



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS
DE CAVIDAD ORAL

T E S I S

Para obtener el título de:

Cirujano Dentista.

P R E S E N T A:

Erik Ethian Hernández Huerta

*Tesis
terminada
Marzo 2021*

TUTORA: Dra. Eileen Uribe Querol

*Vo.Bo.
Eileen Uribe Querol*

ASESOR: Dr. Carlos Rosales Ledezma

Cd. Mx.

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A Jazmín: Por brindarme apoyo, amor, sensibilidad y educación con su esfuerzo y trabajo desde que tengo memoria.

A Ricardo: Por brindarme apoyo, amor, aprendizaje de las experiencias y gratificación hacia estas con su sabiduría desde mis primeros años.

A mis abuelos: Pilar, Humberto, Margarita, Ricardo y Amelia: Por haberme cuidado como nadie mas supo y cuando nadie más pudo.

A mis tíos Noemi y Emiliano: Por haberme asesorado en la carrera profesional.

A la Doctora Eileen Uribe: Por haberme permitido trabajar con ella y con su equipo. Así como haberme dirigido y asesorado en el proyecto de tesis.

Al Doctor Carlos Rosales: Por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

A los doctores Jacinto Alemán y Gonzalo Montoya: Por brindarme apoyo y asesoría con mis decisiones en la carrera.

A mis compañeros de laboratorio Daniela, Gilberto, Ana, Alejandro y Gerardo: por haber hecho mi estancia y trabajo más ameno. A la Mtra.en IBB Nancy Y. Mora Pérez por ayudarme con las técnicas y el uso de aparatos en el laboratorio.

A Samantha: Quien me brindó apoyo y conocimiento en el cierre de este ciclo.

A Hanieh y Dánae: Por haberme mostrado los lados ocultos de lo cotidiano, su hospitalidad y la elaboración de los esquemas.

A Leslie: Por haberme ayudado siempre que lo necesité en mi último año escolar.

A Karen: Por haber siempre estado cuando más necesite de su apoyo a lo largo de la licenciatura.

Dedicatoria

Para mis padres: Jazmín y Ricardo:

Aquí presento con gratitud el trabajo de culminación e inicio de una nueva etapa en mi vida, fruto de su apoyo que me han brindado en los ciclos que se han hecho a través de su amor.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO I	
<u>1. Sistema inmunológico</u>	7
1.1. Inmunidad innata	7
1.2. Inmunidad adaptativa	8
CAPITULO II	10
<u>2. Neutrófilos</u>	10
2.1. Producción diferenciación y liberación de neutrófilos	10
2.2. Extravasación	12
2.3. Reconocimiento de microorganismos	14
2.4. Fagocitosis	15
2.5. Degranulación	16
2.5.1. Mecanismos de degranulación	16
2.5.1.1 Mecanismos dependientes de ROS	16
2.5.1.2. Mecanismos independientes de ROS	17
2.6. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET)s	17
CAPÍTULO III	18
<u>3. Sistema inmunológico en el periodonto</u>	18
3.1. La encía	18
3.2. Epitelio	19
3.3. Inmunidad del periodonto	20
3.4. Importancia de los neutrófilos en el periodonto	21
ANTECEDENTES	23
<u>4. Métodos previos de obtención de neutrófilos</u>	23
4.1. Método de Ashekanazi y Dennison (1989)	23
4.2. Método de Sato (1996)	24
4.3. Método de Lakschevitz, Abodi y Glogauer (2013)	25
4.4. Método de Patrick Rijkschroeff (2016)	25
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26

6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	27
7. HIPÓTESIS	27
8. OBJETIVO GENERAL	27
8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
9. MATERIALES Y MÉTODOS	28
9.1. <i>Materiales</i>	28
9.2. <i>Voluntarios</i>	28
9.3. <i>Identificación de células obtenidas de enjuagues orales</i>	28
9.4. <i>Cuantificación de células obtenidas de enjuagues orales</i>	29
9.5. <i>Tinción de Wright-Giemsa</i>	30
9.6. <i>Análisis estadístico</i>	30
9.7. <i>Obtención de neutrófilos orales</i>	30
10. RESULTADOS	32
10.1 Neutrófilos y células epiteliales son obtenidos dependiendo de la modificación del método original.	32
11.DISCUSIÓN	37
12. CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXO 1	46

RESUMEN

Los neutrófilos son la primera línea de defensa contra las infecciones. Sus funciones han sido ampliamente estudiadas en el torrente sanguíneo. Sin embargo, recientemente se han empezado a estudiar en cavidad oral. En la cavidad oral existe un constante reclutamiento de neutrófilos. Sin embargo, aún no se estudian por completo las funciones que los neutrófilos ejecutan en esta zona. Participan en la homeostasis entre el sistema inmunológico y la microbiota oral. Para poder estudiar las funciones de los neutrófilos orales debemos tener un sistema de obtención y purificación eficiente. La literatura sobre los métodos de purificación de neutrófilos orales es incompleta pues no se especifican detalles importantes para su manejo. Esto, dificulta la reproducibilidad de los hallazgos sobre las funciones de los neutrófilos en cavidad oral. En este trabajo se evaluaron variables del método (la presión de filtración, el diámetro del filtro, el volumen de la muestra y el tiempo). Después de realizar ajustes en cada uno de estas variables presentamos una técnica más eficiente y reproducible para la obtención y purificación de neutrófilos orales, donde el porcentaje de viabilidad y pureza son mejores que aquellos de los métodos existentes.

INTRODUCCIÓN

Capítulo I

SISTEMA INMUNOLÓGICO

En términos fisiológicos, el sistema inmunológico desempeña una actividad general de forma coordinada con varios órganos para el bienestar de un organismo. (1) La palabra inmunidad proviene de latín *immunitas*, *-ātis*, que se refiere a un estado de resistencia natural o adquirida que poseen ciertos individuos o especies frente a determinadas acciones de microorganismos patógenos y de sustancias extrañas.

(2) Uno de los primeros registros que se tienen de la inmunidad data del siglo V a.C. durante la peste que se vivió en Atenas. El historiador Tucídides notó cómo las personas que habían padecido la infección y la habían sobrevivido, podían cuidar de los enfermos sin riesgo a un nuevo contagio. Este acontecimiento dio pie a una serie de métodos para buscar inmunidad ante varias enfermedades causadas por microorganismos. (3)

El sistema inmunológico desempeña un papel esencial en la protección del organismo contra los agentes patógenos. A pesar de vivir en un ambiente densamente poblado por agentes patógenos, la respuesta eficaz del sistema inmunológico contribuye a mantener la salud del organismo. (3,4)

En la respuesta inmune participan dos componentes: El componente celular y el componente humoral. El componente celular incluye a los linfocitos, que son producidos en la médula ósea y algunos de ellos maduran en órganos especializados. El componente humoral incluye diversas moléculas, entre ellas, las inmunoglobulinas y el sistema del complemento. (3)

Para propósitos de su estudio, la respuesta del sistema inmunológico se ha dividido en la respuesta inmunológica innata y la respuesta inmunológica adaptativa. (3,4)

1.1 Inmunidad Innata.

Existen barreras naturales en el cuerpo humano, una de ellas es la piel. La piel es la primera barrera de protección que impide que los microorganismos puedan ingresar al cuerpo. Muchos agentes infecciosos tienen el primer contacto con los epitelios que

recubren los aparatos respiratorios, digestivo y genitourinario. Cuando, por ejemplo, las bacterias son capaces de atravesar estas barreras, la participación de linfocitos, principalmente polimorfonucleares como neutrófilos, macrófagos y el sistema de complemento, es decisiva para mantener la salud en el organismo. (4) La inmunidad innata se caracteriza por ser la primera reacción del organismo ante amenazas por agentes patógenos. En este tipo de inmunidad participan varios tipos celulares como leucocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos), células del epitelio y células del parénquima, que conforman varios tejidos. (4)

Las células que participan en la inmunidad innata poseen proteínas en su superficie que pertenecen a una familia de receptores de reconocimiento de patrones. Estos receptores tienen la capacidad de reconocer patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP). Los PAMP son moléculas expresadas en la superficie de los microorganismos que les confieren su capacidad patogénica y suelen ser compartidos por diferentes microorganismos. Ejemplos de los PAMP son el lipopolisacárido presente en la superficie de las bacterias Gram negativas, el péptidoglucano, presente en la pared bacteriana y la flagelina, presente en el flagelo de las bacterias. (4)

Se ha descrito que, en las primeras horas o días de exposición del organismo a un proceso infeccioso, los mecanismos de la inmunidad innata son los principales encargados de erradicar la infección. Cuando no es posible erradicarla, la inmunidad innata se encargará de contener con la infección hasta que los mecanismos de la inmunidad adaptativa puedan contribuir a la eliminación de la infección. Los mecanismos de la inmunidad adaptativa tardan varios días. (4)

1.2 Inmunidad adaptativa.

A diferencia del reconocimiento de patógenos usado por las células de la inmunidad innata, en la inmunidad adaptativa, los linfocitos T y B reconocen sitios particulares presentes en los patógenos, denominados epítopes antigénicos.

Un epítope antigénico es una secuencia específica de aminoácidos, moléculas de carbohidratos, lípidos o ácidos nucleicos que el linfocito es capaz de reconocer. (3,4)

La inmunidad adaptativa usa como sistema de reconocimiento un amplio repertorio de receptores antigénicos distribuidos en los linfocitos T y B. Estos linfocitos generan una memoria organizada en millones de clones diferentes que brindan un amplio repertorio en el reconocimiento de los diferentes antígenos microbianos. Este repertorio de receptores linfocitarios ocurre durante su desarrollo y maduración en órganos especializados como el bazo y el timo. (4)

El linfocito T o B que encuentra a su antígeno sufre un proceso denominado expansión clonal que generará una progenie compuesta de miles de células con idéntica especificidad antigénica. Al expandirse una fracción mayoritaria de los integrantes del clon expandido mediará funciones efectoras que harán frente al patógeno. Una fracción menor se diferenciará a células de memoria, las cuales pueden permanecer durante años y permiten en el futuro una respuesta rápida y eficaz frente al patógeno. (4)

El reconocimiento de antígenos es diferente entre los linfocitos T y los linfocitos B, ya que los linfocitos T requieren de un antígeno previamente procesado por células presentadoras de antígeno. Mientras que los linfocitos B, pueden reconocer al antígeno directamente. (4) Los linfocitos T reconocen el antígeno cuando se ha procesado en un péptido por las células presentadoras de antígeno y presentado por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase I (para los linfocitos T CD8+) o de clase II (para los linfocitos T CD4+) expresadas sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos B están especializados en la producción de anticuerpos una vez que han madurado a plasmocitos. Por su parte, los linfocitos T CD4+ o T CD8+ tendrán una diferente respuesta. Los linfocitos T CD8+, al activarse iniciarán la destrucción de las células infectadas por virus, o células tumorales. Los linfocitos T CD4+ (*"T Helper"*), al activarse se transformarán en distintos perfiles funcionales productores de citocinas. Por ejemplo, las células Th1 (*"T Helper 1"*) producirán interferón- γ e inducirán la activación del macrófago en los tejidos periféricos. Las células Th2 producirán interleucina (IL) 4, IL-5, IL-9 e IL-13, induciendo la movilización de los eosinófilos y mastocitos, favoreciendo además la producción de inmunoglobulina (Ig) E por las células B. Las células Th17 producirán IL-17, promoviendo la producción, movilización e infiltración de neutrófilos al tejido afectado. Otro tipo de células denominadas ThF (Foliculares), mediarán la colaboración con los linfocitos B, permitiendo diferenciarse en plasmocitos productores

de anticuerpos. Los linfocitos Treg mediarán un efecto inhibitorio sobre la activación de las diferentes poblaciones de linfocitos T y B, a fin de controlar el desarrollo de la respuesta inmunológica adaptativa, evitando que se dañen los propios tejidos. (4)

Capítulo II

NEUTRÓFILOS

2.1 Producción, diferenciación y liberación de neutrófilos.

Los neutrófilos son leucocitos terminalmente diferenciados, multilobulados y pertenecen al grupo de los granulocitos, por ello se denominan leucocitos polimorfunucleares (PMN). Un promedio de 10^9 neutrófilos por kg/día son producidos en la médula ósea humana y representan aproximadamente, el 70% de la población leucocitaria en sangre. Son la primera línea de defensa contra infecciones, así como uno de los primeros tipos celulares participantes en el inicio de la respuesta inflamatoria. (5,6) Su ciclo de vida comienza en la médula ósea con la diferenciación de una célula troncal hematopoyética en una célula progenitora multipotente (MPP, por sus siglas en inglés). Las MPP se diferencian en progenitores multipotentes linfoides (LMPP, por sus siglas en inglés), los cuales se diferencian después en progenitores de granulocitos y monocitos (GMP, por sus siglas en inglés). Después, los GMP se diferencian en mieloblastos y se inicia un proceso denominado granulopoyesis. Este proceso es regulado principalmente por el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF, por sus siglas en inglés). Este factor regula tanto la proliferación de precursores de granulocitos como la liberación de neutrófilos maduros a la circulación. (5,6) El mieloblasto sigue un proceso de maduración que incluye los estadios de promielocito, mielocito, metamielocito, célula en banda y finalmente neutrófilo (Figura 1). Durante este proceso de maduración se observan cambios morfológicos en estas células como el cambio de la forma circular del núcleo a una forma “arriñonada” y finalmente a un núcleo segmentado. Durante la maduración de los neutrófilos se expresan varios receptores y se sintetizan diferentes sustancias que se empaquetan en los gránulos y desempeñan funciones de defensa (Figura 1). (5,6) Los neutrófilos también poseen gránulos enzimáticos que se forman en diferentes estadios de su desarrollo. Los gránulos primarios o azurófilos como la mieloperoxidasa y elastasa se expresan en el estadio de mieloblasto a promielocito. Los gránulos secundarios o específicos como la lactoferrina y la lizosima se expresan en el estadio de mielocito a

metamielocito y finalmente los gránulos terciarios como la gelatinasa se encuentran en el estadio de célula en banda hasta el neutrófilo maduro (Figura 1). (7,8)

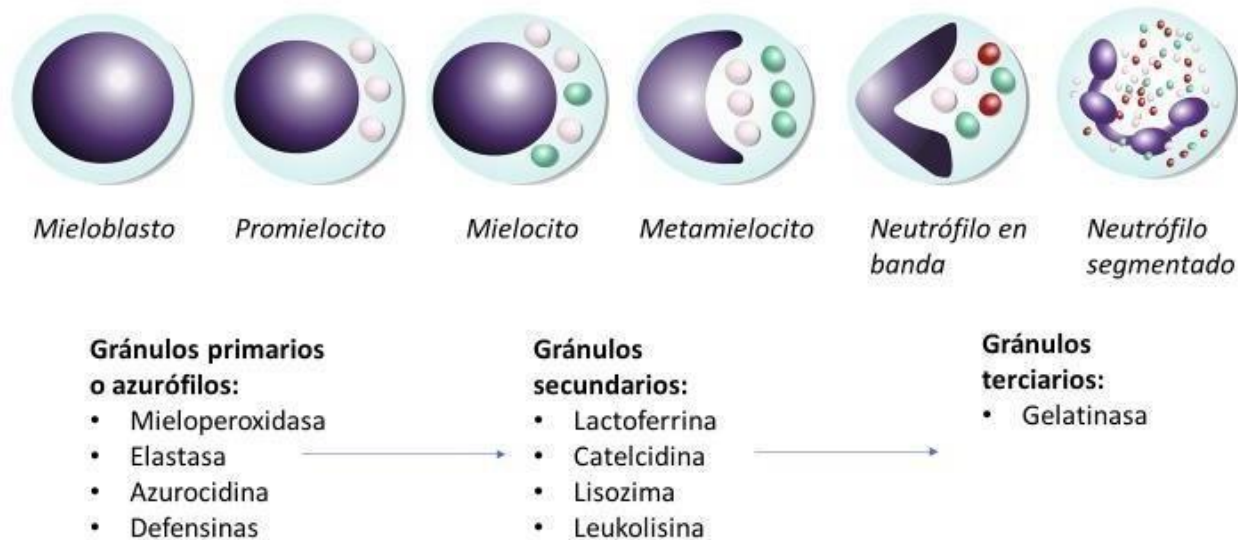


Figura 1. Granulopoyesis. Una vez que un progenitor de granulocitos se diferencia hacia mieloblasto comienza el proceso denominado granulopoyesis inducido por el factor estimulante de colonias granulocíticas. En el proceso de diferenciación se observa la aparición distintos gránulos enzimáticos primarios (rosa claro), secundarios (verde) y terciarios (rojo) y el cambio de un núcleo celular redondo a uno arriñonado y posteriormente a un núcleo segmentado, característico de los neutrófilos maduros.

Un mecanismo de retención de neutrófilos en la médula ósea se presenta cuando la interacción entre la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA4) y el receptor de quimiocina CXCR4 (CXCR4) son inhibidos y el CXCR2 y el receptor tipo Toll 4 (TLR4) son expresados. En este proceso, las células del estroma de la médula ósea expresan la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1), siendo un ligando para VLA4 y la quimiocina factor 1 derivada del factor del estroma (SDF-1) un ligando de CXCR4 (CXCL12). (7,8)

La liberación de neutrófilos está estrictamente controlada por las uniones de los receptores de quimiocinas a sus respectivos ligandos, ya que solo el 1 o 2% de la población total de neutrófilos se encuentran en sangre mientras el resto se

encuentran en la médula ósea. (8) Los neutrófilos maduros se encuentran en la médula ósea bajo la interacción de dos receptores de quimiocinas (CXCR2 y CXCR4) y sus ligandos como el CXCL12 producido por osteoblastos y células del estroma de la médula ósea. El G-CSF induce la liberación de los neutrófilos maduros desde la médula ósea a la circulación mediante la interferencia que ejerce sobre la interacción de CXCR4-CXCL12. (8) Por otro lado, cuando se necesita el reclutamiento de neutrófilos a un tejido periférico, las células endoteliales expresan las moléculas de CXCL1, CXCL2, CXCL5 y CXCL8 sobre su superficie, que son un ligando para CXCR2. Mientras tanto, el G-CSF promueve un aumento en la expresión de CXCR2 en la superficie de los neutrófilos, reduce la expresión de CXCL12 y también reduce la expresión de CXCR4 sobre la superficie de los neutrófilos. (8)

Fuera de la médula ósea la producción de neutrófilos está regulada por una red de citocinas donde participa la interleucina 23 (IL-23) producida por los macrófagos y la interleucina 17 (IL-17) producida por los linfocitos T. (6,7,8) La IL-17 promueve la granulopoyesis e induce el reclutamiento y activación de los neutrófilos. Además, esta interleucina también actúa a favor de la producción de G-CSF. (7)

2.2 Extravasación.

El G-CSF permite la liberación de neutrófilos hacia el torrente sanguíneo. Las propiedades migratorias de los neutrófilos permiten su reclutamiento en el sitio de infección, mediante un proceso de extravasación. Este proceso depende de moléculas de alta y baja afinidad que interactúan entre los neutrófilos y el endotelio vascular (Figura 2). (6,7,8)

La extravasación leucocitaria se realiza en varios pasos. El primer paso es el “rodamiento” de los neutrófilos sobre el endotelio, que depende de la interacción de las selectinas P y E expresadas en la superficie de las células endoteliales con el ligando glucoproteico en la superficie de los neutrófilos. Después, el segundo paso es una desaceleración del rodamiento de los neutrófilos hasta quedarse totalmente adheridos al endotelio. En este paso participan la integrina $\beta 2$ y las moléculas de adhesión intracelular ICAM-1 e ICAM-2. Con esta interacción el neutrófilo queda

completamente fijo y busca un espacio entre las uniones intercelulares de las células endoteliales para realizar el último paso que es migrar al sitio de infección (Figura 2). (6,7,8)

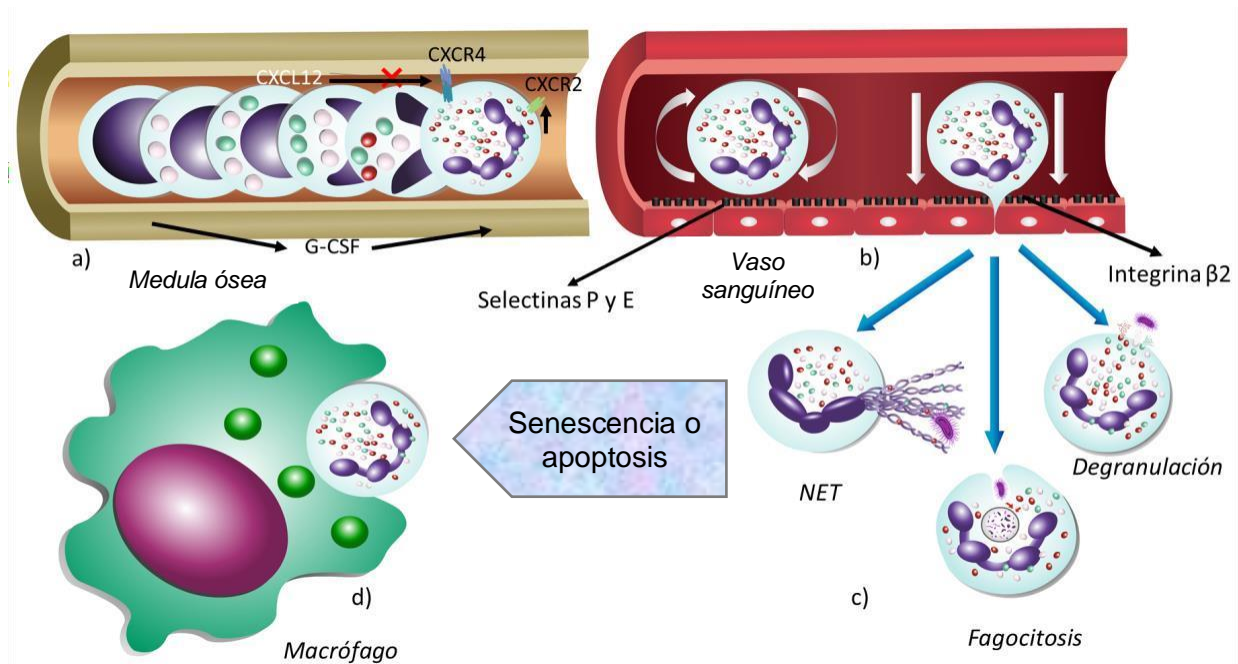


Figura 2. Liberación y extravasación de neutrófilos. a) El G-CSF induce la maduración de los neutrófilos que se encuentran en la médula ósea. Para que se libere el neutrófilo se presenta una interferencia entre la interacción del CXCR4 con el CXCL12 y aumenta la expresión del receptor CXCR2. b) Una vez en circulación el neutrófilo maduro sigue un gradiente de quimioatrayentes en circulación. El neutrófilo une sus ligandos glucoproteicos con la selectina P y E de las células endoteliales, dando pie al fenómeno conocido como rodamiento. Posteriormente el neutrófilo se queda totalmente fijo por la unión de las ICAM-1 e ICAM-2 con la integrina $\beta 2$ expresadas por las células endoteliales y comienza el fenómeno de diapédesis. c) Una vez en el sitio donde se encuentra el agente patógeno, el neutrófilo usa diferentes mecanismos para eliminarlo, formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), fagocitosis o degranulación. d) Los neutrófilos senectos o que han entrado en estado de apoptosis son fagocitados por los macrófagos.

Una vez en el tejido periférico, los neutrófilos siguen un gradiente de concentración por los quimioatrayentes como el formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF) o la anafilatoxina C5a. (6,7)

La extravasación de los neutrófilos es modulada también por citocinas derivadas de los tejidos que pueden incrementar la expresión de las moléculas de adhesión del

endotelio activando los cambios conformacionales en las integrinas de los leucocitos, incrementando su estado de afinidad en esta interacción. (7,8)

Una vez que los neutrófilos llegan al sitio de infección, eliminan a los patógenos mediante fagocitosis, degranulación o formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por sus siglas en inglés) (Figura 2). Posteriormente, los neutrófilos deben ser eliminados, pues estos entran en senescencia o apoptosis. Los neutrófilos senectos que se encuentran dentro de los tejidos son fagocitados por los macrófagos. En circulación, los neutrófilos en senescencia incrementan la expresión de CXCR4, lo que les permite regresar a la médula ósea para su eliminación. (7,8)

La fagocitosis y eliminación de los neutrófilos apoptóticos y senescentes activa una respuesta antiinflamatoria caracterizada por la disminución de IL-23, lo cual conlleva a la disminución de IL-17 y de G-CSF. Consecuentemente, la granulopoyesis disminuye. (8) Gracias a su capacidad fagocítica, los neutrófilos endocitan con rapidez los microorganismos. La capacidad microbicida de los neutrófilos permite la destrucción de millones de microorganismos, por la acción confluyente de mecanismos citotóxicos dependientes e independientes de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno.

2.3. Reconocimiento de microorganismos.

Para comprender la respuesta defensiva o acción antimicrobiana de un neutrófilo se necesita conocer el mecanismo de reconocimiento previo. Este reconocimiento está mediado por varios receptores de reconocimiento de partículas, y que inician el procedimiento para una determinada respuesta de defensa (fagocitosis, degranulación o formación de NET).

Los receptores en la membrana plasmática de los neutrófilos pueden ser divididos en receptores opsónicos y no opsónicos. Los receptores no opsónicos reconocen directamente grupos moleculares en la superficie del microorganismo. Entre estos receptores se encuentran los que reconocen moléculas tipo lectina, como el CD33 y el receptor de macrófagos inducido por Ca^{2+} dependiente de lectina (*Mincle*), o

DNGR-1. También se encuentran los receptores depuradores y el receptor dectina-1 que reconoce beta-glucanos fúngicos. (9)

Los receptores opsónicos reconocen opsinas derivadas del huésped que se unen a partículas ajenas al organismo, marcándolas para su posterior internalización. Las opsinas incluyen anticuerpos, anafilatoxinas del complemento, fibronectina, lectina de unión a manosa (MBL, por sus siglas en inglés) y lactaderina. (9) Mientras los receptores para opsinas participan en la endocitosis del microorganismo y sus productos, entre los RRP sólo los receptores de lectina tipo C, en forma complementaria, los receptores depuradores, median la internalización de los ligandos reconocidos. (4)

2.4. Fagocitosis.

La fagocitosis consiste en el reconocimiento e internalización de una partícula más grande a $0.5 \mu\text{m}$ en una vesícula conocida como fagosoma. (9) El primer paso en la fagocitosis es el reconocimiento de la partícula, esto ocurre ya sea por un receptor que sea capaz de unirse directamente a una molécula específica en la superficie del microorganismo (receptores no opsónicos), o por medio de la unión del fagocito a una opsonina que previamente haya sido capaz de unirse al microorganismo en su superficie (receptores opsónicos). Los receptores tipo Toll (TLR) o algunos receptores acoplados a proteína G preparan al neutrófilo para la fagocitosis iniciando la polimerización de actina. (9) Una vez en el citoplasma, el fagosoma se une a los lisosomas primarios generando un fagolisosoma. Dentro de éste, el patógeno es sometido a la acción de dos sistemas citotóxicos de distinta naturaleza. El microorganismo es eliminado mediante un primer sistema dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y un segundo sistema es mediado por la acción de péptidos antimicrobianos y de enzimas hidrolíticas. (4)

2.5. Degranulación.

La degranulación es un mecanismo en los neutrófilos que consiste en la liberación de mediadores químicos que ayudan a desencadenar una respuesta inflamatoria con la liberación de especies reactivas de oxígeno y gránulos enzimáticos con funciones bactericidas. (4)

Como se mencionó antes, los neutrófilos contienen tres tipos de gránulos enzimáticos (primarios, secundarios y terciarios). Dentro de los gránulos primarios están las enzimas elastasa, mieloperoxidasa, catepsinas y defensinas. Dentro de los gránulos secundarios se encuentra la lactoferrina y en los terciarios, la gelatinasa. (10)

La liberación de estos gránulos enzimáticos depende de la activación de receptores en la membrana plasmática del neutrófilo. Los gránulos se fusionan con la membrana plasmática, son liberados y actúan sobre el agente patógeno. Este proceso de exocitosis se da en una serie de pasos. (10)

El primer paso es el reclutamiento de los gránulos del citoplasma a la membrana plasmática del neutrófilo, lo cual es posible gracias al citoesqueleto que permite el paso de estas moléculas. El segundo paso es el anclaje de vesículas, lo que da como resultado la fusión de los gránulos a la membrana del neutrófilo, vertiendo el contenido de los gránulos al exterior donde se encuentra el patógeno. El tercer paso es la actividad de las enzimas sobre la membrana del patógeno que se haya reconocido. (10)

2.5.1 Mecanismo dependiente de ROS.

Todas las ROS derivan del anión superóxido (O_2^-) e incluyen los siguientes agentes oxidantes: Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión hipoclorito, (ClO^-), hidroxilo. (OH^-), oxígeno (O_2) y cloraminas.

El proceso que conduce a la generación de ROS se denomina estallido respiratorio. La enzima encargada de generar el anión superóxido es la NADPH oxidasa, que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular utilizando NADPH como dador de electrones. (4)

2.5.2 Mecanismo independiente de ROS.

Los fagocitos contienen gránulos citoplasmáticos cargados de agentes antimicrobianos que se liberan al fagolisosoma durante la fagocitosis, o al medio extracelular. La liberación extracelular se presenta en respuesta a los estímulos solubles o de los microorganismos que no han podido ser fagocitados. Los gránulos contienen un amplio conjunto de enzimas degradativas y péptidos con actividad microbicida o microbiostática. (4)

2.6 Trampas extracelulares de neutrófilos (NET).

Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) son fibras de DNA descondensado con enzimas provenientes de los gránulos, capaces de atrapar y matar patógenos de forma extracelular. (11) Por lo tanto, dentro de las NET podemos encontrar componentes de los gránulos como la elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, lactoferrina y la gelatinasa.

Capítulo III

SISTEMA INMUNOLÓGICO EN EL PERIODONTO

El periodonto también llamado aparato de inserción, es el conjunto de tejidos que rodean a los órganos dentarios. Es el encargado de distribuir las fuerzas de masticación y proporcionar suficiente irrigación a cada uno de los órganos dentarios. Los tejidos del periodonto son la encía, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento radicular. (12)

3.1 La encía.

La encía es un tejido fibromucoso que abarca desde el cuello de los órganos dentarios hasta los procesos alveolares y se compone de tejido conectivo denso denominado lámina propia y de tejido epitelial. La encía marginal es la que se encuentra próxima a la corona del órgano dental y festonea el cuello del órgano dental. En condiciones de salud, la encía tiene un color rosa coral y un aspecto liso. (12) Hacia la parte apical o en dirección hacia la raíz de los órganos dentarios, se distingue un color más oscuro en tonos rojizos o marrones, esta parte se denomina mucosa alveolar y se encuentra separada por la línea mucogingival (Figura 3). (12)

La encía libre posee un color rosa coral, una superficie lisa y brillante y una consistencia firme. Comprende las paredes vestibulares, linguales o palatinas e interproximales del órgano dental. En las caras vestibulares y palatinas, la encía libre se extiende hacia el surco gingival libre, el cuál se delimita por la unión cemento esmalte. Clínicamente, la profundidad de este surco gingival se determina usando una sonda periodontal. La distancia recorrida por la sonda indica la condición de salud o enfermedad de esa zona. La distancia recorrida por la sonda indica la migración del epitelio de unión en dirección apical. A mayor migración mayor daño en los tejidos de soporte de diente. La encía insertada se delimita por la unión mucogingival y cubre el proceso alveolar de los órganos dentarios (Figura 3). (12)

3.2. Epitelio.

Microscópicamente la encía libre se encuentra formada por células epiteliales dispuestas en diferentes zonas (Figura 3). La primera zona forma el epitelio oral que se encuentra en contacto con la cavidad oral. La segunda zona forma el epitelio del surco, que se encuentra en la cara vestibular del órgano dental y forma la parte interna del surco gingival libre.

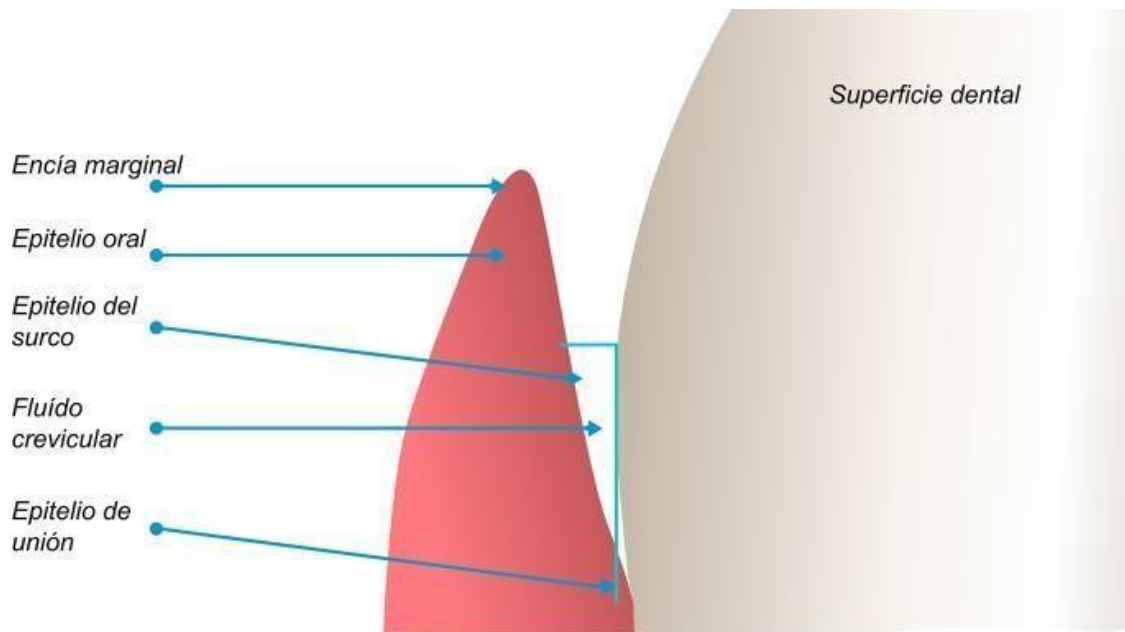


Figura 3. Epitelio oral. Dibujo que muestra la disposición del epitelio desde la encía marginal que rodea al cuello del órgano dental. El epitelio oral está expuesto a la cavidad oral. El epitelio del surco se encuentra dentro de la encía marginal y con vista a la cara del órgano dental, aunque no hace contacto con él. En el espacio entre el epitelio del surco y el órgano dental se encuentra el fluido crevicular.

Este epitelio no hace contacto con la superficie dental. La tercera zona forma el epitelio de unión que proporciona contacto entre la encía y el órgano dental. (12) En el espacio entre el epitelio del surco y el órgano dental se secreta el fluido crevicular, fluido con importancia en la respuesta del sistema inmunológico. Hacia

la parte apical, finalmente se encuentra el epitelio de unión, conformado por la pared vestibular del órgano dental y el epitelio que confluye en este sitio.

3.3 Inmunidad del periodonto.

Los tejidos orales y el periodonto se encuentran expuestos a estímulos como las fuerzas de masticación y la microbiota patógena que puede existir en determinadas condiciones. (12) El periodonto tiene la capacidad de traducir estos estímulos en señales bioquímicas, generando una respuesta coordinada con el sistema inmunológico para lograr un estado de homeostasis. En condiciones de salud, existe un equilibrio entre la microbiota comensal y el sistema inmunológico. Cuando este equilibrio se pierde, existe una respuesta inflamatoria que recluta células del sistema inmunológico. (11,12) En esta respuesta participan los neutrófilos, linfocitos B y la inmunoglobulina A secretora (s-IgA). (11,12)

Otro componente importante en la preservación de la homeostasis en la cavidad oral y el periodonto es la saliva. Ésta es producida por las glándulas salivales mayores y menores. La saliva contiene sales, bicarbonato, proteínas y factores antimicrobianos como las mucinas que protegen la mucosa y las superficies orales, (13)

La IgA sistémica es una molécula monomérica, una isoforma de esta IgA es la que se secreta a la saliva, es la IgA secretora (s-IgA). Se compone de dos moléculas de IgA. una cadena denominada "J", la cual es producida por células plasmáticas y un componente secretor cuya función es protegerla de mecanismos proteolíticos. Cada IgA contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas covalentemente por puentes disulfuro. La cadena J está unida al componente secretor por puentes disulfuro a la fracción Fc de los anticuerpos IgA. (12)

La s-IgA es producida por las células plasmáticas que se ubican en adyacentes a los núcleos y acinos de las células de las glándulas salivales. Este anticuerpo facilita la opsonización bacterias que posteriormente son engullidas

3.4 Importancia de los neutrófilos en el periodonto.

El estado de salud del periodonto es consecuencia de una homeostasis entre la respuesta del sistema inmunológico y la microbiota que habita en el periodonto. El estado de salud normalmente se establece en el surco gingival, siendo un espacio creado entre la encía y el órgano dental. En este sitio se secreta el fluido crevicular cuya producción aumenta con la infiltración de un cuerpo extraño en esta zona. (13) El fluido crevicular proviene del plexo sanguíneo gingival del epitelio. En este fluido hay componentes como electrolitos, proteínas, citocinas, anticuerpos, antígenos provenientes de bacterias y células. (13) Dentro de la fracción celular se ha visto que hay una población de bacterias que forman la biopelícula dental, células epiteliales descamadas e infiltrado inflamatorio como neutrófilos, macrófagos y linfocitos, siendo los neutrófilos la población más abundante de leucocitos en este sitio. Los neutrófilos son reclutados a este sitio mediante la interacción del CXCR2 con sus ligandos como el CXCL1 y el CXCL2, estos ligandos son secretados por el epitelio de unión. (12) Una vez en el surco gingival los neutrófilos mantienen regulada la microbiota oral mediante sus diferentes funciones. La acumulación de biopelícula dental induce un reclutamiento excesivo de neutrófilos, que en una pobre regulación en el proceso de reclutamiento y limpieza de los neutrófilos puede desembocar en daño a los tejidos circundantes por los gránulos enzimáticos liberados para eliminar a las bacterias. (12)

Cuando se pierda el estado de homeostasis en el periodonto se produce una inflamación gingival o gingivitis asociada a la biopelícula dental, y que de no ser tratada conduce a la periodontitis (Figura 4). La periodontitis es una enfermedad crónica multifactorial, caracterizada por la progresiva destrucción de los tejidos de soporte del diente. (6,7,11,13,14) Dicha enfermedad se encuentra asociada al aumento de biopelícula bacteriana que puede ser consecuencia de alteraciones en la producción de neutrófilos.

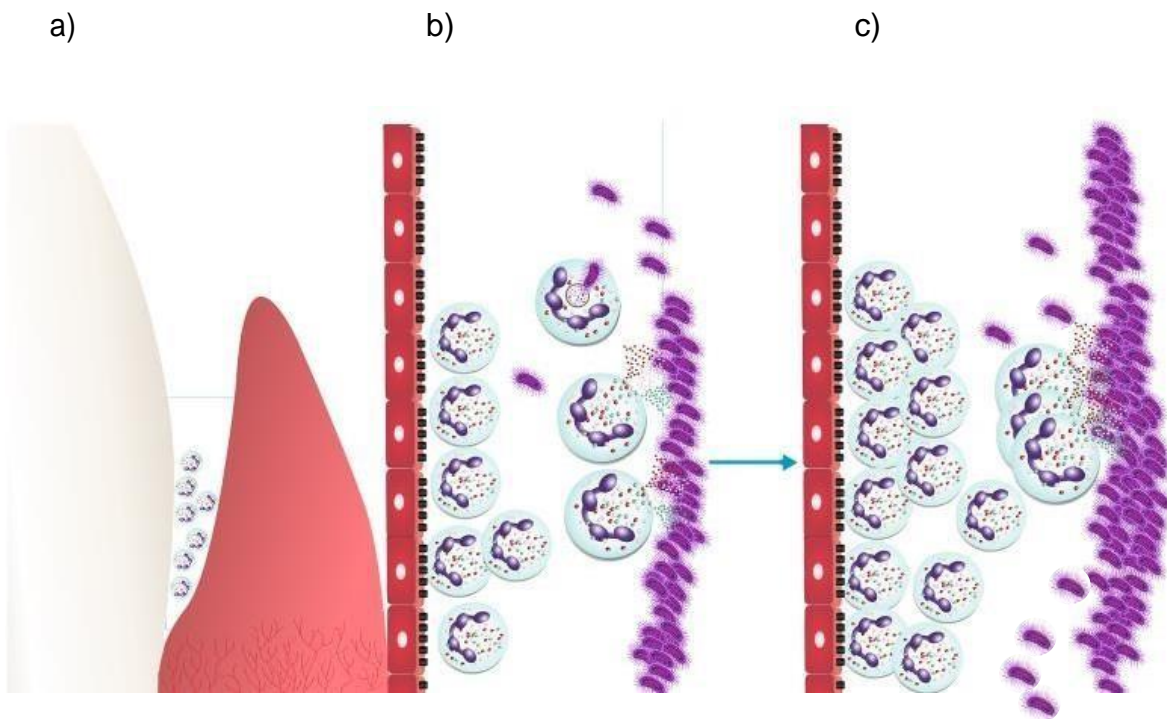


Figura 4. Actividad de neutrófilos en el surco gingival. a) Arribo de los neutrófilos a cavidad oral por medio del fluido crevicular. b) Regulación de la cantidad de microbiota oral por parte de los neutrófilos como función homeostática en cavidad oral. c) La microbiota oral ha excedido las capacidades del sistema inmunológico para regularla. En escenarios severos comienza la lisis de tejidos circundantes

La presencia de los neutrófilos puede ser observada como una respuesta del sistema inmunológico ante infecciones de bacterias patógenas con potencial de dañar al organismo, o también como una respuesta reguladora en el crecimiento de colonias de la microbiota del huésped en varios tejidos periféricos, como la cavidad oral. (5,7,8,13)

Como hemos visto el sistema inmunológico tiene un papel muy importante en preservar la homeostasis de la cavidad oral. El estudio de las funciones de los neutrófilos orales en diferentes ambientes y situaciones nos permitirá entender mejor el proceso de homeostasis y su alteración al presentarse una enfermedad periodontal. Para poder entender la función de los neutrófilos de cavidad oral es indispensable poder aislarlos conservando sus propiedades. Por ello en este trabajo presentamos una mejora a un método ya utilizado para su purificación.

ANTECEDENTES.

4.1. Métodos de purificación de neutrófilos orales.

Con el fin de conocer las características de los neutrófilos orales, varios grupos desarrollaron métodos para su aislamiento y purificación de la cavidad oral. El principio de los métodos se encuentra en la toma de una muestra de saliva que es filtrada a través de una malla de nylon con poro del tamaño promedio de un neutrófilo (10µm-12µm), con el objetivo de separarlos de las células epiteliales. Dos parámetros importantes se consideran en estos protocolos, la viabilidad y la pureza. La viabilidad se mide en porcentaje y corresponde a la cantidad de neutrófilos vivos obtenidos después del procesamiento de la muestra. La pureza indica la cantidad de neutrófilos con respecto a la cantidad de células epiteliales que hay en la muestra. Entre más altos los porcentajes de viabilidad y pureza se considerará al método empleado de mejor utilidad para poder evaluar las funciones de los neutrófilos.

4.2. Ashkenazi y Dennison, 1989.

En 1989 Ashkenazi y Dennison (15) propusieron el siguiente método para la purificación de los neutrófilos, argumentando que con los métodos disponibles hasta el momento, la viabilidad de los neutrófilos era baja. Tomando siete donadores de edades entre 28 y 37 años con mínima o nula inflamación periodontal, los neutrófilos se purificaron de la siguiente forma:

1. Los donadores realizaron enjuagues orales con 15 ml de disolución balanceada

de sales Hank's libre de calcio y magnesio, pH 7.4 adicionada con 0.1 % de gelatina por 30 segundos. Esto se realizó varias veces durante 20 minutos (40 veces aproximadamente).

2. Los enjuagues fueron posteriormente depositados en un recipiente de polipropileno que contenía 400 ml de disolución de Hank's libre de calcio y magnesio, a 4°C.
3. Los enjuagues fueron homogenizados durante 10 minutos y luego centrifugados a 250g, por 5 minutos.
4. El botón celular fue resuspendido en disolución de Hank's libre de calcio y magnesio, posteriormente filtrado primero a través de una malla de nylon de 20 μm y después filtrados por otra malla de nylon de 11 μm .
5. El filtrado fue centrifugado a 250g por 5 minutos y resuspendido en disolución de Hank's.

Como resultado de este procedimiento, la proporción de la población fue de 2.3 células epiteliales por cada 97.7 leucocitos. La viabilidad de los leucocitos fue de 85 %.

4.3. Sato, 1996.

En 1996, Sato y sus colaboradores (16) publicaron un estudio de caracterización y aislamiento de neutrófilos con los siguientes pasos:

1. Una hora después de que los donadores se cepillaron los dientes, sin pasta dental, se realizaron cinco enjuagues orales con 15 ml con disolución de fosfatos Krebs-Ringer (KRP) durante 30 segundos cada uno.
2. Los enjuagues se centrifugaron a 250 g por 5 minutos, a 4°C.
3. Las células obtenidas se resuspendieron en 10 ml de KRP y se filtraron a través de un filtro de nylon para separar PMN de células epiteliales.
4. Este filtrado fue centrifugado nuevamente a 250 g, por 5 minutos, a 4°C y se resuspendió en 3ml de Polymorphprep que se centrifugó nuevamente a 450 g por 30 minutos, a 25°C.
5. Las células se resuspendieron en 10 ml de KRP y se centrifugaron a 450 g por 30 minutos a 25°C y se volvieron a resuspender en KRP.

En este estudio no se especificó ni la pureza ni la viabilidad de los neutrófilos.

4.4. Lakschevitz, Abodi y Glogauer, 2013.

En 2013, Lakschevitz, Abodi y Glogauer (17) reclutaron 76 participantes sistémicamente sanos y no fumadores. Los participantes comprendían 2 grupos: El primer grupo con participantes sanos periodontalmente y el segundo grupo con pacientes con enfermedad periodontal crónica. La edad de estos pacientes era de alrededor de 50 años. Los neutrófilos fueron obtenidos con el siguiente método:

1. Se realizaron 6 enjuagues de cavidad oral con 5 ml de 0.9% de NaCl durante 30 segundos cada uno, con intervalos de reposo de 3 minutos.
2. Los enjuagues fueron depositados en un tubo para centrifuga estéril de 50 ml.
3. La mitad del volumen de los enjuagues fue filtrada secuencialmente por una malla de nylon de 40 μm , luego 20 μm y finalmente de 11 μm . El volumen restante solo fue filtrado a través de la malla de 40 μm .
4. Los filtrados se centrifugaron a 527 g, por 10 minutos, a 4°C y las células se suspendieron en Hank's libre de calcio y magnesio.

Como resultado de este procedimiento se reportó una viabilidad de los leucocitos del 95 % con una pureza de 98%.

4.5. Patrick Rijkschroeff, 2016.

En 2016, Rijkschroeff y colaboradores (18) tomaron 268 muestras de voluntarios sanos con un rango de edad de 18 a 32 años. Los participantes fueron instruidos a no comer, no beber, no masticar goma o chicle o realizar ejercicio físico extenuante antes de la cita, y no cepillar sus dientes una noche anterior y la mañana de la toma de muestra.

Las muestras fueron tomadas en la mañana entre 8:30 am y 10:00 am y se utilizó el siguiente método de purificación de neutrófilos:

1. Se les pidió a los voluntarios que hicieran tres enjuagues con 20 ml de disolución de amortiguador de fosfatos (PBS) con 0.1% de gelatina, durante 30 segundos, con 4.5 minutos de reposo entre cada enjuague.
2. El enjuague fue depositado en dos tubos de 50ml para centrifuga y se mantuvo en hielo hasta el final de recolección de la muestra.
3. Los tubos con los enjuagues fueron agitados durante 1 minuto y centrifugados a 500 g por 10 minutos, a 4°C.
4. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en PBS.
5. La mezcla se filtró primero usando una malla de nylon de 31.5 μm y posteriormente una malla de 10 μm .
6. El filtrado fue centrifugado a 500 g por 10 minutos, a 4°C y las células fueron resuspendidas en PBS con calcio y magnesio.

En este estudio no se especificó ni la pureza ni la viabilidad de los neutrófilos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El estudio de neutrófilos orales comprende un campo reciente para el entendimiento de sus mecanismos celulares y funcionales tanto en condiciones de salud como en estadios de inflamación oral. Por lo tanto, es indispensable tener un método reproducible y confiable para recolectar y purificar neutrófilos. La estandarización de un método de purificación de neutrófilos permitirá obtenerlos en condiciones óptimas para poder realizar otras mediciones de sus funciones y caracterización en ensayos posteriores.

Existen varios métodos de obtención de neutrófilos orales en los que varía el número de enjuagues, las disoluciones amortiguadoras en las que se colectan y mantienen,

el tipo de filtros que utilizan y la fuerza relativa de centrifugación que se ejerce al separarlos de la saliva. Además, no todos los métodos reportan la pureza o viabilidad de los neutrófilos obtenidos. Por ello, en este trabajo se propuso estandarizar las condiciones para obtener neutrófilos orales en un menor tiempo, con mayor viabilidad y pureza.

6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Para poder estudiar las funciones y características de los neutrófilos orales es necesario purificarlos, dado que el éxito de experimentos subsecuentes a este proceso dependen de que los neutrófilos estén vivos y aislados de células epiteliales. Existen varios protocolos para purificar neutrófilos. Sin embargo, ninguno permite obtener neutrófilos de una manera rápida y con porcentajes altos de viabilidad y pureza. Por lo tanto, en este trabajo implementamos modificaciones al método de purificación de neutrófilos orales para obtener en un menor tiempo los neutrófilos viables y puros.

7. HIPÓTESIS.

Las modificaciones del método de obtención y purificación de neutrófilos propuesto en el presente trabajo permitirán obtener en un menor tiempo los neutrófilos viables y puros.

8. OBJETIVO GENERAL.

Estandarizar un método de purificación de neutrófilos orales que permita obtener de manera sistemática neutrófilos viables y puros en un menor tiempo.

8.1. Objetivos específicos.

1. Cuantificar los neutrófilos obtenidos por el método de purificación de neutrófilos para cada una de las modificaciones de este método.
2. Determinar la pureza de los neutrófilos obtenidos por el método de purificación de neutrófilos para cada una de las modificaciones de este método.
3. Determinar la viabilidad de los neutrófilos obtenidos por el método de purificación de neutrófilos para cada una de las modificaciones de este método.
4. Determinar el tiempo requerido para el desarrollo del método de purificación de neutrófilos para cada una de las modificaciones de este método.

9. MATERIALES Y MÉTODOS.

9.1. Materiales

- Tubos para centrífuga Corning™
- Centrífuga Eppendorf™ 5702C
- PBS (phosphate buffered saline)
- Portafiltros Swinnex 47 mm SX0004700 Merck Milipore™
- Portafiltros Swinnex 25 mm SX0002500 Merck Milipore™
- Filtros celulares de 40 y 20 µm Falcon™
- Jeringa de 20 ml
- Microscopio Olympus, modelo X170
- Tubos para centrifuga Eppendorf™
- Micropipetas
- Pipetas serológicas

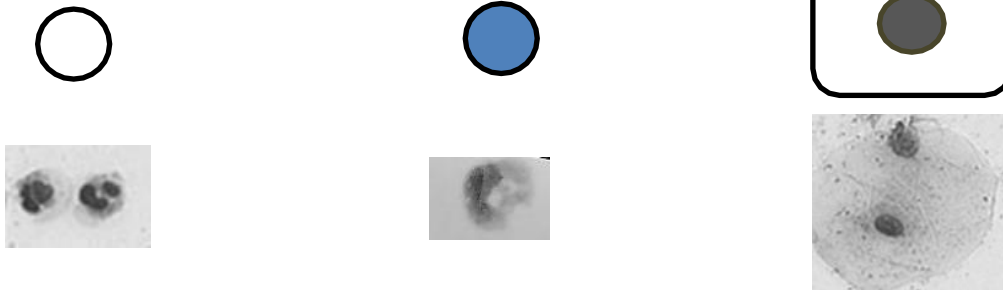
9.2. Voluntarios:

En este trabajo se incluyeron voluntarios de género masculino y femenino en un rango de edad de 20 a 40 años previo a la firma de a un consentimiento informado (Anexo 1) para la donación de una muestra de enjuagues que se tomó en un horario de 8:00-10:00 am previo al primer cepillado de los donadores.

9.3. Identificación de células obtenidas de enjuagues orales

Se identificaron dos tipos de células, las células polimorfonucleares y las células epiteliales. La viabilidad de las células se determinó por exclusión con azul de tripano. Las células fueron teñidas Wright-Giemsa para poder observar su morfología en el microscopio Olympus, modelo X170 en aumento de 40x.

Las células se observaron de la siguiente forma:



Célula polimorfonuclear viva: Células refringentes.

Célula polimorfonuclear muerta: El citoplasma se tiñe con azul de tripano ya que atravesó la membrana celular

Célula epitelial: Es aproximadamente 10 veces más grande que una célula polimorfonuclear, forma rectangular redondeada. Núcleo grande y visible.

9.4. Cuantificación de células obtenidas de enjuagues orales

La cuantificación de células se realizó usando la cámara de Neubauer. La siguiente fórmula fue usada para calcular el número de células por mililitro.

$$\text{Células por mililitro} = \left(\frac{\text{Suma de las células en los cuatro cuadrantes}}{4} \right) (2)(10^4)$$

En cada modificación también se calculó porcentaje de pureza y el porcentaje de viabilidad de los neutrófilos.

$$\text{Viabilidad} = \left(\frac{\text{Número de neutrófilos vivos}}{\text{Número de neutrófilos muertos}} \right) 100$$

$$\text{Pureza} = \left(\frac{\text{Número de neutrófilos totales}}{\text{Número de células totales}} \right) 100$$

Tinción de Wright-Giemsa

Se tomaron 50 μ l de cada filtrado y fueron extendidos sobre un portaobjetos. La muestra se secó agitando el cubreobjetos de un lado a otro. Se colocaron 150 μ l de tinción Wright-Giemsa sobre la muestra y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocaron 200 μ l de PBS sobre la tinción y se incubó por 12 minutos, a temperatura ambiente. Una vez concluido el tiempo, se eliminó el excedente de colorante mediante el uso de agua bidestilada. Finalmente se colocó un cubreobjetos encima de la muestra y ésta fue observada al microscopio.

9.5. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM). Las comparaciones entre los grupos se hicieron usando la prueba de ANOVA de una vía utilizando el programa de computadora KaleidaGraph versión 4.5.2 para Mac. Se consideró estadísticamente significativo el valor con una P menor a 0.05.

9.6. Obtención de neutrófilos orales

Con el propósito de purificar un mayor número de neutrófilos en un menor tiempo se realizaron siete modificaciones al método de purificación de neutrófilos. En cada modificación se identificaron y cuantificaron las células obtenidas de los enjuagues orales correspondientes. Se realizaron al menos 5 repeticiones de cada método, con excepción de la modificación 2 en la cual se realizaron mas de 20 ensayos.

Método original:

Cada voluntario realizó enjuagues con 5 ml de NaCl al 0.9% durante 30 segundos y lo depositó en un tubo estéril para centrifuga. El intervalo entre cada enjuague fue de tres minutos hasta completar 30 ml de enjuagues orales.

Los enjuagues orales se filtraron por filtro de 11 μ m con un diámetro de 47mm, usando presión al filtrar.

El filtrado se centrifugó a 1500rpm en centrifuga Eppendorf por cinco minutos a 4°C

El sobrenadante se retiró mediante succión al vacío y el botón celular se resuspendió en 1ml de PBS para su cuantificación y tinción.

Las células permanecieron en hielo hasta haber completado el procedimiento

Modificación 1 (filtrado secuencial sin presión con 30 ml de muestra). Todos los pasos del método original a excepción de que en el paso 2, antes de la filtración, los enjuagues fueron pasados por dos coladeras, una de 100 μm y otra de 40 μm . Sin hacer presión en el émbolo de la jeringa.

Modificación 2 (filtrado secuencial sin presión con 40 ml de muestra). Todos los pasos de la modificación 1 a excepción de que en el paso 1 se completaron 40 ml de enjuagues.

Modificación 3 (filtrado secuencial sin presión con 50 ml de muestra). Todos los pasos de la modificación 2 a excepción de que en el paso 1 se completaron 50 ml de enjuagues.

Modificación 4 (filtrado con portafiltro de 47 mm con 30 ml de muestra). Todos los pasos del método original a excepción de que en el paso 2, la filtración se realizó sin hacer presión en el émbolo.

Modificación 5 (filtrado con portafiltro de 25 mm con 30 ml de muestra). Todos los pasos del método original a excepción de que en el paso 2, la filtración se realizó con filtros de nylon de 11 μm con un diámetro de 25mm, más la modificación 1, sin hacer presión en el émbolo.

Modificación 6 (filtrado con portafiltro de 25 mm con 15 ml de muestra). Todos los pasos del método original a excepción de que en el paso 1 se completaron 15 ml de enjuagues. Más las modificaciones 4 y 5, la filtración se realizó con filtros de nylon de 11 μm con un diámetro de 25 mm, sin hacer presión en el émbolo.

10 RESULTADOS.

10.1. Neutrófilos y células epiteliales son obtenidos en diferentes proporciones, dependiendo de la modificación del método original.

Después de cada modificación al método original de purificación de neutrófilos, las células fueron teñidas con Wright-Giemsa. Usando el método original con presión en el émbolo se obtuvieron tanto células epiteliales como neutrófilos (Figura 5a). Al quitar la presión del émbolo (modificación 1) aún se observan algunas células epiteliales (Figura 5b). Todas las modificaciones posteriores presentaron muchos neutrófilos (Figura 5).

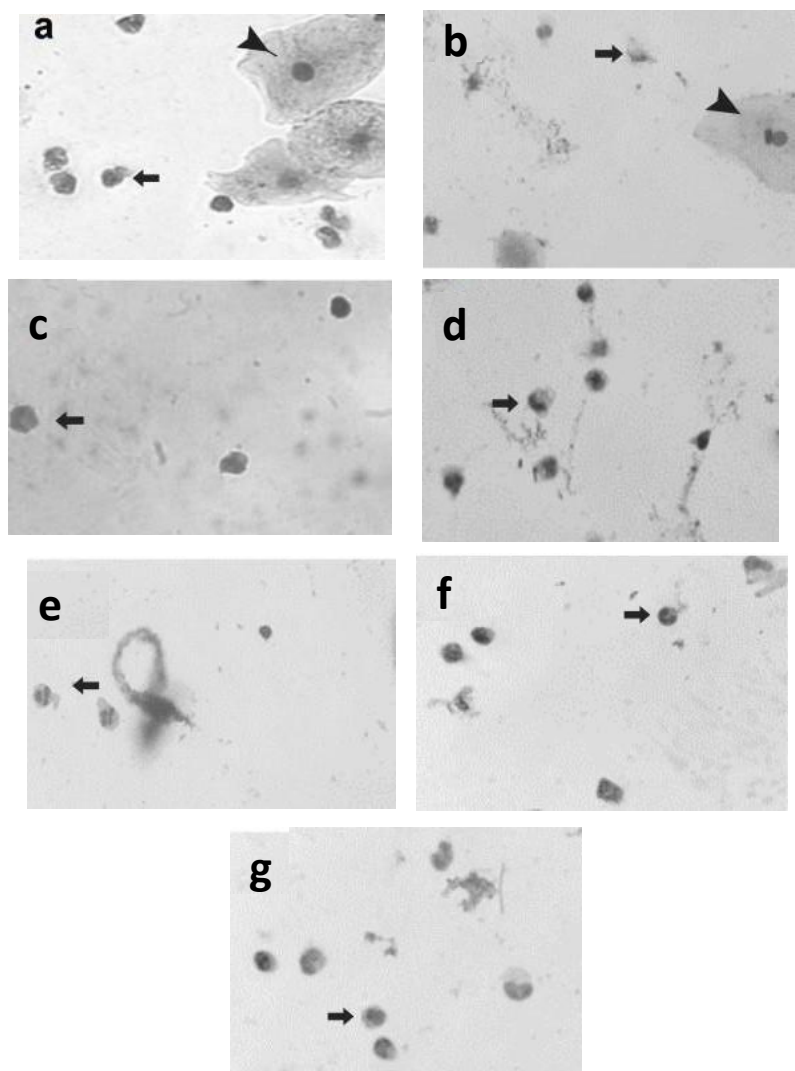


Figura 5. Microfotografías de células teñidas con Wright-Giemsa de cada método o modificación. Se observan células epiteliales (punta de flecha) y neutrófilos (flechas)

- a) Método original
- b) Modificación 1
- c) Modificación 2
- d) Modificación 3
- e) Modificación 4
- f) Modificación 5
- g) Modificación 6

Modificación 1 (filtrado secuencial sin presión con 30 ml de muestra).

En esta modificación, los enjuagues orales se pasaron por coladeras de 100 μm y otra de 40 μm para eliminar partículas mayores a estos diámetros y luego, los enjuagues se filtraron por un filtro de 11 μm sin hacer presión en el émbolo de la jeringa. La cantidad de neutrófilos obtenida fue un tercio de la obtenida en el método original (Tabla 1). Sin embargo, la pureza aumentó de 77% a 84% y la viabilidad de 80% a 91% (Tabla 1). Además, el proceso tardó aproximadamente una hora (Tabla 1).

Modificación 2 y 3 (filtrado secuencial sin presión con 40 y 50 ml de muestra).

Al protocolo de la modificación 2 y 3 se decidió aumentar el volumen de enjuagues a 40 ml y 50 ml, respectivamente. El aumento en el volumen de enjuagues permitió incrementar la cantidad de neutrófilos a casi un millón con 40 ml y 50 ml. La pureza fue más del 98% en ambos casos, pero la viabilidad disminuyó al 76% y 82% para 40 ml y 50 ml, respectivamente. Ambos procedimientos tomaron más de una hora (Tabla 1).

Modificación 4 (filtrado con portafiltro de 47 mm con 30 ml de muestra). Se decidió comparar el uso del filtrado secuencial con las coladeras usadas en los métodos anteriores con el uso de un solo filtro. Para ello, en este método se usó una portafiltro de 47 mm junto con una malla de nylon de 11 μm . Se observó que la pureza fue de 91% y la viabilidad de 86% en promedio. Además, se decidió usar un volumen de muestra de 30 ml nuevamente para reducir su tiempo del procedimiento. Este procedimiento tardó aproximadamente una hora (Tabla 1).

Modificación 5 y 6 (filtrado con portafiltro de 25 mm con 30 y 15 ml de muestra).

Los filtros de nylon de 11 μm con un diámetro de 25mm aumentan la pureza y mantienen la viabilidad, pero el número de células disminuye. Una vez que vimos sin usar presión la pureza aumentaba se probó un filtro con menor área. El resultado fue que se obtuvieron menos de un millón de neutrófilos. Sin embargo, la pureza fue casi del 100% y su viabilidad del 95%. Otra ventaja es que se obtuvieron en

menos tiempo, alrededor de 45 minutos (Tabla 1). Se observó que en la modificación 6 un menor volumen de enjuagues aumenta la cantidad de neutrófilos y mantiene la pureza y la viabilidad. Al usar menos volumen de enjuagues mejoró la cantidad de neutrófilos obtenidos. Dado que el área del filtro de nylon de 11 μm con un diámetro de 25mm es menor, es probable que se saturara de células e impidiera el paso de las células. Con la finalidad de evitar saturar el filtro se decidió disminuir el volumen de los enjuagues a 15 ml. Esta modificación fue muy exitosa pues permitió obtener más de un millón de neutrófilos con una pureza y viabilidad mayor al 93% y en un tiempo aproximado de 40 minutos (Tabla 1).

Tabla 1. Características evaluadas en cada método.

Método	Conteo de neutrófilos (millones)	Pureza %	Viabilidad %	Tiempo aproximado (min)
<i>Método original</i>	1.62E+06	77.42±4.4	80.82±6.69	40
<i>Modificación 1</i>	5.58E+05	88.56±9.8	91.32±8.67	60
<i>Modificación 2</i>	1.00E+06	92.46±3.5	76.82±3.39	65
<i>Modificación 3</i>	9.87E+05	99.66±0.1	82.16±3.53	70
<i>Modificación 4</i>	1.13E+06	93.44±4.6	86.52±2.03	60
<i>Modificación 5</i>	7.52E+05	99.08±0.8	95.04±1.43	45
<i>Modificación 6</i>	1.02E+06	96.91±0.7	93.82±1.05	40

La cantidad de neutrófilos con mayor reproductibilidad fue la obtenida usando la modificación 6.

Aunque la cantidad de neutrófilos obtenidos con cada una de las modificaciones fue menor que con el método original, la modificación 6 fue la que tuvo una mayor reproductibilidad.

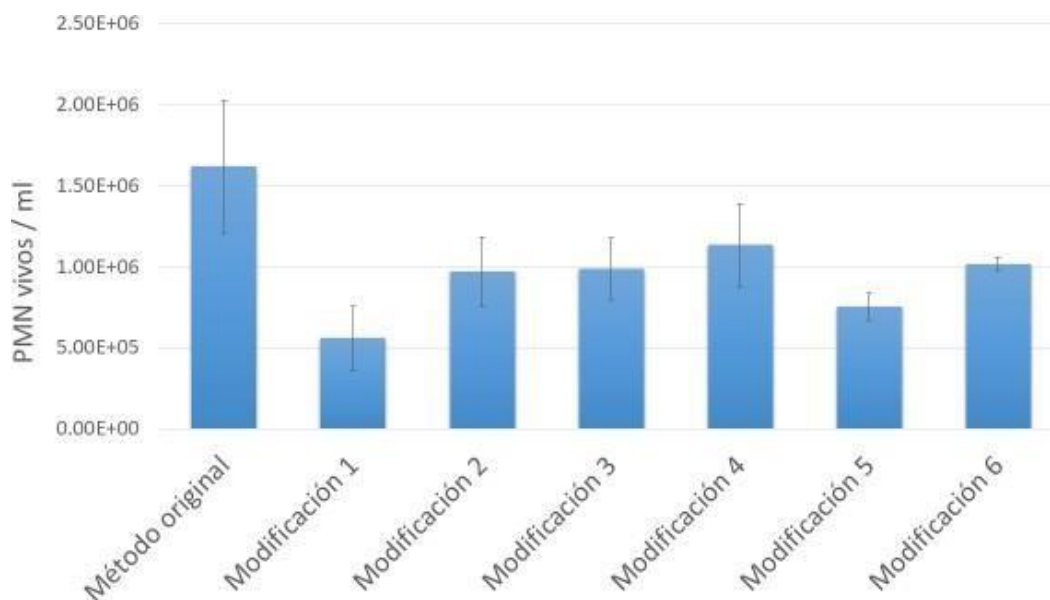


Figura 6. El método 6 es el más reproducible para la obtención de neutrófilos. Los datos son el promedio de al menos cinco experimentos independientes \pm error estándar.

Al parecer, el ejercer presión en el émbolo genera mucha variación en la cantidad de neutrófilos que se obtienen con el método original. Las otras modificaciones son muy parecidas en cuanto al número de neutrófilos obtenidos. Se muestra una gráfica de barras con el conteo de neutrófilos vivos en cada muestra correspondientes a la viabilidad de cada método. Sobre el eje "x" se encuentra descrito a que método pertenece cada conteo. En el eje "y" se muestra el número de neutrófilos obtenidos. Se observa que en el método 1 se obtuvo mayor número celular, sin embargo, este método tiene la barra de error más grande. La

dispersión se corrigió en los métodos consiguientes eliminando la filtración por presión manual.

El mayor porcentaje de viabilidad se observó con las modificaciones 5 y 6

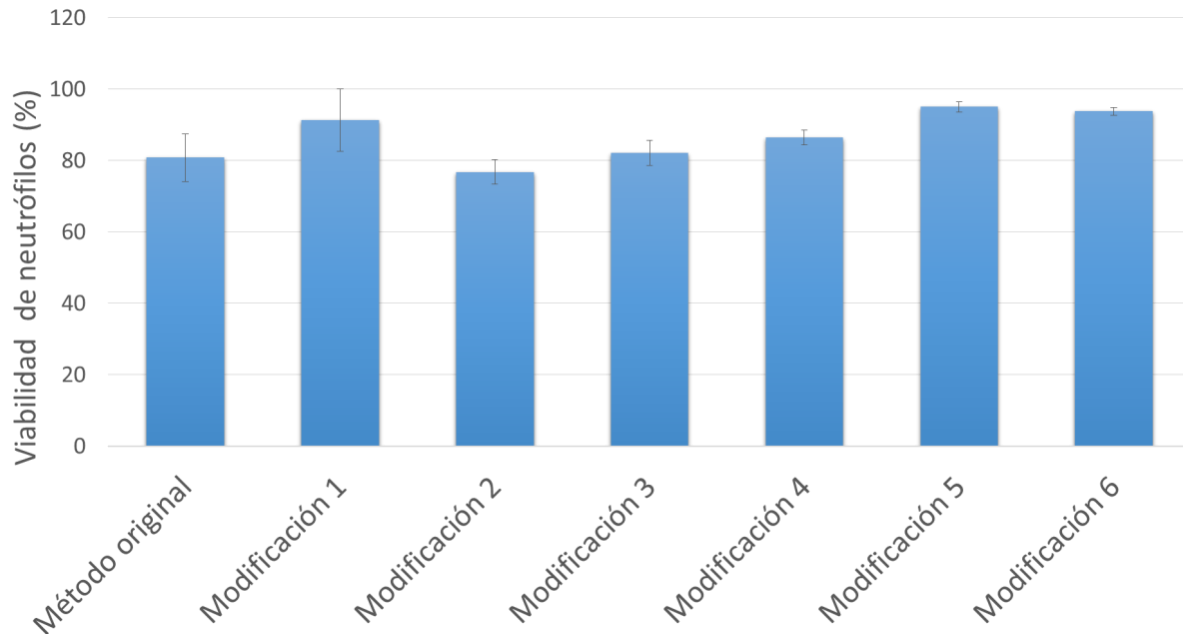


Figura 7. Los métodos que ofrecen una mejor viabilidad son la modificación 5 y 6. Los datos son el promedio de al menos cinco experimentos independientes error estándar.

Se aprecia que la mayor cantidad de neutrófilos muertos se encuentra en el método original. Esto debido posiblemente a la fuerza de presión ejercida en el émbolo de filtrar en el momento de pasar la muestra a través del portafiltro. Los métodos 5 y 6 son los que tienen la menor población de células muertas, y su porcentaje oscila entre 92 a 95%, siendo los valores más altos. Se atribuye que la mejoría en las modificaciones fue debido a no hacer presión manual sobre el émbolo de la jeringa al momento de hacer pasar la muestra a través del portafiltro además del tiempo de recolección. El tiempo de recolección del método 5 fue de 45 minutos y el de la modificación 6 de 40 minutos.

El mayor porcentaje de pureza se observó con las modificaciones 3 y 5.

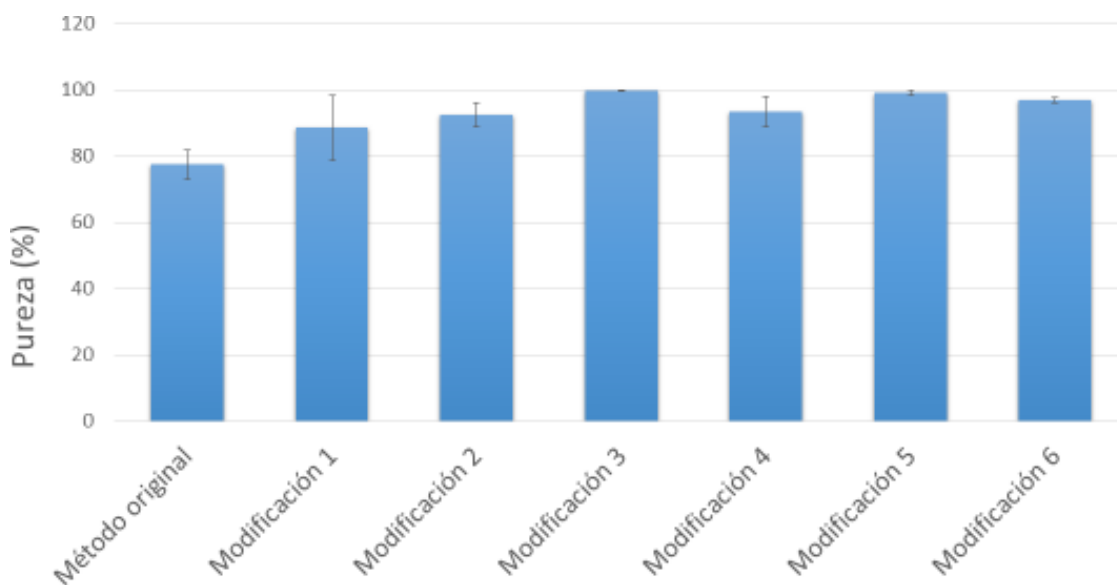


Figura 8. Los métodos que ofrecen una mejor pureza son las modificaciones 3 y 5. Los datos son el promedio de al menos cinco experimentos independientes error estándar.

Las modificaciones 3 y 5 son los que poseen un porcentaje de pureza mayor al 98%. Aunque no existen diferencias entre las modificaciones al realizar el análisis estadístico por el método ANOVA, experimentalmente entre más pura la muestra es mejor para la reproducibilidad de los experimentos.

11.DISCUSIÓN

Los métodos de obtención de neutrófilos de cavidad oral publicados hasta el momento ofrecen una amplia variedad en cuanto al volumen de muestra necesario para obtener un número significativo de células. En los estudios publicados por Sato y Ashkenazi utilizan un volumen de muestra próximo a 200 ml y 600 ml respectivamente, mientras que en años recientes el volumen usado es de 30 ml a

60 ml tal como lo reportan Flavia S. Lakschevitz y Patrick Rijkschroeff. No sólo el volumen de muestra varía de un método a otro, sino también el número de neutrófilos orales obtenido en cada uno.

Mediante la obtención de células de cavidad oral cuyo volumen de muestra fue de aproximadamente 30 ml totales de enjuagues hechos con NaCl (cloruro de sodio) al 0.9%, se consiguió obtener 1'500,000 de células en promedio en 1ml de resuspensión. En algunos casos en el conteo celular se observaron más de 2 millones de células en cavidad oral en 1 ml de resuspensión, de esta forma, se determinó que 30ml de enjuagues es un volumen adecuado de muestra para proceder con los procesos de filtración y separación de los neutrófilos de cavidad oral.

El primer método o método original, consistió en el proceso de filtración usando un portafiltro de 47 mm Swinnex con una malla de nylon de 11 μ m. Se filtró haciendo presión manual sobre el émbolo de la jeringa que se embonó sobre el portafiltro. Esta forma de presión fue utilizada para apresurar el paso de la muestra a través del filtro de malla de nylon. Cabe mencionar que; en los artículos consultados para la evaluación de los métodos no se hace mención del uso o no de presión manual sobre el émbolo de la jeringa.

A pesar de obtener un conteo celular total de 1'620,000 en promedio la viabilidad de estas muestras fue de 80.82% y una pureza de 77.42% siendo entonces el método que a pesar de que permite obtener una buena cantidad de neutrófilos orales en el menor tiempo, la muestra se encuentra bastante contaminada por células epiteliales y la viabilidad no es adecuada para proseguir con estudios de funcionalidad o caracterización de estas células.

En las modificaciones 1, 2 y 3 se omitió ejercer presión sobre el émbolo de la jeringa que contenía la muestra debido a los resultados obtenidos en el método original. Además permitió valorar el paso de la muestra a través de filtros de

un mayor a un menor calibre basados en la publicación de Lakschevitz, Abodi y Glogauer del 2013.(19)

El tamaño del portafiltro utilizado fue de 47 mm Swinnex y se probaron diferentes volúmenes de la muestra: 30 ml de enjuagues en la modificación 1, 40 ml en la modificación 2 y 50 ml en la modificación 3. Se demostró que el uso de un filtrado secuencial aumenta de forma considerable la pureza de la muestra llegando a alcanzar un 99% aproximadamente cuando se emplean 50 ml de volumen de enjuagues. En contraste la viabilidad o la fracción de la muestra perteneciente a los neutrófilos vivos no alcanzó un porcentaje mayor de 91% en el mejor escenario.

La mayor pureza fue vista en la modificación 3 con un 98%, sin embargo la viabilidad promedio de estos 3 métodos en promedio fue de 82.05%. Se concluye que fue debido al tiempo de filtración y obtención de la muestra que fue de más de 1 hora aproximadamente.

En la modificación 4 nuevamente se omitió el uso de presión manual sobre el émbolo de la jeringa dejando que la filtración ocurriese por gravedad y se comparó como se veía afectado el procesado de la muestra cuando solamente se usaba el filtro. Se obtuvo una pureza y viabilidad del 93.44% y 86.52% respectivamente. Podemos apreciar que con el uso de solamente un filtro con este diámetro no es posible obtener una viabilidad igual a la de la modificación 3 o que llegue a un 99%.

En la modificación 5 Y 6 se cambió el diámetro de portafiltro a 25 mm. Este cambio nos permitió deducir que a una menor área de portafiltro correspondería a un menor volumen de muestra para que sea posible obtener mayor número de neutrófilos a través del filtro de malla de nylon. Esto se observa ya que el usar un volumen de 15 ml en el portafiltro de 27 mm obtuvimos un conteo celular de 1'002,000 en 1ml de resuspensión, mientras que si se usaba un volumen de muestrade 30ml el conteo celular fue de 752,000 en 1ml de resuspensión. La pureza de la modificación 5 fue de 99.08% y su viabilidad de 95.04%.

De acuerdo con todo lo anterior, el uso de presión con el émbolo de la jeringa aumenta la cantidad de células encontradas tras el filtrado, pero la muestra queda bastante contaminada por células epiteliales y la viabilidad de la muestra disminuye considerablemente.

La reducción del área del portafiltro y el manejo del procedimiento de filtración sin el uso de presión en el émbolo de la jeringa fue una condición necesaria para el aumento de la viabilidad y pureza en las muestras. Sin embargo el número celular obtenido y de neutrófilos disminuyó bastante, ya que en algunas ocasiones se obtuvo menos de un millón de células por mililitro. Otra ventaja en este caso fue la reducción del tiempo a 40 minutos aproximadamente para la purificación de la muestra.

El uso de un filtrado secuencial mejora la pureza de la muestra pero no la viabilidad debido posiblemente al tiempo del filtrado y procesado de la muestra que fue de una hora aproximadamente. Estas condiciones se deben tomar en cuenta al realizar ensayos que impliquen la funcionalidad de los neutrófilos orales. La modificación 3 puede ser una buena opción dado la pureza obtenida en la muestra y la cantidad de células por mililitro que se obtiene a partir de esta modificación, aunque se debe trabajar de la forma más rápida en el procesado de la muestra para mejorar la viabilidad.

Dado el análisis estadístico y la comparación de gráficas se puede observar que el método original es que presenta más variabilidad en comparación de las modificaciones posteriormente realizadas.

Finalmente es notable que los métodos 5 y 6 ofrecen porcentajes de viabilidad y pureza bastante altos, con los que se puede llevar a cabo ensayos de funcionalidad y caracterización de neutrófilos orales. Además el tiempo empleado en estos métodos fue el menor empleado a comparación de las modificaciones 1 a 4. Otra ventaja de estas modificaciones se advierte gracias a las barras de error mostradas en las gráficas que estos métodos ofrecen reproductibilidad, ya que no hubo variabilidad significativa.

- **CONCLUSIONES.**

La filtración sin presión aumenta el porcentaje de pureza. Con el método original para purificar neutrófilos encontramos que se obtenía por lo regular millón y medio de neutrófilos. Sin embargo, su pureza fue de 77.42% y su viabilidad del 80.82%. Éste proceso tomó aproximadamente 40 minutos.

El hecho de no ejercer presión manual sobre el émbolo de la jeringa redujo el número de neutrófilos, en el menos favorable de los casos a 558,000 (modificación 1) pero también se logró obtener aproximadamente un millón de neutrófilos, tal como se observó en la modificación 2,4 y 6. Como se planteó, no hacer presión con el émbolo de la jeringa aumentó la pureza y la viabilidad de las modificaciones subsecuentes. Aunque 10 minutos adicionales son requeridos adicionalmente para el procesado de la muestra.

Finalmente la modificación 5 fue la mejor. Con esta se obtuvo una viabilidad del 95.04% y una pureza del 99.08%., además el tiempo para realizar el procedimiento fue de 45 minutos, estas características se ven reflejadas en que la muestra presentó una nula cantidad de células epiteliales y una porción mayor de neutrófilos vivos que muertos. Se considera que con las propiedades de esta modificación se podrán ensayos para analizar el comportamiento funcional de los neutrófilos, así como describir su fenotipo en distintas condiciones. No sólo de salud sino de enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Ira Fox S. Fisiología Humana. Editorial Mc Graw Hill México; 2011. p. 15-17
2. Real academia española. Diccionario de la lengua española, 23.^a ed [versión 23.3 en línea]. <<https://dle.rae.es>>
3. Fougerau M. La inmunología. Prensas universitarias de Francia París;1984. 25 p.
4. Fainboim L, Geffner J. Introducción a la Inmunología Humana. Editorial Panamericana Buenos Aires, Bogotá; 2011.
5. Rosales C, Lowell C, Schnoor M, Uribe-Querol E. Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol. Res.* 2017; 97(7). Recuperado a partir de doi:10.1155/2017/9748345
6. Cortés-Vieyra R, Rosales C, Uribe-Querol E. Neutrophil functions in periodontal homeostasis. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016(2016): p.1–9. Recuperado a partir de doi:10.1155/2016/1396106
7. Hajishengallis E, Hajishengallis G. Neutrophil Homeostasis and Periodontal Health in Children and Adults. *J. Dent. Res.* 2014; 93(3): p. 231-237. Recuperado a partir de doi:10.1177/0022034513507956
8. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types?. *Front physiol.* 2018; 9(113): Recuperado a partir de doi:10.3389/fphys.2018.00113
9. Uribe-Querol E, Rosales C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front Immunol.* 2017; 8(1368): Recuperado a partir de doi:10.3389/fimmu.2017.01368
10. Lacy, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *All Asth Clin Immun.* 2006; 2 (98): Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1186/1710-1492-2-3-98>
11. Brinkman V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 2004; 303(5663): p. 1532-1535. Recuperado de doi:10.1126/science.1092385
12. Lang NP, Lindhe J, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz M. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* John Wiley and Sons Chichester, West Sussex, England; 2015. 393-402 p.

13. Almaguer Flores A, Villagómez Olea J. Ecología oral. El manual moderno Ciudad de México; 2017. 114-118 p.
14. Delima A.J, Van Dyke T.E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003; 31: p. 55-76. Recuperado de doi: 10.1034/j.1600-0757.2003.03105.x.
15. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Neutrophil Homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J.Lukoc. Biol.* 2015; 98(4): p. 539-48. Recuperado de doi:10.1189/jlb.3VMR1014-468R
16. Sato EF, Utsumi K, Inoue M. Human oral neutrophils: isolation and characterization. En: *Methods in enzymology*. Estados Unidos: Editorial Academic Press; 1996. 268: p. 503-509. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)68052-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)68052-5).
17. Rijkschroeff P, Jansen ID, van der Weijden FA, Keijser BJ, Loos BG, Nicu EA. Oral polymorphonuclear neutrophil characteristics in relation to oral health: a cross-sectional, observational clinical study. *IJOS*. 2016; 8(3): p. 191–198. Recuperado de doi: 10.1038/ijos.2016.23
18. Ashkenazi M, Dennison DK. A New Method for Isolation of Salivary Neutrophils and Determination of Their Functional Activity. *IADR*. 1989; 68 (8): p. 1256-1261. Recuperado de doi:10.1177/00220345890680080901
19. Lakschevitz FS, Aboodi GM, Glogauer M. Oral Neutrophil Transcriptome Changes Result in a Pro-Survival Phenotype in Periodontal Diseases. *PLoS One*. 2013; 8(7): Recuperado de doi: 10.1371/journal.pone.0068983
20. Rosales C, Uribe-Querol E. Neutrophil Role in Periodontal Disease, En: Khajah MA. *Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis*. Khajah MA. Rijeka, Croacia. Editorial InTech d.o.o; 2017 pp 67-88. Recuperado de doi: 10.5772/67789
21. Freshney R.I. *Culture of animal cells A manual of basic technique*. Editorial Wiley-Liss Estados Unidos; 2005. p. 213
22. Uriarte SM, Edmisson JS, Jimenez Flores E. Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug of war between a harmonious and a discordant coexistence. *Immunol*. 2015; .273(1); p. 282-298. Recuperado de doi:10.1111/imr.12451
23. Moutsopoulos NM, Konkel J, Sarmadi M, et al. Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Sci Transl Med*. 2014; 6(229): p.229-240. Recuperado de doi:10.1126/scitranslmed.3007696

24. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 2013 210(7); p. 1283-1299. Recuperado de <https://rupress.org/jem/article/210/7/1283/41341/Diverse-novel-functions-of-neutrophils-in-immunity>
25. Bender JS, Thang H, Glogauer M. Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. *J. Periodontal Res.* 2006;41(3): p. 214–220. Recuperado de doi:10.1111/j.1600-0765.2005.00861.x.
26. Flavia S, Guy M, Michael G. Oral Neutrophils Display a Site-Specific Phenotype Characterized by Expression of T-Cell Receptors. *J. periodontol.* 2013. 84(10): p.1493-503. Recuperado de doi: 10.1902/jop.2012.120477

Anexo 1
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La Ley General de Salud. Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I. Disposiciones Comunes Artículo 13 y 14. En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto en su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo o mayor acuerdo al artículo 17 y cumplimiento con los aspectos mencionados con el Artículo 21.

- I. Se me ha explicado que mi donación de saliva es para realizar estudios de investigación sobre el funcionamiento normal de los leucocitos (glóbulos blancos en sangre). Esta donación es completamente voluntaria de mi parte y no pone en riesgo mi salud ni integridad física de ninguna manera
- II. Se me ha informado que se tomarán 40 ml a 60 ml de saliva por medio de un enjuague, usando tubos para centrifuga nuevos. Estos serán destruidos y desechados inmediatamente después de su uso.
- III. Se me explicó que la toma de saliva es un procedimiento inofensivo y que es realizado en forma rutinaria en este laboratorio por personal altamente capacitado y con mucha experiencia.
- IV. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con mi donación de saliva y de cómo se usará mi saliva en este estudio.
- V. Por medio de este consentimiento también autorizo la publicación de los resultados que se obtengan con el uso de mi saliva en este estudio, a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o se revelará mi identidad.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi donación de saliva para el proyecto acepto donar un poco de mi saliva para el estudio titulado: **Papel de neutrófilos en la cavidad oral.**

Nombre y firma del donador voluntario _____

Nombre y firma del Testigo 1

Nombre y firma del Testigo 2

Nombre y firma del Investigador Responsable 1:

Dra. Eileen Uribe Querol Nombre y firma del

Investigador Responsable 2: Dr. Carlos Rosales

Ledezma

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en el poder del sujeto de investigación o surepresentante legal y otro en el poder del investigador