrófilos circulantes, por lo que la respuesta obtenida puede no ser representativa de lo que esta sucediendo a nivel inflamatorio local. Aun cuando, se espera una respuesta inmune sistémica a cualquier invasión bacteriana en los tejidos, ya sea por el paso de alguno de estos patógenos en baja concentración al torrente sanguíneo, o por la liberación de mediadores activadores (quimioatrayentes, mediadores inflamatorios, Interleuquinas, quimioquinas, etc.) del sistema inmune a la sangre.

5._ CONCLUSIONES

1._ Los neutrófilos de pacientes con periodontitis crónica presentan una expresión disminuida (estadísticamente significativa) de los receptores de activación, Mac-1 (CD11b) y L-selectina (CD62L), con respecto a los sujetos periodontalmente sanos.

2._ Los neutrófilos de pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos desafiados *in vitro* con LPS *E. coli* o extracto bacteriano de *P. gingivalis*, se activan aumentando la expresión de Mac-1 (CD11b) y disminuyendo la de L-selectina (CD62L).

3._ Los neutrófilos de pacientes con periodontitis crónica presentan una menor apoptosis basal, estadísticamente significativa, con respecto a los sujetos periodontalmente sanos.

4._ El LPS *E. coli* y extracto bacteriano de *P. gingivalis*, no tuvieron ninguna ingerencia en el proceso apoptótico de neutrófilos de pacientes y controles.

6._ REFERENCIAS

Ahmad D., Brian K., Shenton J., Kirby S., Baudouin S. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensiv. Care Med.* 2004; 30: 605-611.

Akgul C., Moulding D., Edwards S. Molecular control of neutrophils apoptosis. *FEBS Lett.* 2001; 487: 318-322.

Alvarez-Larran A., Toll T., Rives S., Estella J. Assessment of neutrophil activation in whole blood by flow cytometry. *Clin. Lab. Haem.* 2005; 27: 41-46.

Arakawa Sh., Nakajima T., Ishikura H., Ichinose Sh., Ishikawa I., Tsuchida N. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study

with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* . Infect. Immun. 2000; 68: 4611-4615.

Baunmann R., Casaulta C., Simon D., Conos S., Yousefi SH., Simon H. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. FASEB J. 2003; 17: 2221-2230.

Brogan JM., Lally ET., Poulsen K., Kilian M., Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. Infect. Immun. 1994; 62: 501-508.

Carrillo-Esper R., Wright S., Levin S., Jong M. CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 1989; 169: 175-183.

Carrillo-Esper R., Wright S., Ramos R., Tobias P. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPD binding protein. Science 1990; 249: 1431-1433.

Carrillo-Esper R. Innate immunity, Toll receptor and sepsis. Cir. Ciruj. 2003; 71: 252-258.

Cicchetti G., Philip G., Glogauer M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 2002; 13: 220-228.

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. Periodontol. Res. 2002; 37: 353-359.

Consensus report. periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol. 1996; 1: 926-32.

Denisis K. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol.* 2000. 2001; 25: 8-20.

Dibbert B., Weber M., Nikolaizik W., Vogt P., Schoni M., Blase K., Simon H. Cytokine mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophils apoptosis: a general mechanism to accumulate effectors cells in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 13330-13335.

Doyle N., Bhagwan S., Meek B., Kutkoski G., Steeber D., Tender T., and Doerschuk C. Neutrophils migration, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectine-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 526-533.

Fassbender K., Kaptur S., Becker P., Gröschel J., Schmidt R., Hennerici M. Inverse association between endogenous glucocorticoid secretion and L-selectin (CD62L) expression in trauma patients. *Life Sci.* 1999; 65(23): 2471-2480.

Fredicksson M., Gustafsson A., Bergström K., Asman B. Constitutionally hyperreactive neutrophils in periodontitis. *J. Periodontol.* 2003; 74: 219-224.

Gainet J., Dag P., Chollet-Martin S., Brion M., Sixou M., Hakim J., Gougerot-Pocidallo M., Elbim C. Neutrophils Dysfunctions, IL-8, and Soluble L-Selectin Plasma Levels in Rapidly Progressive Versus Adult and Localized Juvenile Periodontitis: Variations According to Disease Severity and Microbial Flora. *J. Immunol.* 1999; 163: 5013-5019.

Gajardo M., Silva N., Gomez L., Leon R., Parra B., Contreras A., Gamonal J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J. Periodontol.* 2005; 76: 289-294.

Gamonal J., Acevedo A., Bascones A., Jorge O., Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J. Periodontol. Res.* 2001; 35: 156-164.

Gamonal J., Bascones A., Jorge O., Silva A. Levels of IL-1 β , -8, -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult patients with destructive periodontitis and the effect of periodontal treatment. *J. Periodontol.* 2000; 71: 1535-1545.

Gamonal J., Sanz M., O'Connor A., Acevedo A., Sanz A., Martinez B., Silva A. Delayed neutrophils apoptosis in chronic periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* 2003; 30: 616-623.

Gjerme P., Rosing C., Susin C., Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol.* 2000. 2002; 29: 70-78.

Goodson J., Tanner A., Haffajee A., Sornbenger G., Socransky S. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 1982; 9: 472-481.

Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin. Science* 1992; 83: 639-648.

Johansson A., Buhlin K., Koski R., Gustafsson A. The immunoreactivity of systemic antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *Eur. J. Oral. Sci.* 2005; 113: 197-202.

Koulouri O., Lappin D., Radiar M., Kinane D. Cell division, synthetic capacity and apoptosis in periodontal lesions analyzed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J. Clin. Periodontol.* 1999; 26: 552-559.

Kubota T., Morozumi T., Shimizu K., Sugita N., Kobayashi T., Yashie H. Differential gene expression in neutrophils from patients with generalized aggressive periodontitis. *J. Periodont Res.* 2000; 36: 390-397.

Lewinsohn D., Bargatze R., Butcher E. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J. Immunol.* 1987; 138: 4313-21.

Lien E., Ingalls R. Toll-like receptors. *Crit. Care. Med.* 2002; 30: SI-SII.

Lindhe J., Haffajee A., Socransky S. Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. *J. Clin. Periodontol.* 1983; 10: 433-42.

Miyasaki K. The neutrophils: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J. Periodontol.* 1991; 62: 761-74.

Mombelli A. Periodontitis as an infectious disease specific features and their implications. *Oral. Dis.* 2003; 9 Suppl 1: 6-10.

Murry D., Wilton J. Lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* prevents apoptosis of HL60-derived neutrophils in vitro. *Infect. Immun.* 2003; 71: 7332-7235.

Noguera A., Sala E., Pons A., Iglesias J., MacNee W., Agusti A. Expression of adhesion molecules during apoptosis of circulating neutrophils in COPD. *CHEST.* 2004; 125: 1837-1842.

Nwakoby I., Reddy K., Patel P., Shah N., Sharma S., Bhaskaran M., Gibbons N., Kapasi A., Singhal P. Fas-Mediated apoptosis of neutrophils in sera of patients with infection. *Infect. Immun.* 2001; 69: 3343-3349.

Ogawa T., Shimauchi H., Kusumoto Y., Hamada S. Humoral immune response to *P. gingivalis* fimbrial antigen in mice. *Immunol.* 1990; 69: 8-13.

Page R., Kornman K. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol.* 2000. 1997; 14: 9-11.

Page R., Schroeder H. Periodontitis in Man and Others Animals. A Comparative Review. Basel and New York: S. Karger; 1982.

Pietruska M., ZaK J., Pietruski J., Wysocka J. Expressions of selected adhesion molecules on peripheral blood leukocytes in patients with aggressive periodontitis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2005; 53: 266-271.

Power C., Wang J., Manning B., Kell M., Aherne N., Wu Q., Redmond P. Bacterial lipoprotein delay apoptosis in human neutrophils through inhibition of caspase-3 activity: Regulatory roles for CD14 and TLR-2. *J. Immun.* 2004; 173: 5229-5237.

Pizarro V., Gamonal J., López N. Causa de pérdida de dientes en la población adulta de 35-44 y de 65-74 años de edad, de la región metropolitana. *Rev. Fac. Odont. Univ. de Chile* 1997; 15: 43-51

Prieto J., Beatty P., Clark E., Patarroyo M. Molecules mediating adhesion of T and B cells, monocytes and granulocytes to vascular endothelial cells. *Immunol.* 1988; 63: 631-637.

Quirynen M., De Soete M., Dierickx K., Van-Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J. Clin. Periodontol.* 2001; 28: 499-507.

Ramirez R., Cariacedo J., Moreno C., Guerra F. Apoptosis y Enfermedad. *Alergol. Immunol. Clin.* 1999; 14: 367-374.

Restaino C. Estudio de la respuesta bioquímica de neutrófilos humanos frente a patógenos periodontales. Tesis de magíster en bioquímica. *Fac. Cs. Qcas y Farm. U. Chile.* 2005.

Ross A., Xu W., Castellano G., Nauta A., Garred P., Daha M., Kooten C. A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 921-929.

Sanchez-Madrid F., Nagy J., Robbins E., Simon P., Springer T. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150, 95 molecule. *J. Exp. Med.* 1983; 158: 1785-1803.

Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 1998; 254: 439-459.

Simon S., Cherapanov V., Nadra I., Waddell T., Seo S., Wang Q., Doerschuk C., Downey G. Signaling functions of L-selectin in neutrophils: Alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18. *J. Immunol.* 1999; 163: 2891-2901.

Simon H. Apoptosis in inflammatory diseases. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 1999; 118: 261-272.

Socransky S., Haffajee A. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J. Periodontol.* 1992; 63: 322-331.

Spertini O., Luscinikas F., Kansas G., Munro J., Griffin J., Gimbrone M., Tedder T. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J. Immunol.* 1991; 147: 2565-73.

Springer T. Adhesion receptors of immune system. *Nature* 1990; 346: 425-434.

Vernal R., Dutzan N., Chaparro A., Puente J., Valenzuela M., Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J. Clinical. Periodontol.* 2005; 32: 383-389.

Vignola A., Gjomarkaj M., Arnoux B., Bousquet J. Monocytes. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 1998; 101: 149-152.

Zandbergen G., Gieffers J., Kothe H., Rupp J., Bollinger A., Aga E., Klinger M., Brade H., Dalhoff K., Maass M., Solbach W., Laskay T. *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophils granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J. Immunol.* 2004; 172: 1768-1776.

Zappa U., Reinking-Zappa M., Graf H., Espeland M. Cell populations and episodic periodontal attachment loss in humans. *J. Clin. Periodontol.* 1991; 18: 508-515.

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Antecedentes generales:

La enfermedad periodontal (periodontitis), es una infección producida por el acumulo de placa bacteriana entre la encía y el diente, que produce en sus estados iniciales el aumento de volumen, el cambio de color y el sangrado de la encía, y luego si no es tratada oportunamente ocasiona la pérdida de los dientes. El tratamiento de la enfermedad periodontal permite eliminar la infección y además permite detener la destrucción del hueso alveolar al cual se haya unido el diente. El propósito del presente estudio es determinar que factores locales pueden estar involucrados en el desarrollo y posterior progresión de la periodontitis, que son los responsables de la destrucción del tejido de inserción periodontal y que puede estar contribuyendo a la pérdida de los dientes.

Procedimiento:

A los pacientes seleccionados para el presente estudio se les efectuará un examen clínico completo, el que se repetirá cada 2 meses hasta determinar la progresión de la periodontitis. El examen clínico se repetirá después de efectuado el tratamiento periodontal con una frecuencia de 3 meses (que es una frecuencia similar a la realizada con los pacientes que están en tratamiento, pero que no están en un estudio).

A los pacientes del estudio se les tomara una biopsia de encía y una muestra de fluido gingival crevicular (líquido que normalmente fluye entre la encía y el diente, y que está presente en todos los individuos). Ambos tipos de muestra normalmente no se toman a los pacientes, pero son muchas veces parte del tratamiento periodontal, en aquellas instancias de decidir realizar tratamiento

periodontal quirúrgico. Además se procederá a la toma de una muestra de sangre periférica.

El tratamiento periodontal consiste en la eliminación de la placa bacteriana dental, acumulada alrededor del diente y que produce la infección de la encía.

Ventajas y desventajas de participar en el estudio:

La desventaja de participar en el presente estudio, es que los pacientes seleccionados serán sometidos a la toma de una biopsia (realizada durante la misma sesión de tratamiento y por tanto se hace con anestesia), de fluido gingival crevicular (que no requiere de anestesia) y de sangre periférica.

Como ventajas de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les obsequiará de todos los elementos de higiene dental, ya sea cepillos, seda dental y limpiadores de espacios interproximales. Además, por cierto de conocer el diagnóstico microbiológico y de las características de la relación hospedero-agente causal en su caso particular, sin costo económico alguno para los pacientes.

Declaro

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación.

Identificación Paciente:

Identificación Dentista Nombre:

Nombre

Rut:

Rut:

Fono:

Fono:

Firma

Firma

Fecha: