



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

FUNCIÓN DE NEUTRÓFILOS ORALES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ALFREDO ALAN OSEGUEDA ESPINOSA

TUTOR PRINCIPAL

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA

DRA. EILEEN URIBE QUEROL
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Ciudad de México, septiembre 2023



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 Dios por darme todo cuanto he recibido.

*A mi grandiosa Universidad Nacional Autónoma de México.
por todo lo que me ha permitido realizar.*

Este trabajo de tesis de maestría se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Carlos Rosales Ledezma y fue apoyado en parte por el Proyecto IN205523 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y por el Proyecto CF-2023-I-610 del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, México.

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma, por permitirme desarrollar este trabajo, por el tiempo dedicado y el conocimiento compartido.

A la Dra. Eileen Uribe Querol, por darme la oportunidad de tener esta gran experiencia: por todo el apoyo y conocimiento compartido.

A la M. en IBB Nancy Mora Pérez por el apoyo técnico en la realización de esta tesis.

Dedicatoria:

A mi hermosa familia que amó y que nunca me han dejado solo:

A mi mamá María del Rocío Espinosa Amatilla y a mi papá José Alfredo Osegueda Martínez, que siempre me han cuidado y procurado lo mejor para mí. Especialmente a mi mami, por dedicarnos su vida, guiarnos siempre y en todo y por enseñarnos que siempre hay una oportunidad para alcanzar nuestros objetivos. Gracias, mamá Rosiyito.

A Jazmine y Sharon:

mis hermanas que siempre están para mí y me apoyan en todo.

A mis niños:

Dayanna, Matias y mi hermosa Lia,

por hacerme conocer el amor de tío.

A Victor,

por estar incondicionalmente desde el comienzo: Gracias Vico.

A mis abuelitos Florencia y Gabriel, por su cariño y apoyo, siempre.

A toda mi demás familia, que siempre nos han demostrado afecto y apoyo.

A todos los estudiantes que deben escribir una tesis, para lograr sus metas.

INDICE

	página
Resumen	5
Abreviaturas	6
Introducción	7
1. Homeostasis de neutrófilos	10
1.1 Producción	11
1.2 Tráfico	12
1.3 Eliminación	14
2. Activación de neutrófilos	15
3. Funciones microbidas de neutrófilos	16
3.1 Gránulos y degranulación	16
3.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	18
3.3 Fagocitosis	19
3.4 Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	21
4. Neutrófilos en cavidad oral	22
4.1 Componentes y características del periodonto	23
4.2 Neutrófilos y salud oral	23
4.3 Interacción de neutrófilos con bacterias orales simbióticas	24
4.4 Enfermedad periodontal	25
4.5 Interacción de neutrófilos con bacterias orales disbióticas	26
4.6 Neutrófilos hiperactivos	27
5. Planteamiento del problema	30
6. Pregunta de investigación	31
7. Hipótesis	31
8. Objetivo general	31
9. Objetivos particulares	31
10. Criterios de inclusión y exclusión	32
11. Materiales y métodos	33
12. Resultados	36
13. Discusión	55
14. Conclusiones	58
15. Perspectivas	60
16. Referencias	61

Resumen

Los neutrófilos, son células del sistema inmunológico y en los humanos son los leucocitos más abundantes en la circulación sanguínea. Los neutrófilos son las primeras células reclutadas a sitios de infección o inflamación, para combatir a los microorganismos patógenos y limitar el daño en los tejidos. Los neutrófilos eliminan a los microorganismos a través de diversos mecanismos microbicidas. La cavidad oral es uno de los sitios anatómicos colonizado por una gran cantidad de microorganismos incluidos: bacterias, hongos y virus. Las bacterias son las más predominantes dentro de cavidad oral, cerca de 200 especies distintas de bacterias colonizan de manera comensal los tejidos duros y blandos de la boca. Además, también existen bacterias patógenas que se han relacionado con el inicio y desarrollo de enfermedades gingivales, caracterizadas por inflamación y en casos severos la destrucción del tejido óseo. Los neutrófilos salen de la circulación sanguínea y llegan a la cavidad oral, donde desempeñan una función de protección contra los microorganismos patógenos. El conocimiento que se tiene sobre la biología de los neutrófilos se basa principalmente en el estudio de las células sanguíneas. Sin embargo, el conocimiento sobre el comportamiento de los neutrófilos en la cavidad oral aún es limitado.

Para determinar las diferencias funcionales entre los neutrófilos de circulación sanguínea y los neutrófilos provenientes de cavidad oral, en este estudio analizamos dos funciones antimicrobianas de los neutrófilos: la producción de ROS y la formación de NETs. Los neutrófilos orales produjeron especies reactivas de oxígeno sin necesidad de ser estimulados con agentes activadores como los ésteres de forbol (PMA). En cambio, los neutrófilos de sangre no producen ROS en condiciones basales y requieren ser activados con PMA para producir ROS. Además, los neutrófilos orales mostraron variabilidad en su morfología nuclear. En muchos neutrófilos el núcleo estaba compacto y lobulado, en forma similar a los núcleos de los neutrófilos de sangre. Sin embargo, en algunos neutrófilos, el núcleo parecía descondensado, siendo esto compatible con la formación de NETs. En contraste, los neutrófilos de sangre sólo mostraron núcleos descondensados y fibras de cromatina (NETs) después de ser estimulados con PMA. Estas características sugieren que los neutrófilos de la cavidad oral se encuentran en un estado activado. Esta activación puede ser necesaria para que los neutrófilos puedan efectuar mejor sus funciones microbicidas en un ambiente que tiene una gran heterogeneidad de bacterias como lo es la cavidad oral.

Abreviaturas

μL	microlitros
μM	micro molar
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
^{32}P	fosforo-32, isótopo
^3H	Tritio, isótopo del hidrógeno
BPI	Proteína que aumenta la permeabilidad bacteriana
CG	Catepsina G
CGD	Enfermedad Granulomatosa Crónica
CTSC	Catepsina C
CXCL-	Quimiocina, ligando
CXCR-	Receptor quimiotáctico
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
FcR	Receptor del Fragmento constante de anticuerpos
fMLF	formil metionil-leucil-fenilalanina
FPR1	Receptor del péptido fMLF
GF	Libre de gérmenes
GM-CSF	Factor Estimulante de las colonias de Granulocitos/Monocitos
hCAP-18	Proteína antimicrobiana catiónica humana
HSCs	Células troncales hematopoyéticas
ICAM-	Molécula de adhesión intercelular
IL-	Interleucina
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
MMP	Metaloproteinasas de la Matriz (extracelular)
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotidamina y adenina
NE	Elastasa de neutrófilo
NETs	Trampas Extracelulares de Neutrófilo
NGAL	Gelatinasa de Neutrófilos Asociada a Lipocalina
NSPs	Serina Proteasas de Neutrófilos
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PCNA	Antígeno Nuclear de Células en Proliferación
PMA	Forbol-12-Miristato-13-Acetato
PR3	Proteinasa 3
Rgps	gingipaínas específicas de arginina
roGFP	Proteína fluorescente verde sensible a la reducción-oxidación
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SDF-1	Factor 1 derivado del estroma
SLPI	Inhibidor secretor de proteasa leucocitaria
SPF	Libre de patógenos específicos
TGF- β	Factor de crecimiento transformador beta
TLR	Receptor tipo Toll
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa

INTRODUCCIÓN

Los humanos, continuamente estamos expuestos a microorganismos como bacterias, hongos, parásitos y virus, a través del aire que inhalamos, lo que tocamos con nuestra piel y todo lo que ingerimos. Sin embargo, podemos mantener una vida saludable gracias a nuestro sistema inmunológico que ha evolucionado para protegernos de la amenaza de infección, provocada por la exposición constante a estos microorganismos extraños, en cada una de las zonas de entrada accesibles en nuestro cuerpo, como la cavidad oral [1]. El contacto con estos microorganismos no siempre es una amenaza para nuestra salud, pues existe una gran variedad de microorganismos que habitan en armonía dentro de nuestro cuerpo y conforman nuestra microbiota. Así, la interacción simbiótica entre nuestro cuerpo (el huésped) y la microbiota comensal ha demostrado ser beneficiosa para nuestra salud [1, 2]. Existe un delicado equilibrio entre el huésped y su microbiota altamente compleja para mantener la homeostasis y la salud [3]. La cavidad oral es un lugar de nuestro cuerpo que se encuentra colonizado por una microbiota cambiante [4]. La interacción de esta microbiota con el sistema inmunológico del huésped sigue siendo poco conocida a diferencia de los estudios realizados con el microbioma intestinal. Sin embargo, se sabe que existen mecanismos homeostáticos que mantienen la microbiota oral en equilibrio con el sistema inmunológico[5, 6].

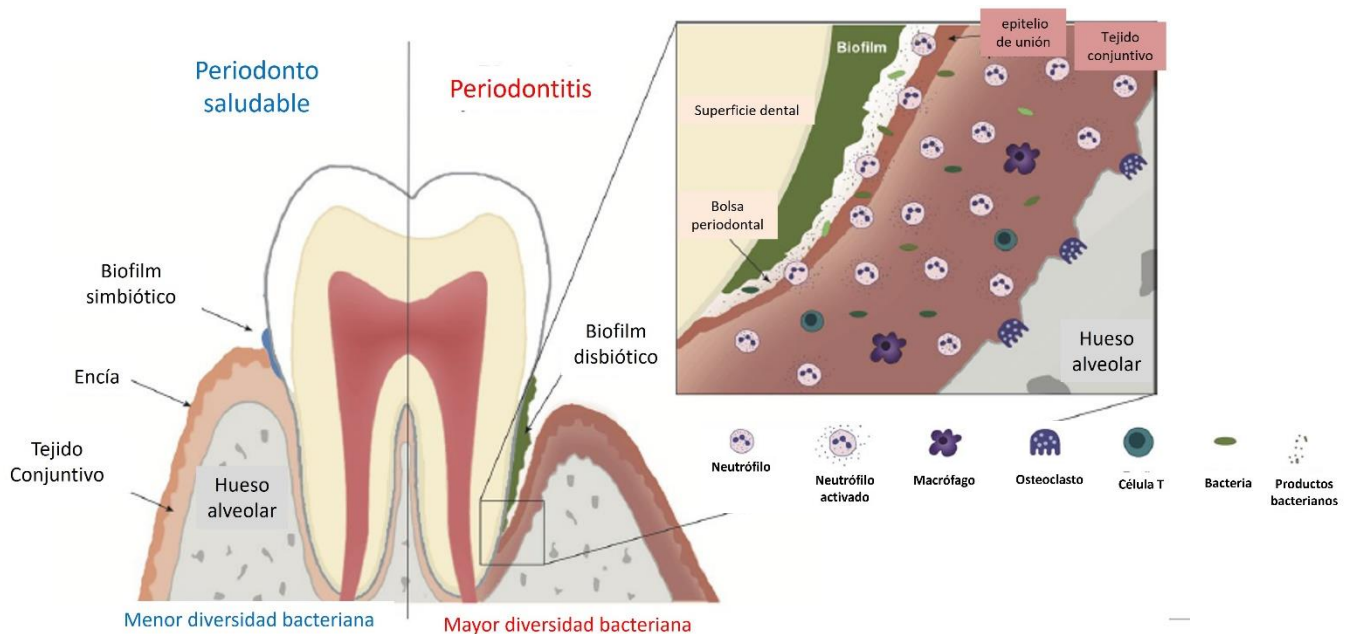


Imagen 1. Zonas anatómicas del periodonto relacionadas con la microbiota y las células del sistema inmunológico. Modificada de Uriarte, S. M., et al. (2016). Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence. *Immunological Reviews*. 7 <https://doi.org/10.1111/imr.12451>

Los neutrófilos son la principal célula del sistema inmunológico que se recluta en grandes cantidades a cavidad oral y es responsable de garantizar la salud del tejido periodontal [7]. El epitelio de unión, es un tejido especializado que rodea el diente, y genera un gradiente quimiotáctico de interleucina (IL)-8 debido a su contacto cercano con la biopelícula oral, lo que resulta en el reclutamiento constante de neutrófilos al surco gingival [6].

La presencia de neutrófilos en el surco gingival está asociada con la protección contra la enfermedad periodontal ya que se ha observado un aumento en la severidad de la periodontitis en enfermedades congénitas como la deficiencia de adhesión de leucocitos, el síndrome de Chediak-Higashi, el síndrome de Papillon-Lefèvre y la neutropenia crónica/cíclica. En todas estas enfermedades se compromete el reclutamiento de neutrófilos [8].

Las enfermedades inflamatorias orales, son la gingivitis y la periodontitis. En la gingivitis se genera una respuesta inflamatoria moderada. Si esta inflamación no se controla, la gingivitis puede evolucionar a periodontitis, que es la fase inflamatoria crónica de la enfermedad oral. En la periodontitis, los microorganismos patógenos muestran mecanismos que les permiten resistir el ataque por parte de los neutrófilos. Esto resulta en la acumulación de neutrófilos en el tejido periodontal. Los neutrófilos, al liberar su arsenal antimicrobiano (enzimas, ROS y NETs) causan daño tisular y pérdida ósea [9].

Los neutrófilos ejecutan distintos mecanismos microbicidas, que los ayudan a combatir un amplio espectro de bacterias, hongos y protozoos. Estos mecanismos incluyen fagocitosis, degranulación y trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) [10].

Uno de los mecanismos montado por los neutrófilos, como estrategia eficiente para la eliminación de la infección por bacterias anaerobias es el estallido oxidativo, sin embargo, algunos patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* son resistentes a la muerte oxidativa [11].

Además, los neutrófilos hiperactivos también pueden predisponer a desarrollar periodontitis, pues la respuesta aumentada de estos neutrófilos se caracteriza por la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), péptidos catiónicos y enzimas como las

metaloproteinasas de la matriz (MMP) que da como resultado un mayor daño tisular y posiciona al neutrófilo como un perpetrador de periodontitis [12, 13]. Por lo tanto, se debe mantener un estrecho equilibrio entre la función de los neutrófilos y el desafío bacteriano para garantizar la salud periodontal.

1. HOMEOSTÁSIS DE NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos se producen en la médula ósea a partir de células troncales, las cuales proliferan y se diferencian a neutrófilos maduros [14]. Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre humana y son indispensables para la defensa del organismo contra patógenos. Recientemente, los neutrófilos también han sido implicados en la regulación y supresión inmunitarias [15]. Los neutrófilos son células que viven solamente algunas horas en la circulación sanguínea, aunque reportes recientes sugieren que estas células tienen una vida media en circulación de días y no de horas [16]. Cuando los microorganismos invaden a un organismo pluricelular como los humanos, se induce una respuesta inflamatoria. En respuesta a la inflamación, los neutrófilos son reclutados desde la circulación hacia los tejidos donde se encuentran los microorganismos. Ya en el tejido afectado, los neutrófilos destruyen a los microorganismos mediante diferentes mecanismos microbicidas, incluyendo la fagocitosis, la degranulación y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés)[10]. La formación de NETs se conoce como NETosis, la cual es un mecanismo recientemente descubierto, que consiste en la expulsión del material genético en forma de fibras de cromatina para formar una red de NETs [17]. Las NETs contienen además proteínas con acción microbicida que provienen de los gránulos de los neutrófilos. Así proteínas como elastasa y mieloperoxidasa recubren las fibras de cromatina [18]. Los neutrófilos no sólo localizan y eliminan microorganismos, sino también regulan la inmunidad y la inflamación mediante la producción de quimiocinas y citocinas [19]. Sin embargo, estas sustancias también juegan un papel clave en la lesión tisular, al reclutar y activar a otras células como linfocitos y macrófagos [20]. Los neutrófilos no siempre actúan de manera beneficiosa. Debido a todas las sustancias microbicidas que contienen y a la capacidad de liberar citocinas, una respuesta no controlada de neutrófilos puede exacerbar la inflamación e incluso inducir enfermedades autoinmunes.

La homeostasis de neutrófilos está estrechamente regulada a diferentes niveles que actúan en coordinación. La homeostasis de neutrófilos se puede dividir en tres procesos: producción, tráfico y eliminación. La producción de los neutrófilos en la médula ósea, su liberación a la circulación, su transmigración a los tejidos periféricos y su eliminación [21].

1.1 Producción

Los neutrófilos son producidos en la médula ósea. La diferenciación granulocítica está regulada por la expresión coordinada de factores de transcripción mieloides claves para la diferenciación de granulocitos y macrófagos a partir de una célula progenitora en común. El proceso de diferenciación de los neutrófilos se lleva a cabo en la médula ósea. Durante este proceso se distinguen tres grupos celulares: células troncales, células mitóticas y células postmitóticas [22]. El grupo de células troncales esta constituido por una población de células pluripotenciales hematopoyéticas indiferenciadas (HSC). El grupo de las células mitóticas está conformado por células generadoras de granulocitos, los cuales proliferan y se diferencian. Finalmente, el grupo de células postmitóticas, lo conforman los neutrófilos maduros, completamente diferenciados que se mantienen en médula ósea como reserva y están disponibles para ser liberados al torrente sanguíneo [23, 24].

Estudios que utilizan células marcadas con ^{32}P o ^3H , han mostrado en humanos, que el tiempo de tránsito de neutrófilos es de 4-6 días [25]. Asimismo, la reserva de granulocitos en médula ósea de humanos se ha estimado en 6×10^{11} células. Dado esto, y suponiendo un retraso de 5 días entre el marcado del ADN de las células en la médula y su aparición en la sangre, el recambio diario de granulocitos a través de la sangre debería ser de 1.7×10^9 células/kg [26].

El principal regulador fisiológico de la granulopoyesis es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) cuyos efectos incluyen desde la producción o granulopoyesis hasta la liberación de neutrófilos desde la médula ósea [27]. Los neutrófilos diferenciados y listos para ser liberados se mantienen en la médula ósea, debido a la interacción del receptor de quimiocina 4 (CXCR-4) localizado en la superficie de los neutrófilos, con su ligando la quimiocina CXCL12 (también llamada factor 1 derivado del estroma SDF-1) que se produce también en la médula ósea. La liberación de los neutrófilos diferenciados es regulado por el G-CSF, ya que actúa interfiriendo la interacción de CXCR4 – CXCL12 [23]. También el que los neutrófilos sean reclutados de manera activa a los tejidos, es influido por acción de la interleucina 17 (IL-17).

La IL-17 también es producida por los neutrófilos, en los tejidos donde existe inflamación crónica, ejerciendo quimiotaxis sobre linfocitos T CD4+ productores de IL-17 (células Th17), lo que genera un aumento en el gradiente de IL-17 en circulación, estimulando así la granulopoyesis y en consecuencia la liberación de los neutrófilos a la circulación sanguínea [27, 28]. También los neutrófilos liberan CCL20 y CCL2, quimiocinas que son ligandos para los receptores CCR6 y CCR2, respectivamente, localizados en las células Th17. Por lo tanto, los neutrófilos atraen y mantienen a las células Th17 dentro de los tejidos con inflamación. La consecuencia es que las células Th17 secretan más IL-17 y así se reclutan más neutrófilos [29].

1.2 Tráfico

Una vez producidos, los neutrófilos son liberados de la médula ósea y circulan a través del torrente sanguíneo. A partir de la sangre, los neutrófilos pueden ser químicamente atraídos a los tejidos donde exista infección o inflamación. Al proceso de reclutamiento de neutrófilos a los tejidos, es llamado cascada de adhesión leucocitaria. Imagen 1 [30].

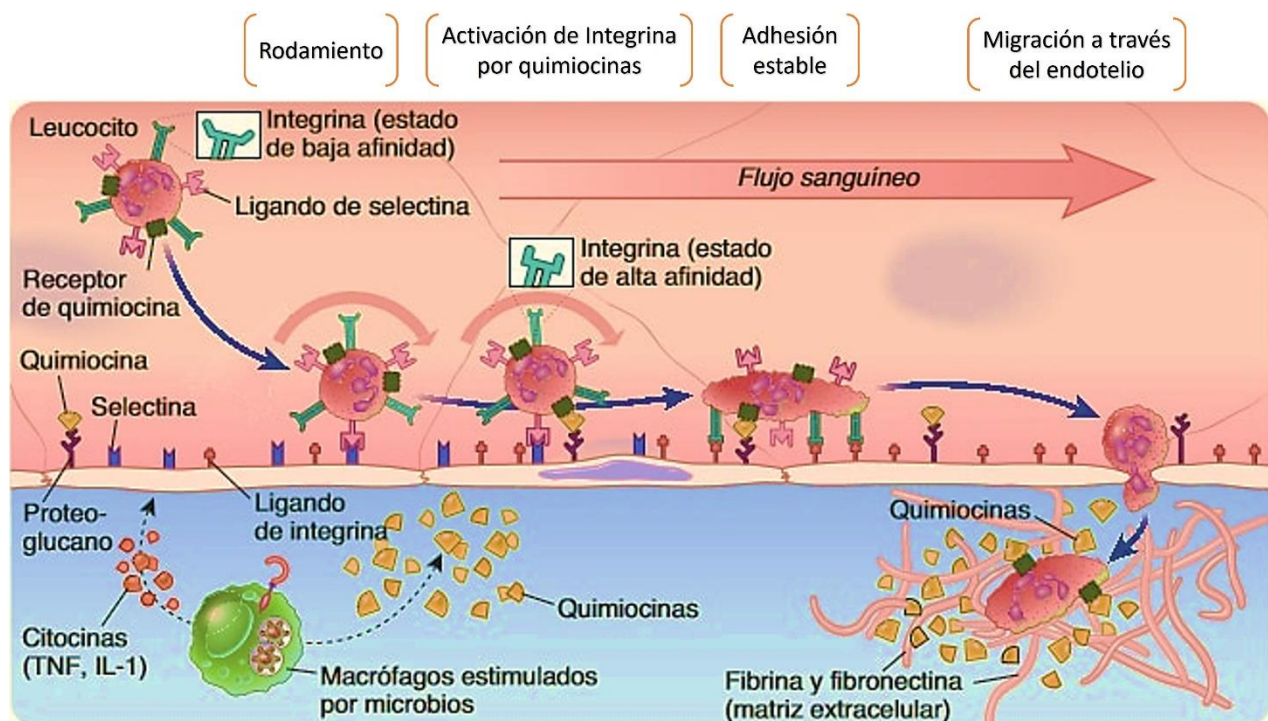


Imagen 2. Principales eventos en la adhesión y transmigración de neutrófilos. Modificada de Abbas, A. Inmunología celular y molecular 9ª ed. (2018). Las principales funciones ejercidas por la migración del leucocito desde la sangre a los tejidos. Elsevier Connect. <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/inmunologia-funciones-migracion-del-leucocito>

El proceso se inicia cuando las células endoteliales se activan y expresan sobre su superficie receptores de adhesión como las selectinas de tipo E y P. Cuando los neutrófilos reconocen estas selectinas, comienzan a rodar sobre el endotelio. El rodamiento depende de las interacciones aleatorias que ocurren entre las selectinas y los ligandos de glucoproteínas en los neutrófilos. Otro grupo de receptores de adhesión, son las integrinas, a las que también se unen los neutrófilos con gran afinidad, una vez que son activados por quimiocinas. La interacción de las selectinas y las integrinas con sus ligandos correspondientes induce un rodamiento lento por parte de los neutrófilos, que posteriormente es terminado por una adhesión completamente firme que los detiene. Finalmente, los neutrófilos atraviesan el endotelio y transmigran a los tejidos con infección o inflamación, gracias a las integrinas $\beta 2$, que regulan mayormente este proceso. Las integrinas son receptores heterodiméricos formados por una subunidad α (CD11) única y una subunidad β (CD18) común que interactúan con ligandos de adhesión como la ICAM-1 e ICAM-2 (molécula de adhesión intercelular-1 y -2) expresadas sobre las células endoteliales. Esta cascada de adhesión leucocitaria está regulada positivamente por citocinas y quimiocinas derivadas de tejidos. Las citocinas controlan la expresión de moléculas de adhesión endotelial y las quimiocinas inducen a las integrinas a cambiar la conformación a un estado de alta afinidad [20]. Cuando los neutrófilos llegan a los tejidos, continúan su trayectoria en favor de gradientes quimioatrayentes hasta llegar a los sitios donde exista infección o inflamación. Algunos quimioatrayentes para neutrófilos son componentes del sistema de complemento, como las anafilatoxinas C3a y C5a, citocinas producidas por el propio organismo, como la IL-8 y también componentes bacterianos, como el fMLF (formil metionil-leucil-fenilalanina). Recientemente, se descubrió que la cascada de adhesión leucocitaria también está regulada negativamente por inhibidores endógenos como Del-1 (locus-1 del desarrollo endotelial), el factor de diferenciación de crecimiento 15 y la pentraxina 3 [31].

1.3 Eliminación

Los neutrófilos se eliminan principalmente en los tejidos y posiblemente también en la médula ósea. En los tejidos, una vez que los neutrófilos han completado su deber antimicrobiano, sufren apoptosis. Los neutrófilos son eliminados, localmente por macrófagos y células dendríticas, que son fagocitos residentes de los tejidos. La fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos reprograma a los macrófagos para iniciar un mecanismo de respuesta antiinflamatoria, sintetizando TGF- β e IL-10, y disminuyendo la síntesis de IL-23 [32, 33]. La IL-23 es una citocina que estimula la producción de IL-17, por tanto, al disminuir los niveles de IL-23, los niveles de IL-17 también son reducidos, esto induce una menor producción de G-CSF y, en consecuencia, una menor producción de neutrófilos. Este proceso es un mecanismo de control que mantiene a los neutrófilos en niveles estables [29]. Los neutrófilos circulantes senescentes aumentan la expresión de CXCR4 y responden a CXCL12 volviendo a la médula ósea donde se reclutan para su eliminación. Estos [34]. El correcto equilibrio entre la producción, el tráfico y la eliminación de neutrófilos son aspectos clave para la resolución de la inflamación. La muerte de los neutrófilos está influenciada por las condiciones ambientales, incluida la hipoxia y la presencia de mediadores inflamatorios, como el GM-CSF y los LPS. La eliminación de los neutrófilos apoptóticos depende de las señales que estos expresan en su superficie. Estas señales permiten a los macrófagos reconocerlos y fagocitarlos [35]. Si no se eliminan estas células apoptóticas, se produce una necrosis secundaria y la liberación de productos que generan señales proinflamatorias. Los neutrófilos expresan moléculas que regulan su supervivencia, como la survivina, las cinasas dependientes de ciclina y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). La survivina se expresa mayormente en neutrófilos inmaduros que, en maduros, pero su expresión puede restablecerse en células maduras mediante señales inflamatorias, por ejemplo, GM-CSF o G-CSF [36]. Del mismo modo, las cinasas dependientes de ciclina funcionan como factores de supervivencia. Su inhibición induce la apoptosis dependiente de caspasas. El PCNA en neutrófilos se asocia con procaspasas en el citosol y se cree que previene su activación. Durante la apoptosis, el PCNA está dirigido a la

degradación proteosómica, que se correlaciona con un aumento en las actividades de caspasa-3 y caspasa-8 [21].

2. ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS

Una vez que los neutrófilos atraviesan el endotelio y llegan a los tejidos, se encuentran en un medio inflamatorio. En el espacio intersticial, el neutrófilo es atraído por gradientes quimiotácticos hacia los microorganismos invasores, siguiendo citocinas como la IL-8 o el tripéptido bacteriano fMLF. Estas sustancias quimioatrayentes se unen a sus respectivos receptores en los neutrófilos. Los receptores son moléculas acopladas a proteínas G, que inician, entre otras, una cascada de señalización conocida como la vía MAPK / ERK [37]. Las señales activan cambios en el citoesqueleto que conllevan a la migración de los neutrófilos [38]. Además, muchas moléculas quimioatrayentes ejercen un efecto de "cebado", esto es un estado de preactivación (priming, en inglés). Esta preactivación, mejora la respuesta del neutrófilo a otros estímulos. Un ejemplo es el fuerte efecto de cebado del LPS en la respuesta del neutrófilo al fMLF [39]. En este caso, la exposición al LPS induce el ensamblaje del complejo enzimático NADPH oxidasa, que genera radicales libres de oxígeno, también llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) [40]. Los LPS inducen la formación de la NADPH oxidasa, pero no su activación completa. La estimulación del neutrófilo con fMLF induce la activación completa de esta maquinaria enzimática, llevando a la producción de ROS, a través del proceso conocido como estallido oxidativo [41-43]. Al mismo tiempo, los receptores tipo Toll (TLR) reconocen una serie de compuestos derivados de microorganismos patógenos, denominados colectivamente como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [44]. Dentro de los PAMPs se incluyen a los LPS, reconocidos por TLR4; los lipopéptidos bacterianos, reconocidos por TLR2; la flagelina, reconocida por TLR5; y el ADN, reconocido por TLR9. En los neutrófilos, todos los TLR se expresan constitutivamente, excepto el TLR3 [45]. La estimulación de los diversos TLR contribuye a una mayor activación del neutrófilo; por ejemplo, la inducción del estallido oxidativo [41].

3. FUNCIONES MICROBICIDAS DE NEUTRÓFILOS

El conjunto de funciones básicas del neutrófilo activado está encaminado a eliminar a los microorganismos patógenos y no dañar al propio organismo. Para cumplir con su acción microbicida, los neutrófilos poseen una variedad de mecanismos antimicrobianos que varían considerablemente en sus métodos de acción y, por lo tanto, reflejan como los neutrófilos explotan cada una de las debilidades que los microorganismos patógenos pueden presentar durante el curso de la infección. El conocer estos mecanismos, su acción y su forma de activación es fundamental para comprender la función de los neutrófilos [21].

3.1 Gránulos y degranulación

Los neutrófilos transportan en su citoplasma una gran cantidad de enzimas dentro de un organelo de almacenamiento especializado: el gránulo. Los gránulos son indispensables para las funciones del neutrófilo y participan de manera activa casi todos los procesos inflamatorios. Los gránulos en los neutrófilos se clasifican en cuatro tipos primordiales: los gránulos azurofílicos, los gránulos específicos, los gránulos de gelatinasa y las vesículas secretoras [46]. Los gránulos azurofílicos, también conocidos como gránulos primarios son los más grandes y se denominan así porque pueden absorber el colorante azul básico A. Los gránulos azurofílicos contienen mieloperoxidasa (MPO), una enzima esencial en la formación de compuestos microbicidas [47]. Estos gránulos también contienen defensinas, lisozima, proteína bactericida/aumentadora de la permeabilidad (BPI) y proteinasas de serina como la elastasa de neutrófilos (NE), la proteinasa 3 (PR3) y la catepsina G (CG). Los gránulos específicos o secundarios son de menor tamaño que los primarios, se forman después que estos y se caracterizan por no contener MPO, pero sí la glucoproteína lactoferrina. Dentro de la gama de compuestos antimicrobianos que contienen estos gránulos se incluyen NGAL, hCAP-18 y lisozima [48]. Los gránulos de gelatinasa o terciarios, son los últimos en formarse durante las etapas de maduración de neutrófilos [14]. Los gránulos terciarios son aún más pequeños que los gránulos específicos, el contenido de enzimas antimicrobianas también es menor, pero funcionan como almacenamiento de una serie de metaloproteinasas como la gelatinasa y la leucolisina. Finalmente, las vesículas

secretoras, son consideradas dentro de la familia de gránulos de neutrófilos. A diferencia de los gránulos clásicos (azurofílicos/primarios, específicos/secundarios y de gelatinasa/terciarios) las vesículas secretoras no se originan a partir del complejo de Golgi, sino que se forman a través de endocitosis en las últimas etapas de maduración del neutrófilo. En consecuencia, su contenido es principalmente de proteínas derivadas del plasma, como la albúmina. También la membrana de estas vesículas funciona como reservorio de varias moléculas expresadas en la membrana, las cuáles ayudan de manera importante al neutrófilo durante el proceso de migración [49].

Durante el proceso de activación del neutrófilo, los gránulos migran desde el citosol para fusionarse con la membrana citoplasmática o bien, con la membrana del fagosoma, liberando su contenido en el entorno respectivo [50]. Las diferentes clases de gránulos demuestran una propensión variable a la movilización en respuesta a señales inflamatorias. Las vesículas secretoras y los gránulos de gelatinasa son los primeros en ser secretados, seguidos de los gránulos específicos. Los gránulos azurofílicos son los más difíciles de movilizar. Por ejemplo, la estimulación de neutrófilos con PMA induce la completa liberación de los gránulos de gelatinasa, una restringida liberación de gránulos específicos y una mínima exocitosis de gránulos azurofílicos. De manera diferente, el estimular neutrófilos con fMLF induce mayormente la liberación de vesículas secretoras y una liberación poco significativa de gránulos [48]. Debido a esta propensión a la movilización variable, cada subconjunto de gránulos se ha asociado tradicionalmente con una etapa particular de activación de neutrófilos. Después de que los neutrófilos entran en contacto con el endotelio, son estimulados por selectinas y quimioatrayentes que inducen la movilización de vesículas secretoras, cuyas membranas son ricas en moléculas importantes para la migración y para la subsecuente activación del neutrófilo, incluidas entre otras: las integrinas $\beta 2$, los receptores de complemento, de fMLF, y de anticuerpos $Fc\gamma RIII$ (CD16) [51]. La fusión de las vesículas secretoras con la membrana citoplasmática expone estos componentes al entorno externo. Esto da como resultado la transición a una adhesión firme, regulada por la interacción de la integrina $\beta 2$ con el endotelio. Conforme los neutrófilos avanzan por el endotelio, están expuestos a otras señales de activación que

inician la migración de gránulos de gelatinasa, liberando así metaloproteínas. La actividad de estas proteinasas puede ayudar a los neutrófilos a atravesar la membrana basal [52]. La activación completa del neutrófilo se produce en el tejido inflamado, provocando el inicio del estallido respiratorio y la migración de los gránulos específicos y azurofílicos. La fusión de estos gránulos se da principalmente con el fagosoma (ver sección sobre Fagocitosis), donde vierten su contenido enzimático y favorecen la función antimicrobiana de este compartimento. Estos gránulos también se pueden fusionar con la membrana citoplasmática, liberando sus componentes antimicrobianos en el tejido. El que los gránulos específicos se fusionen con la membrana citoplasmática o con el fagosoma es de gran relevancia para que el neutrófilo pueda llevar a cabo el estallido oxidativo, ya que un componente del complejo enzimático de la NADPH oxidasa, es el flavocitocromo b558 el cuál reside en la membrana de los gránulos específicos. Por tanto, la fusión de estos gránulos permite el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa, y con esto la producción ROS tanto en el fagosoma como en el exterior de la célula. Así la degranulación de los componentes enzimáticos de los gránulos primarios y secundarios de los neutrófilos, contribuye a que exista un medio antimicrobiano e inhóspito para patógenos, dentro del tejido inflamatorio [21].

Recientemente evidencia experimental sugiere que las proteínas granulares de neutrófilos, incluidas PR3 y azurocidina, pueden inducir el reclutamiento de monocitos. Además, las proteínas de los gránulos de neutrófilos pueden aumentar la eliminación de bacterias por los macrófagos al mejorar la fagocitosis. Esto podría ser ventajoso en situaciones en las que la concentración extracelular de proteínas granulares liberadas es insuficiente para ejercer efectos microbicidas. En tales casos, las proteínas granulares funcionarían en como factores de señalización y reclutamiento de células fagocíticas [53].

3.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Posterior a la activación, los neutrófilos producen ROS en un proceso llamado estallido oxidativo. Las ROS reaccionan rápida y eficientemente con otras moléculas, pudiendo modificar y dañar estructuras celulares. Por tanto, los neutrófilos utilizan esta propiedad de

las ROS para ejercer una acción microbicida. El complejo NADPH oxidasa se ensambla en las membranas tanto del fagosoma como citoplasmática y una vez activada actúa reduciendo químicamente al oxígeno molecular, generando así superóxido. Aunque el superóxido, no es un oxidante fuerte, dismuta de manera rápida y forma peróxido de hidrógeno. También el superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico, que se produce en altas concentraciones en los tejidos inflamados, para formar peroxinitrito, considerado un oxidante fuerte [54]. Tras la degranulación de contenidos azurofílicos dentro del fagosoma, la enzima MPO cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con iones cloruro para producir ácido hipocloroso, un potente agente microbicida mucho más reactivo que el superóxido. Evidencia directa de la importancia de las ROS para la actividad microbicida de los neutrófilos proviene de estudios con pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD), quienes son muy susceptibles a diversas infecciones. Los neutrófilos de estos pacientes no pueden producir ROS y por tanto eliminan microorganismos de manera deficiente [55].

3.3 Fagocitosis

Uno de los mecanismos principales de los neutrófilos para eliminar a los microorganismos patógenos es tal vez la fagocitosis. En este proceso activo, el neutrófilo internaliza partículas de más de 5 μm de diámetro en una vacuola, el fagosoma, todo esto mediado por receptores [56, 57]. La interacción entre el neutrófilo y la partícula, que puede ser algún microorganismo, ocurre de manera directa o indirecta. La interacción directa se da a través del reconocimiento de PAMPs por receptores de reconocimiento de estos PAMPs, los PRR en la membrana del neutrófilo. La interacción indirecta se da a través del reconocimiento de opsoninas [10]. Las principales opsoninas son los anticuerpos y el complemento. Los pasos iniciales de la fagocitosis varían según el receptor fagocítico involucrado. Sin embargo, independientemente del receptor fagocítico empleado, el resultado es la internalización de la partícula dentro de un fagosoma. El mecanismo de fagocitosis mejor estudiado es el mediado por los receptores de anticuerpos, denominados receptores Fc [58, 59]. Cuando los receptores Fc reconocen a los anticuerpos que recubren (opsonizan) a un microorganismo, la membrana del neutrófilo se extiende formando pseudópodos, los cuales

cubren a la partícula. Posteriormente, la membrana se fusiona en el extremo distal formando una vacuola nueva que contiene al microorganismo. Esta vacuola nueva se denomina fagosoma y es llevada al interior de la célula. El fagosoma recién formado es relativamente inofensivo para los microorganismos, ya que su membrana es similar a la membrana citoplasmática y su contenido es similar al medio extracelular. Para convertirse en un organelo microbicida, el fagosoma sufre una serie de cambios tanto en la composición bioquímica de su membrana como de su contenido. A la serie de cambios se le conoce como maduración del fagosoma [60]. La maduración del fagosoma involucra interacciones sucesivas de fusión y fisión entre el fagosoma en formación y endosomas nuevos, luego endosomas maduros y finalmente lisosomas. Durante la maduración del fagosoma, existe suministro de moléculas antimicrobianas al interior del fagosoma y el remodelamiento de la composición de la membrana. El pH del fagolisosoma es ácido y contiene muchas enzimas que pueden degradar a los microorganismos. Además, la NADPH oxidasa se ensambla en la membrana del fagosoma, permitiendo la producción de ROS. La conjunción de estos mecanismos crea un medio tóxico para la gran mayoría de microorganismos patógenos. Sin embargo, no todos los microorganismos patógenos sucumben al ambiente hostil del fagolisosoma. De hecho, algunos microorganismos patógenos han desarrollado estrategias para sobrevivir dentro de los neutrófilos [61]. Por ejemplo, la cápsula de polisacárido expresada por *Staphylococcus aureus* confiere propiedades antifagocíticas. *Helicobacter pylori* puede interrumpir el direccionamiento de la NADPH oxidasa al fagosoma para que los aniones superóxido se acumulen extracelularmente en lugar de en el fagosoma. *Francisella tularensis* previene la activación del estallido oxidativo e inhibe la producción de ROS como respuesta de diferentes estímulos. Finalmente, otros microorganismos patógenos, como *Salmonella typhimurium* y *Streptococcus pyogenes*, pueden bloquear eficazmente la fusión de gránulos con el fagosoma. La importancia de la fagocitosis como mecanismo de defensa, en la inmunidad innata, radica en que existe una variedad de mecanismos desarrollados por los microorganismos patógenos intracelulares para resistir su muerte y permitir la supervivencia dentro del fagosoma [61].

3.4 Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Los neutrófilos también pueden sufrir NETosis para controlar a los microorganismos. La NETosis es una forma de muerte celular activa que conduce a la liberación de cromatina descondensada en el espacio extracelular [18]. Las estructuras fibrosas de cromatina, denominadas NETs contienen histonas, así como enzimas antimicrobianas que derivadas de los gránulos del neutrófilo [62]. Las NETs atrapan a diversos microorganismos previniendo su diseminación y también pueden matar a los microorganismos al exponerlos a altas concentraciones de moléculas microbicidas [63]. El mecanismo de formación de NETs no se conoce completamente, pero se sabe que involucra la producción de ROS [64, 65], a través de la vía de señal Raf-MEK-ERK [66]. Así mismo, durante la NETosis, la NE es movilizada desde los gránulos hasta el núcleo, en donde degrada a las histonas, produciendo así la descondensación de la cromatina [67]. La citrulinación de histonas también contribuye a la formación de NETs, al favoreciendo que la cromatina se descondense [68]. Algunos microorganismos han desarrollado mecanismos contra las NETs. Por ejemplo, ciertas bacterias que expresan DNasas como factores de virulencia se diseminan de manera más eficiente en el organismo. Esto resalta la importancia de las NETs para contener infecciones [69]. Las NETs son especialmente importantes durante las infecciones causadas por patógenos grandes que no puedan ser fagocitados fácilmente [70]. Sin embargo, las NETs también pueden tener efectos perjudiciales en el organismo. Debido a que las NETs exponen moléculas propias de forma extracelular, las NETs pueden ser inductoras de autoinmunidad. De hecho, las NETs se han implicado en enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, caracterizado por la producción de autoanticuerpos, principalmente contra los componentes del núcleo de los neutrófilos [71]. Las NETs también se han asociado a otras condiciones patológicas. Por ejemplo, NETs inducidas por plaquetas, durante la sepsis, están asociadas con hepatotoxicidad debido al daño tisular [72]. Las NETs también se pueden unir a las plaquetas aumentando la posibilidad de que se formen coágulos sanguíneos llevando a trombosis venosa profunda [73]. Las NETs también se han observado en fluidos del tracto respiratorio de individuos con fibrosis quística, donde pueden aumentar la viscosidad del esputo y disminuir la función pulmonar [74].

Las NET tienen la propiedad de atrapar a los microorganismos impidiendo su propagación y de dañarlos directamente por la acción antimicrobiana de las proteínas de los gránulos. Sin embargo, una cantidad excesiva de NET puede ser perjudicial para la salud. En el caso de la cavidad oral, parece que la activación descontrolada de neutrófilos lleva a la excesiva formación de NET y esto genera un estado inflamatorio más grave (ver más adelante).

4. NEUTRÓFILOS EN CAVIDAD ORAL

La cavidad oral es un lugar anatómico con características especiales, ya que se encuentra colonizada por una microbiota que cambia constantemente. Lo cuál podría ser causa de continuos ataques a los tejidos circundantes y a su vez una constante respuesta por parte del sistema inmunológico. Sin embargo, existen mecanismos que permiten mantener la homeostasis entre la interacción del sistema inmunológico con la microbiota oral. En particular, los neutrófilos son células del sistema inmunológico innato que llegan hasta la cavidad oral para mantener a la microbiota en equilibrio [29]. Los neutrófilos son reclutados activamente desde el torrente sanguíneo hacia el surco gingival por un gradiente de interleucina IL-8, secretada por el epitelio de unión constantemente. Las principales células responsables de garantizar la salud periodontal, son los neutrófilos, manteniendo la biopelícula oral bajo control [6]. Para que el equilibrio entre los neutrófilos y las bacterias exista, debe haber condiciones de higiene oral. Por el contrario, en condiciones de mala higiene se generará una respuesta inflamatoria, que en un principio puede ser moderada, a esta condición se le llama gingivitis. Si esta inflamación no se controla, la gingivitis puede conducir a periodontitis, una enfermedad inflamatoria crónica. En esta condición, las bacterias patógenas se han dividido exponencialmente, por lo que no pueden ser eliminadas o controladas por los neutrófilos. En respuesta, más neutrófilos son reclutados hacia el tejido periodontal. La acumulación de neutrófilos, en lugar de proteger, favorece el daño del tejido periodontal e incluso la pérdida ósea. Por lo tanto, se debe mantener un equilibrio estrecho entre la función de neutrófilos y el ataque de estos leucocitos hacia los microorganismos orales para garantizar la salud periodontal.

4.1 Componentes y características del periodonto

El periodonto (*peri*: alrededor, *odontos*: dientes), es un conjunto de cuatro tejidos cuya función principal es brindar soporte y protección a los dientes, además de mantener íntegra la superficie de la mucosa oral. El periodonto se encuentra formado por: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar. El periodonto en ocasiones también es llamado “aparato de inserción” o “tejidos de soporte de los dientes”. El periodonto es una unidad de desarrollo, anatomofuncional que experimenta cambios conforme la edad y las alteraciones en el ambiente oral [75]. Dentro del periodonto, los neutrófilos se encuentran principalmente en el epitelio de unión y entre el fluido crevicular, donde se ha descrito que los neutrófilos pueden formar una barrera protectora frente a la biopelícula oral [76]. Además, en el líquido crevicular se encuentra un alto contenido de inmunoglobulinas, predominantemente IgG, y del componente 3 del complemento [77].

4.2 Neutrófilos y salud oral

Los neutrófilos llegan a la cavidad a través del epitelio de unión hacia el surco gingival. Este tránsito es favorecido por la interacción simbiótica con la microbiota oral endógena. Los estudios en animales con ratones libres de gérmenes (GF) demuestran que los neutrófilos patrullan el epitelio de unión. Por tanto, si la colonización con bacterias comensales aumenta significativamente también lo hará la cantidad de neutrófilos reclutados a la cavidad oral [3]. La migración de neutrófilos a esta área se ve facilitada por la alta porosidad del epitelio de unión y por el gradiente quimiotáctico de IL-8 generado localmente, el cual guía a los neutrófilos del torrente sanguíneo hacia el fluido crevicular. Además, la microbiota oral local induce la producción de IL-1 β , que puede estimular al sistema inmunológico y generar un estado de inflamación leve que está relacionado con el desarrollo de la capacidad inmunológica [78, 79]. Es así como se ha establecido el papel protector de los neutrófilos en la preservación de la salud oral. Pues se ha observado que los bajos números de neutrófilos orales, así como la deficiencia en las respuestas funcionales de estas células se asocian con la manifestación clínica de la enfermedad periodontal [80]. Los neutrófilos mantienen a la microbiota oral en equilibrio utilizando sus

mecanismos antimicrobianos, los cuales se ha descrito anteriormente. [10, 56][81][82].[83, 84]. [85]. [86]. [87, 88]. Además de los neutrófilos, el epitelio de unión que es un tejido especializado participa en el control de la microbiota oral, liberando péptidos antimicrobianos, como las β -defensinas y la LL-37. Estos péptidos ayudan a mantener una comunidad bacteriana menos diversa, lo que se asocia con un periodonto sano [78].

4.3 Interacción de neutrófilos con bacterias orales simbióticas

La microbiota comensal (simbiótica) oral también contribuye al estado estable de la producción de neutrófilos ya que la interacción que tienen los neutrófilos con los metabolitos o subproductos generados por la microbiota local, como ácidos grasos de cadena corta, son importantes para mantener la inmunidad sistémica y tisular[89]. Además, la microbiota contribuye al fenotipo activo de neutrófilos en circulación y participa en su eliminación [90]. Sin embargo, la microbiota comensal oral no tiene impacto en la estructura del tejido gingival, pues estudios que comparan ratones GF y ratones libres de patógenos específicos (SPF) no revelan diferencia estructural en la ausencia de microorganismos[3] Esto a diferencia del papel que tiene la microbiota comensal intestinal en la estructura del intestino [91].

El reclutamiento de neutrófilos a la cavidad oral es mediado no sólo por IL-8, sino también por otras quimiocinas. El receptor quimiotáctico CXCR2, que es el receptor para IL-8, facilita el reclutamiento de neutrófilos en el tejido periodontal. Esto se demostró en ratones *knockout* para el receptor CXCR2. En estos ratones, los neutrófilos están ausentes en el epitelio de unión, pero están presentes en los vasos sanguíneos. Además, se encontró que las quimiocinas CXCL1 y CXCL2, que también son ligandos del receptor CXCR2, se expresan en el epitelio de unión de ratones GF. La presencia de bacterias comensales en cavidad oral, favorece el reclutamiento de neutrófilos al tejido periodontal, al estimular selectivamente la expresión de la potente quimiocina de neutrófilos CXCL2 [3].

Se han comparado los niveles de expresión de CXCL2 y la ubicación de neutrófilos en diferentes áreas del epitelio de unión a través del diente, entre ratones GF, SPF y GF que fueron inoculados con bacterias orales comensales individuales, como por ejemplo

Streptococcus sp. o *Lactobacillus sp.* [92]. En el periodonto de los ratones SPF y los ratones GF inoculados con bacterias, los neutrófilos muestran un patrón de localización similar. Este patrón es diferente al patrón observado en ratones GF. Además, existe una correlación positiva entre la ubicación de neutrófilos y los niveles de expresión de CXCL2 en el epitelio de unión de animales colonizados por bacterias. Esto significa que en presencia de la microbiota comensal, la expresión de la quimiocina CXCL2 aumenta en la región interdental del tejido periodontal. En consecuencia, el número de neutrófilos también aumenta en esta parte del tejido periodontal [92]. Esto significa que la microbiota comensal modula la respuesta inmunológica innata, a través de reclutar neutrófilos, para mantener la homeostasis en la cavidad oral.

4.4 Enfermedad periodontal

Se estima que aproximadamente el 46% de la población adulta en los Estados Unidos que tienen 30 años o más sufren de periodontitis. Entre estos individuos, los hispanos muestran una prevalencia más alta que la de los individuos no hispanos [93]. La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica compleja del periodonto que de no resolverse conduce a la reabsorción ósea alrededor de la raíz del diente, con la consiguiente pérdida del diente [94]. El tratamiento para esta enfermedad inflamatoria crónica consiste en el raspado y alisado de la raíz del diente, para eliminar la biopelícula formada en esta zona, comúnmente llamada bolsa periodontal (espacio patológico entre la raíz del diente y el ligamento periodontal), además de la administración de antibióticos de amplio espectro e incluso cirugía de injerto óseo, en casos graves. Desafortunadamente, estos tratamientos han mostrado ser sólo una solución temporal para controlar y prevenir la progresión de la enfermedad, ya que, en la mayoría de los casos, la destrucción masiva del periodonto continua hasta llegar a la pérdida ósea. Esto significa que primero se debería reestablecer el equilibrio entre la microbiota y la respuesta del sistema inmunológico, incluidos los neutrófilos, para lograr la recuperación de la salud oral. Ya que la periodontitis también conlleva un mayor riesgo de afecciones sistémicas graves como la aterosclerosis, la diabetes y la artritis reumatoide. Apparentemente, el estado inflamatorio de la boca puede extenderse a otras partes del cuerpo y así afectar otros órganos.

4.5 Interacción de neutrófilos con bacterias orales disbióticas

Una microbiota bacteriana diversa y compleja es parte de la cavidad oral saludable. Las bacterias comensales colonizan distintos sitios orales, incluyendo el epitelio bucal, el vestíbulo anterior maxilar, el dorso y la superficie lateral de la lengua, el paladar duro y blando, las amígdalas, y las superficies de los dientes. Aunque la composición de la microbiota oral es muy diversa, se han encontrado importantes diferencias entre la microbiota de individuos sanos y la de individuos con enfermedad periodontal. El paradigma inicial de la periodontitis, establecido hace más de 20 años, contempla la idea de que la enfermedad no se origina por un solo microorganismo patógeno sino por un cambio en la comunidad microbiana oral, predominantemente aerobia Gram-positiva hacia una comunidad anaeróbica Gram-negativa [9]. El cambio de la composición de la microbiota se conoce como disbiosis. A partir de estudios de biopelículas bacterianas orales en diferentes etapas de la enfermedad periodontal, se ha identificado a un grupo de bacterias que se asocian fuertemente con la severidad de la periodontitis [95]. Este grupo de bacterias incluye a la tríada de bacterias conocidas como periodontopatógenas: *Porphyromona gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* [95, 96]. Recientemente, otras bacterias también se han asociado directamente con la periodontitis. Una de estas bacterias es *Filifactor alocis* [97]. En la disbiosis, las especies bacterianas asociadas con salud no desaparecen sino que se encuentran en números más bajos [97]. De aquí se deriva entonces que la periodontitis, se origina por la compleja asociación e interacción de una comunidad polimicrobiana diferente a la microbiota comensal [9]. Por ejemplo, la bacteria Gram positiva *F. alocis* está presente en grandes cantidades en los sitios de la enfermedad periodontal mientras que la bacteria Gram negativa *Veillonella sp.* se asocia a sitios periodontales sanos y se clasifica como una especie bacteriana beneficiosa. Más aún, algunas bacterias pueden pasar de ser benéficas a patógenas en ciertas circunstancias. La bacteria oral Gram negativa *Fusobacterium nucleatum* actúa como un importante patógeno “accesorio” para que exista un cambio en la microbiota oral y pase de ser simbiótica a disbiótica [98]. Según la evidencia actual, el desarrollo de periodontitis se

asocia con un cambio en la microbiota oral simbiótica en una comunidad polimicrobiana disbiótica [99].

Entonces en un tejido gingival sano, la comunidad bacteriana simbiótica local está en equilibrio con un reclutamiento de neutrófilos constante. Los neutrófilos controlan la infección sin causar inflamación ni daño colateral al huésped. La progresión de la salud a la periodontitis ahora se explica como la transición de una comunidad microbiana simbiótica que, debido a varios factores de riesgo, como fumar, cambios en la dieta, un huésped inmunocomprometido, lesión en el tejido o la colonización de la cavidad oral por bacterias patógenas como *P. gingivalis*, puede modificar el ecosistema oral originando una comunidad polimicrobiana disbiótica. Como resultado, la respuesta del huésped hacia el ataque microbiano disbiótico altamente diverso es más robusta y desregulada, pasando de una respuesta inmune controlada / estable a una respuesta inflamatoria crónica no resuelta [100].

4.6 Neutrófilos hiperactivos

Dado que los neutrófilos están equipados con un arsenal letal de compuestos antimicrobianos, su respuesta para controlar la infección está finamente regulada para disminuir el daño colateral al tejido del huésped. Por lo tanto, los neutrófilos pueden ajustar el grado de respuesta que montan en una situación peligrosa dada. El nivel de activación celular es el resultado de un rango de estímulos que regulan el grado de activación de la célula, en lugar de un mecanismo de encendido / apagado. El mecanismo de cebado (priming, en inglés) es un paso reversible que modula la respuesta gradual de los neutrófilos ante un estímulo [101]. El cebado de neutrófilos se entiende como la respuesta funcional mejorada de la célula a un estímulo por exposición previa de la célula a otro estímulo (un agente cebador) el cual por sí solo no induce una fuerte respuesta celular [101, 102]. Los agentes de cebado pueden ser derivados del huésped, como diferentes citocinas o quimiocinas, como TNF α , IL-1 β , IFN α , IL-8 y GM-CSF o compuestos derivados de bacterias como lipopolisacárido (LPS) [103]. La regulación del cebado es clave en la respuesta de defensa del huésped, ya que prepara a los neutrófilos para montar un nivel apropiado de

respuesta cuando se encuentra con un estímulo particular. La exposición de neutrófilos a agentes de cebado mejora su respuestas de fagocitosis, estallido respiratorio y degranulación.

Varios estudios han demostrado que los neutrófilos circulantes aislados de pacientes diagnosticados con neumonía adquirida en la comunidad, o que sufrieron un trauma, o una enfermedad inflamatoria crónica como la artritis reumatoide tienen un fenotipo cebado y pueden aumentar la respuesta al estallido respiratorio al exponerse a un segundo estímulo [79]. De forma similar, los pacientes con periodontitis parecen tener neutrófilos orales con un fenotipo activado. En un estudio con 13 pacientes con periodontitis refractaria (esto es que no responden a los tratamientos), los neutrófilos orales fueron aislados y estimulados con el ester de forbol PMA. Los neutrófilos mostraron una respuesta aumentada en la producción de ROS [104]. Interesantemente, los pacientes con neutrófilos de alta respuesta también presentaban una pérdida ósea grave. En este estudio también se encontró que el índice de placa bacteriana y la edad no parecen influir sobre la respuesta de los neutrófilos [104].

Además, los neutrófilos orales de los pacientes con periodontitis crónica también presentan un fenotipo activado, según la expresión en su membrana externa de ciertas moléculas como CD11b, CD63, CD66b [105]. Estas moléculas se encuentran sobre la membrana de los gránulos de los neutrófilos y por tanto un aumento en su expresión en la membrana externa significa que las células están experimentando degranulación. Además, el aumento de la expresión sobre la superficie de CD63, un marcador de gránulos azurófilos, que se observa en neutrófilos orales, pero no en neutrófilos de sangre periférica, de pacientes con periodontitis crónica destaca la magnitud de la activación de los neutrófilos en la boca. Esta hiperactivación de los neutrófilos los lleva a liberar todo su arsenal microbiciida de forma constante en sitios donde no es necesario. Por tanto, los neutrófilos al liberar las sustancias microbiciidas inducen daño tisular en sitios de inflamación crónica como la que ocurre en la periodontitis.

La presencia de neutrófilos hiperreactivos en la cavidad oral de sujetos con periodontitis podría explicar el daño grave que se observa en los tejidos del periodonto en pacientes con esta enfermedad [79].

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad periodontal es una de las dos principales enfermedades orales. Después de la caries, la enfermedad periodontal es un importante problema de salud pública a nivel mundial [106]. Aunque las bacterias son esenciales para el inicio de la periodontitis, la cantidad de biopelícula y de especies bacterianas, no necesariamente se relacionan con la severidad de la enfermedad. Además, existen microorganismos con la capacidad de evadir la respuesta inmunológica innata, propiciando el fallo de los mecanismos microbicidas por parte de los neutrófilos [79]. Si los neutrófilos no pueden controlar o eliminar a los microorganismos patógenos, más neutrófilos serán reclutados a cavidad oral y éstos al tener un estado hiperactivo contribuirán a perpetuar el proceso inflamatorio, que lejos de proteger al periodonto favorecerán el daño del tejido y la consecutiva destrucción del hueso [10, 13]. Por tanto, el comprender el estado funcional de los neutrófilos dentro de cavidad oral es esencial para aumentar nuestro conocimiento del proceso de la enfermedad periodontal.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los neutrófilos de cavidad oral, de personas con o sin inflamación gingival, llevan a cabo de la misma forma sus funciones microbidas producción de ROS, formación de NETs y fagocitosis que los neutrófilos de circulación sanguínea?

7. HIPÓTESIS

Los neutrófilos de cavidad oral presentan un fenotipo hiperactivo en individuos con inflamación gingival, contrario a los neutrófilos de cavidad oral de individuos sin inflamación gingival y a los neutrófilos de circulación periférica.

8. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las funciones microbidas de los neutrófilos de cavidad oral: producción de ROS, NETs y fagocitosis, mediante la estimulación de estos con PMA, y compararlos contra los neutrófilos de circulación sanguínea para identificar sus diferencias.

9. OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar neutrófilos a partir de enjuagues orales y de sangre periférica, de personas con y sin inflamación gingival.
- Evaluar la producción de ROS de los neutrófilos orales sanguíneos, de personas con y sin inflamación gingival.
- Evaluar la formación de NET por neutrófilos orales y sanguíneos, de personas con y sin inflamación gingival.
- Evaluar la fagocitosis por neutrófilos orales y sanguíneos, con y sin inflamación gingival.

10. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Los criterios de inclusión y exclusión considerados para la delimitación de la población fueron los siguientes:

- Sexo: indistinto
- edad: mayor de 15 años, o que presentara dentición permanente.
- Que los donantes no presentaran antecedentes heredofamiliares, como enfermedades sistémicas o crónico degenerativas.
- Que los donantes no presentaran al momento de la toma de muestra, ningun antecedente patológico personal, como cuadros gripales o cualquier otro tipo de infección de vías respiratorias.
- Que los donantes no presenten ningun tipo de hábito nocivo, como el consumo de tabaco o alcohol.
- Que los donantes considerados como sanos presenten buena higiene oral (sin manifestaciones de inflamación gingival, incluido el sangrado gingival, ni presencia de placa dentobacteriana).

11. MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra de estudio fue de un total de 10 donantes; 5 mujeres y 5 hombres de entre 16 y 54 años. Sin antecedentes heredofamiliares, ni antecedentes patológicos personales, ni de hábitos nocivos.

11.1 Obtención de neutrófilos

Los **neutrófilos orales** se obtuvieron a partir de 5 enjuagues de cavidad oral, por donante. La muestra fue de un total de 10 donadores, 5 mujeres y 5 hombres, de entre 16 y 55 años. Cada enjuague se realizó con 10 ml de solución de NaCl al 0.9% durante 30 segundos. Un intervalo de 3 minutos se dejó entre cada enjuague. Los cinco enjuagues (50 ml) se reunieron en un solo tubo y se filtraron secuencialmente a través de filtros con poros de 100 μm , y 40 μm (Falcon 352360 – 352340), para eliminar las células epiteliales. El filtrado se centrifugó a 1400 rpm, durante 4 minutos a 4 °C en una centrífuga eppendorf 5702 R 5703000322. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de PBS.

Los **neutrófilos sanguíneos** se obtuvieron a partir de 10 ml de sangre periférica, siguiendo el protocolo ya bien establecido de centrifugación en un gradiente de densidad [108]. Brevemente, la sangre obtenida por punción venosa de donadores sanos se coloca en un tubo con heparina y dextran al 6%. Después de 45 minutos, los eritrocitos precipitan por acción del dextran y el plasma que contiene a los leucocitos se coloca sobre un colchón de Ficoll-Paque. El tubo se centrifugó a 1600 rpm durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Sorvall RT6000D. En el fondo del tubo aparecen los neutrófilos puros.

Los neutrófilos se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron finalmente en 5 ml de PBS, conservándolos en frío hasta su uso.

El forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) es un ester de forbol, cuyo blanco molecular es la proteína quinasa C (PKC); ya que funciona como un potente activador de esta proteína, incluidas las isoformas del grupo A y del grupo B, activándolas a través de la unión al dominio C1. El PMA también puede activar ciertas vías de quinasa de proteínas activadas por mitógenos (MAP) a través de PKC.

11.2 Producción de ROS

La formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evalúa mediante la detección de la oxidación de dihidroetidio. Este compuesto muestra una fluorescencia azul en el citosol hasta que se oxida, dando entonces una fluorescencia roja brillante. Los neutrófilos se incubaron con 15 μ M dihidroetidio durante 30 minutos a 37 °C en la oscuridad. Después de un lavado con PBS, los neutrófilos se estimularon con 20 nM del ester de forbol (PMA) y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en un incubador con 5% de CO₂ (Fernandes, Gonçalves, & Laurindo, 2017). Finalmente, las células se fijaron añadiendo el mismo volumen de 2% paraformaldehído. Después de 30 minutos los neutrófilos se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia modelo IX-70, marca Olympus (Center Valley, PA, USA).

11.3 Formación de NETs

La formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs), se determina después de estimular a los neutrófilos con esteres de forbol (PMA) a concentración final de 20 nM según el protocolo previamente publicado [109]. Brevemente, los neutrófilos estimulados con PMA se incubaron durante 4 horas a 37° C en un incubador con 5% de CO₂. Finalmente, las células se visualizaron añadiendo 500 nM del colorante fluorescente específico para DNA Sytox Green, usando un microscopio invertido de fluorescencia modelo IX-70, marca Olympus (Center Valley, PA, USA).

11.4 Oponización de eritrocitos

La sangre de borrego se obtuvo de Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los eritrocitos se lavan tres veces con disolución de Alsever en frío y se resuspenden en PBS. Después se añadieron 50 μ l de suero de conejo con anticuerpos contra eritrocitos de carnero. La mezcla se incubó a 37 °C durante 60 minutos y finalmente los eritrocitos se lavaron tres veces con PBS. Los eritrocitos oponizados se guardan a 4 °C hasta su uso.

11.5 Fagocitosis en fase líquida

La fagocitosis se evalúa utilizando eritrocitos de carnero opsonizados con anticuerpos. Los neutrófilos se incuban con los eritrocitos en baño maría a 37 °C, durante 30 min. Los eritrocitos no fagocitados se eliminan con un choque hipotónico. Los neutrófilos se fijan a un portaobjetos de vidrio realizando un frotis. Después las células se tiñeron con hematoxilina y eosina. Finalmente, las células se observan en un microscopio para determinar el índice fagocítico, que se define como el número de eritrocitos fagocitados por cada 100 neutrófilos.

11.6 Análisis estadístico

Se utilizaron pruebas de t de Student para muestras independientes para comparar los promedios de PBS y PMA por grupo de tratamiento (sano y enfermo), con un nivel de significancia de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa Stata 15. Para determinar si existen diferencias significativas entre los sanos y enfermos, en ROS y NETS sin estímulo (PBS) y con estímulo (PMA).

12. RESULTADOS

En este trabajo se compararon las funciones microbidas de los neutrófilos provenientes de sangre y de boca de individuos sin inflamación gingival (denominados individuos sanos) y las funciones microbidas de los neutrófilos provenientes de individuos con inflamación gingival (gingivitis).

Purificación de neutrófilos

Los neutrófilos fueron purificados de sangre y de la cavidad oral respectivamente. A partir de 10 ml sangre de 6 individuos sanos, se purificaron en promedio 3.8×10^6 SD 0.2 neutrófilos. Similarmente, a partir de la sangre de 4 personas con gingivitis, se purificaron en promedio 4.7×10^6 SD 0.2 neutrófilos. Esto significa que, a pesar de la diferencia de números, los valores se encuentran dentro de los normales, para individuos adultos. Por otro lado, los neutrófilos purificados a partir de 50 ml de enjuagues bucales mostraron una morfología típica con su núcleo lobulado y múltiples gránulos (Figura 1). Sin embargo, el número de neutrófilos purificados a partir de enjuagues bucales de 6 individuos sanos fue en promedio de 1.8×10^6 SD 0.2, mientras que el número neutrófilos purificados de enjuagues bucales de 4 individuos con gingivitis fueron 9×10^6 SD 0.8. Esto significa que 5 veces más neutrófilos llegaron a la cavidad oral de individuos que presentaron inflamación gingival, en comparación con quienes no presentaron inflamación; esto era de esperarse ya que los neutrófilos son células involucradas en los proceso inflamatorio, por tanto, a mayor inflamación mayor número de neutrófilos.

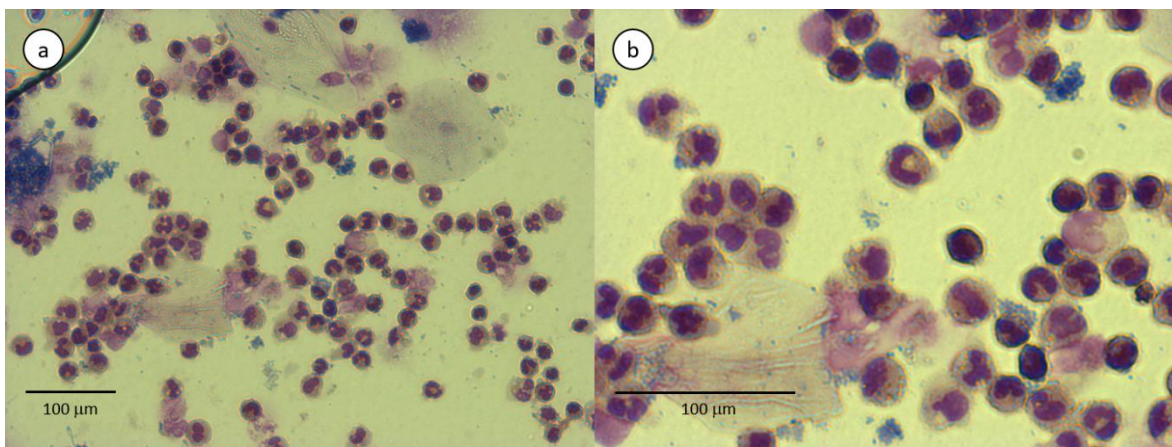


Figura 1. Neutrófilos aislados de cavidad oral. A partir de 50 ml de enjuagues bucales, los neutrófilos se purificaron y después se fijaron sobre un portaobjetos para ser teñidos con la tinción Wright-Giemsa. Los neutrófilos se observaron a través de un microscopio a un aumento de 20X (a) y 40X (b).

Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para evaluar las funciones microbicidas de los neutrófilos, primero determinamos la capacidad de estas células para producir especies reactivas de oxígeno (ROS) en condiciones basales y en respuesta al PMA. Los neutrófilos provenientes de sangre de individuos sanos que no son estimulados no produjeron ROS (Figura 2a y Figura 5). Cuando esos neutrófilos fueron estimulados con PMA produjeron ROS (Figura 2b y c y Figura 5). Esto apoya la idea de que los neutrófilos permanecen viables en sangre sin llevar a cabo ninguna acción microbicida, hasta que sean estimulados y activados, por algún agente patógeno (como microorganismos) o en este caso con PMA.

Por otro lado, los neutrófilos provenientes de sangre de individuos con gingivitis produjeron una cantidad importante de ROS, aun en condiciones basales (Figura 3a y Figura 5). Cuando fueron estimulados con PMA produjeron casi la misma cantidad de ROS que los neutrófilos de individuos sanos (Figura 3b y Figura 5). Este resultado podría explicarse con la hipótesis de que los neutrófilos se pueden encontrar en un estado de *priming*, o preactivación, ocasionado por moléculas como el LPS presente en bacterias, que, al interactuar con los neutrófilos de manera constante, permitirán que estos mejoren su respuesta a otros estímulos.

En los ensayos con neutrófilos de cavidad oral se observó que, indistintamente de que hayan sido estimulados o no, éstos emiten fluorescencia en presencia del reactivo sensible a oxidación, indicando la producción de ROS. Este comportamiento se ha observado con células de individuos con o sin inflamación gingival (Figura 4 y Figura 5). Esto sugiere que los neutrófilos que llegan a cavidad oral podrían ser estimulados (probablemente por la presencia de la microbiota oral residente) y, por tanto, ser activados para efectuar sus acciones microbicidas, en este caso, la producción de especies reactivas de oxígeno.

Los datos acumulados para la formación de ROS de 10 ensayos con neutrófilos provenientes de sangre y de boca de individuos sanos y los datos de 5 ensayos con neutrófilos provenientes de sangre y de boca de individuos con inflamación gingival se muestran en la Figura 5. Estos resultados indican que los neutrófilos de sangre de individuos sin inflamación

gingival se encuentran en estado inactivo por lo que producen cantidades limitadas de ROS (reflejada en la fluorescencia basal). Por otro lado, una vez que las células de sangre son estimuladas con PMA, se detectó un aumento de la intensidad de fluorescencia, en comparación con las no estimuladas, lo cual indica la producción de ROS. De manera contraria, los neutrófilos provenientes de sangre de individuos con inflamación gingival, a pesar de no haber sido estimulados con PMA, emiten una intensidad de fluorescencia similar a la intensidad de fluorescencia de las mismas células, pero estimuladas con PMA, sugiriendo la preactivación de los neutrófilos sanguíneos y por tanto la producción de ROS de manera equiparable. En el caso de los neutrófilos provenientes de boca de individuos con y sin inflamación gingival, indistintamente de que hayan sido estimulados o no con PMA, emiten una intensidad de fluorescencia en símil proporción, evidenciando la activación de estos, e indicando la producción de ROS.

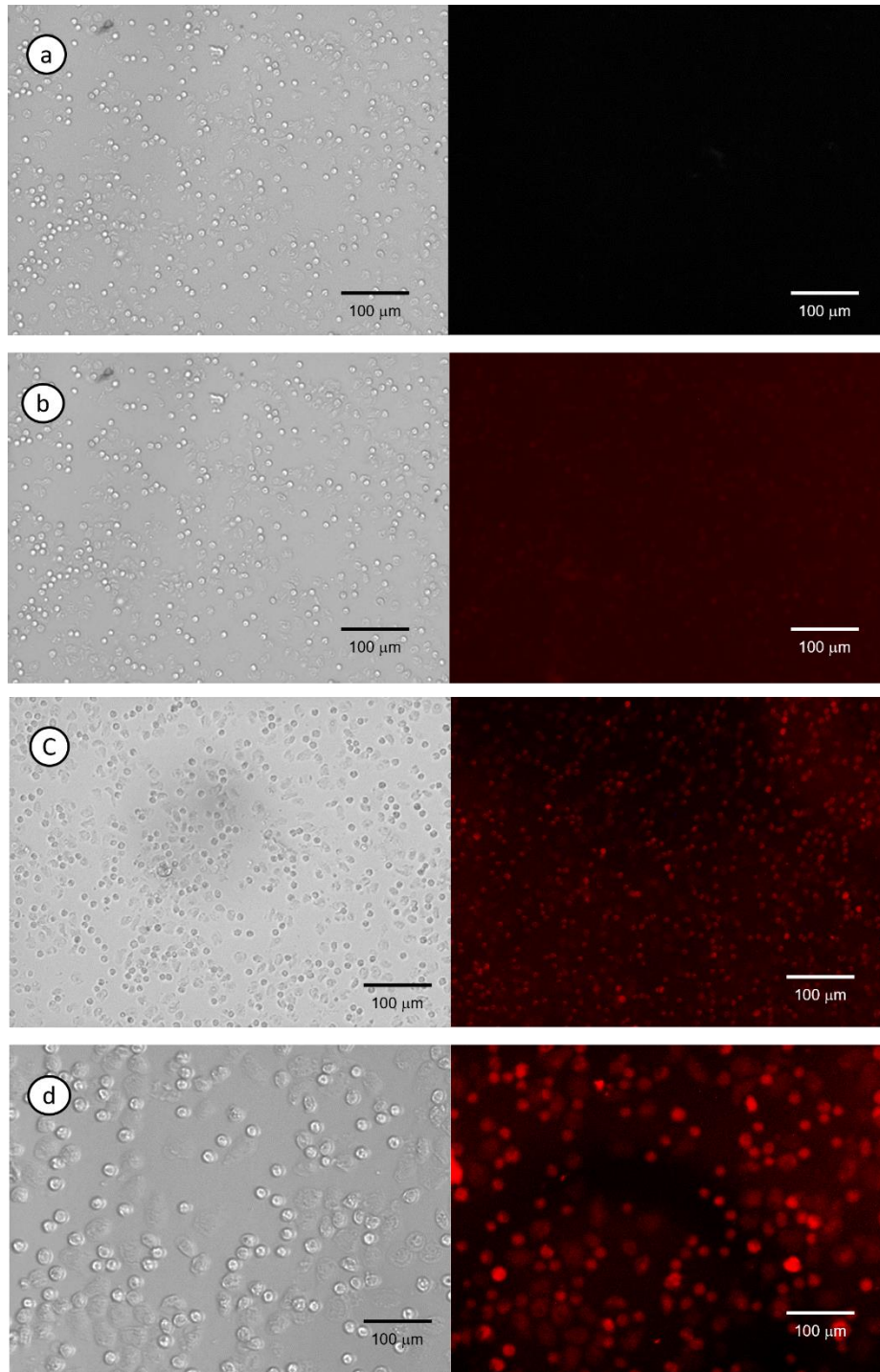


Figura 2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por neutrófilos sanguíneos de individuos sanos. Los neutrófilos de sangre fueron marcados con dihidroetidio y se dejaron sin estímulo (a) o se estimularon con PMA [20 nM] (b-c-d). Las células se observaron por microscopía de campo claro (paneles izquierdos) o de fluorescencia (paneles derechos) a un aumento de 10X (a y b), de 20X (c) o de 40X (d). Se muestran fotografías representativas de 6 muestras analizadas. Barra de calibración = 100 μm .

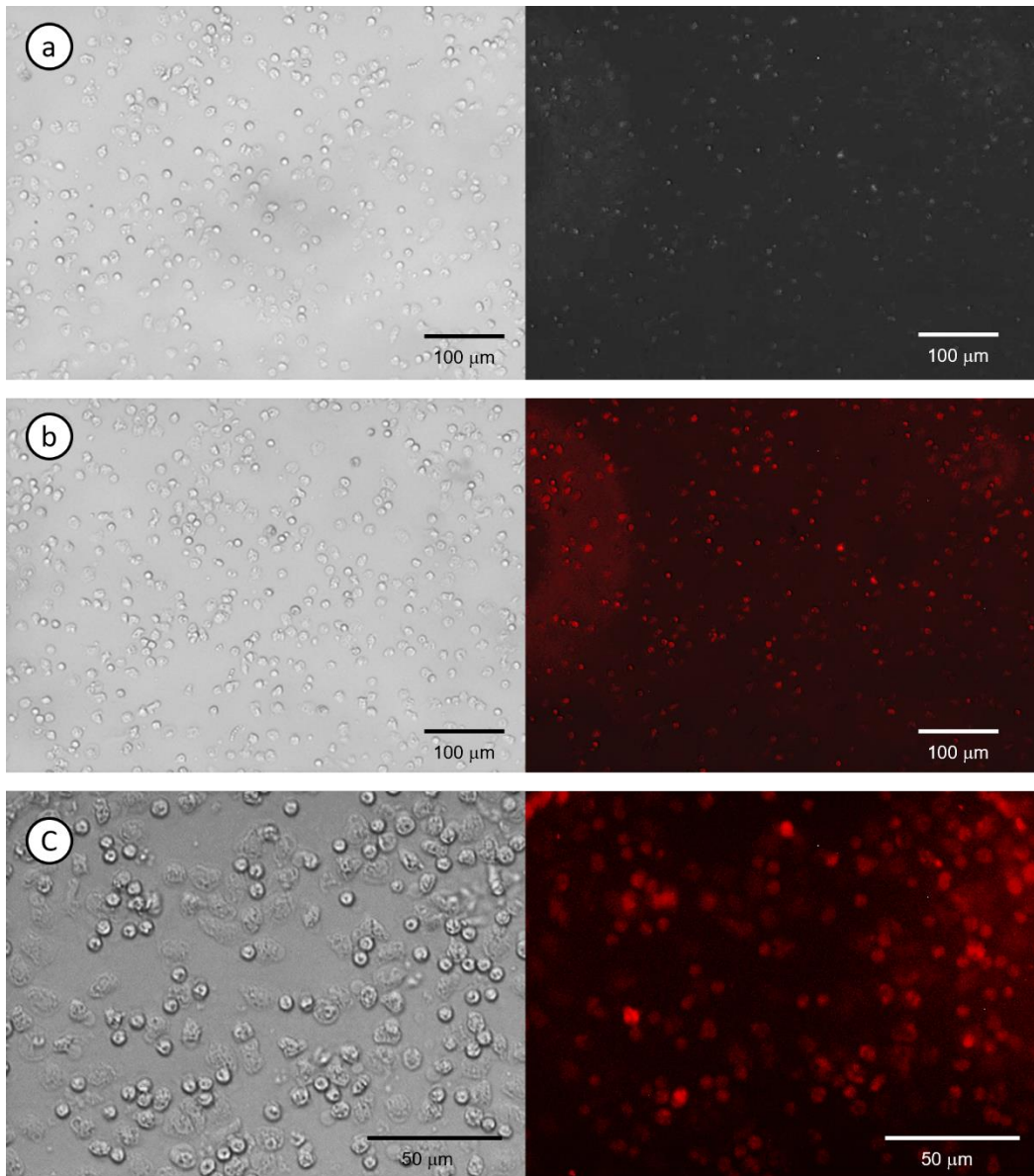


Figura 3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por neutrófilos sanguíneos de individuos con gingivitis. Los neutrófilos de sangre fueron marcados con dihidroetidio y se dejaron sin estímulo (a) o se estimularon con PMA [20 nM] (b). Las células se observaron por microscopía de campo claro (paneles izquierdos) o de fluorescencia (paneles derechos) a un aumento de 10X (a), de 20X (b) o de 40X (c).

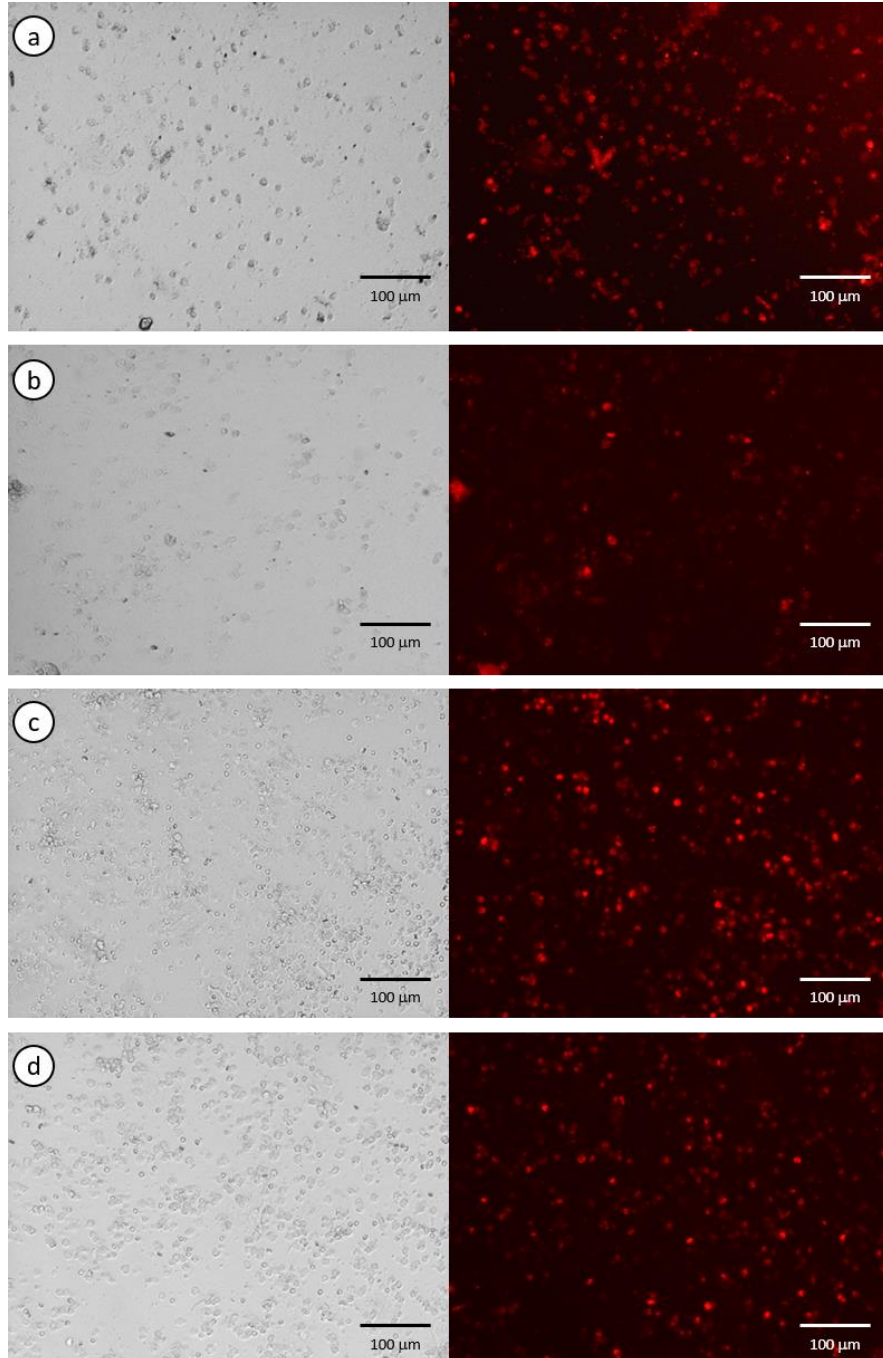


Figura 4. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por neutrófilos orales de individuos sanos (a y b) o de individuos con inflamación gingival (c y d). Los neutrófilos orales fueron marcados con dihidroetidio y se dejaron sin estímulo (a y c) o se estimularon con PMA [20 nM] (b y d). Las células se observaron por microscopía de campo claro (paneles izquierdos) o de fluorescencia (paneles derechos) a un aumento de 10X.

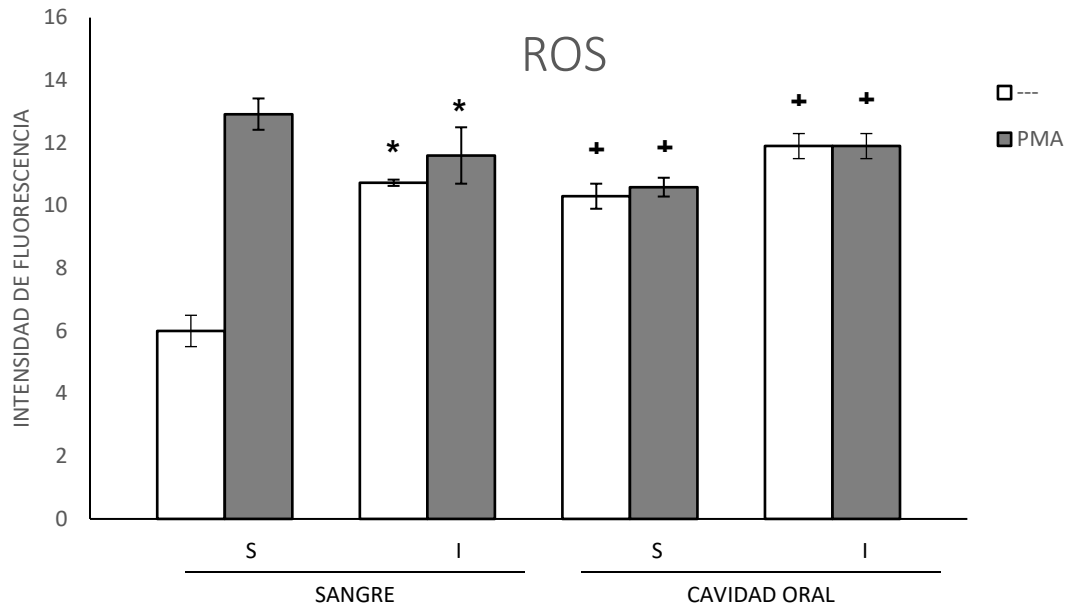


Figura 5. Formación de especies reactivas de oxígeno por neutrófilos de sangre y de cavidad oral purificados de individuos sanos (S) o de individuos con inflamación gingival (I). Los neutrófilos fueron marcados con dihidroetidio y se dejaron sin estímulo (---) o se estimularon con PMA [20 nM]. Las células se observaron por microscopía de fluorescencia y se tomaron fotografías a un aumento de 10X. A partir de las fotografías, la intensidad de fluorescencia se calculó usando el programa Image J. Los datos son el promedio \pm ESM de 5 experimentos independientes. Los asteriscos indican las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la misma condición evaluada en el otro grupo de estudio (sanos) en sangre. Las cruces indican las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la misma condición evaluada en el otro grupo de estudio (sanos y con inflamación gingival) entre sangre y cavidad oral.

Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

Otra función antimicrobiana de los neutrófilos es la formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs). Las NETs son fibras de DNA (cromatina) donde los microorganismos quedan atrapados. La producción de NETs se ha determinado mediante la visualización de las fibras de cromatina extracelular, con la ayuda del reactivo Sytox Green, el cual no puede entrar a las células y flúorese al unirse al DNA. Entonces este colorante sólo fluoresce cuando hay DNA fuera de las células. También, se usa el colorante DAPI que sí puede entrar a las células y fluoresce cuando se une al DNA.

Los neutrófilos de la sangre de individuos sanos que no fueron estimulados se observaron como células redondas con múltiples gránulos (Figura 6a; panel izquierdo). Al teñir estas células con DAPI, se observó que tienen su núcleo multilobulado y bien definido (Figura 6a; panel derecho). Al contrario, los neutrófilos estimulados con PMA durante 4 horas, se observaron como células alargadas y más pequeñas que los neutrófilos sin estímulo (Figura 6b; panel izquierdo) y con núcleos descondensados y fibras de cromatina fuera de la células (Figura 6b; panel derecho). La presencia de DNA fuera de la célula en forma de fibras denota la producción de NETs. Por otro lado, los neutrófilos de la sangre de individuos con inflamación gingival, que no fueron estimulados se observaron como células redondas (Figura 6c; panel izquierdo). Al teñir estas células con DAPI, se observa que tienen su núcleo multilobulado (Figura 6c; panel derecho). De manera similar, los neutrófilos estimulados con PMA durante 4 horas, mantuvieron su forma circular (Figura 6d; panel izquierdo), sin embargo, también presentaron los núcleos descondensados y fibras de cromatina fuera de la células (Figura 6d; panel derecho), evidenciando también la producción de NETs. De igual manera, los neutrófilos aislados de cavidad oral de individuos sin inflamación gingival presentan sus núcleos lobulados, compactos y bien definidos (Figura 7a).

Por el contrario, los neutrófilos de individuos con inflamación gingival mostraron núcleos no compactos ni multilobulados (Figure 7b). Esto es indicativo de la descondensación de la cromatina (NETosis). Cuando los neutrófilos de cavidad oral de individuos sin inflamación gingival fueron estimulados con PMA perdieron la estructura multilobular y compacta de

los núcleos y además se pudieron observar algunas fibras de DNA que están fuera de las células (Figura 8a y b). Esto es indicativo de que los neutrófilos formaron NETs.

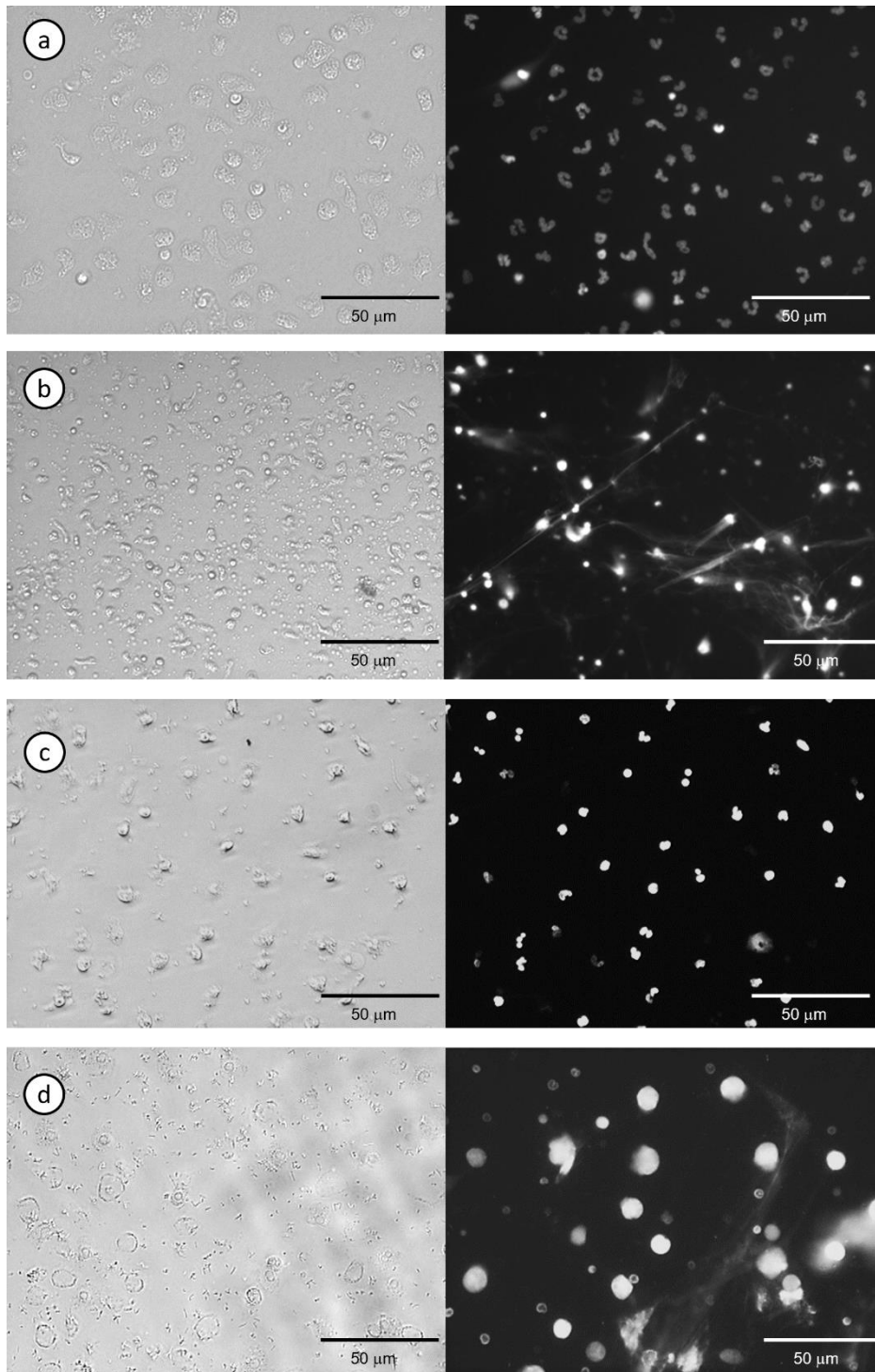


Figura 6. Microscopía en campo claro (paneles izquierdos) y fluorescencia (paneles derechos) de neutrófilos sanguíneos de individuos sanos (a y b) o de individuos con inflamación gingival (c y d), sin estímulo (a y c) y estimulados con PMA [20 nM] (b y d). Las células fueron observadas a un aumento de 20X. (d) campo claro, se muestra

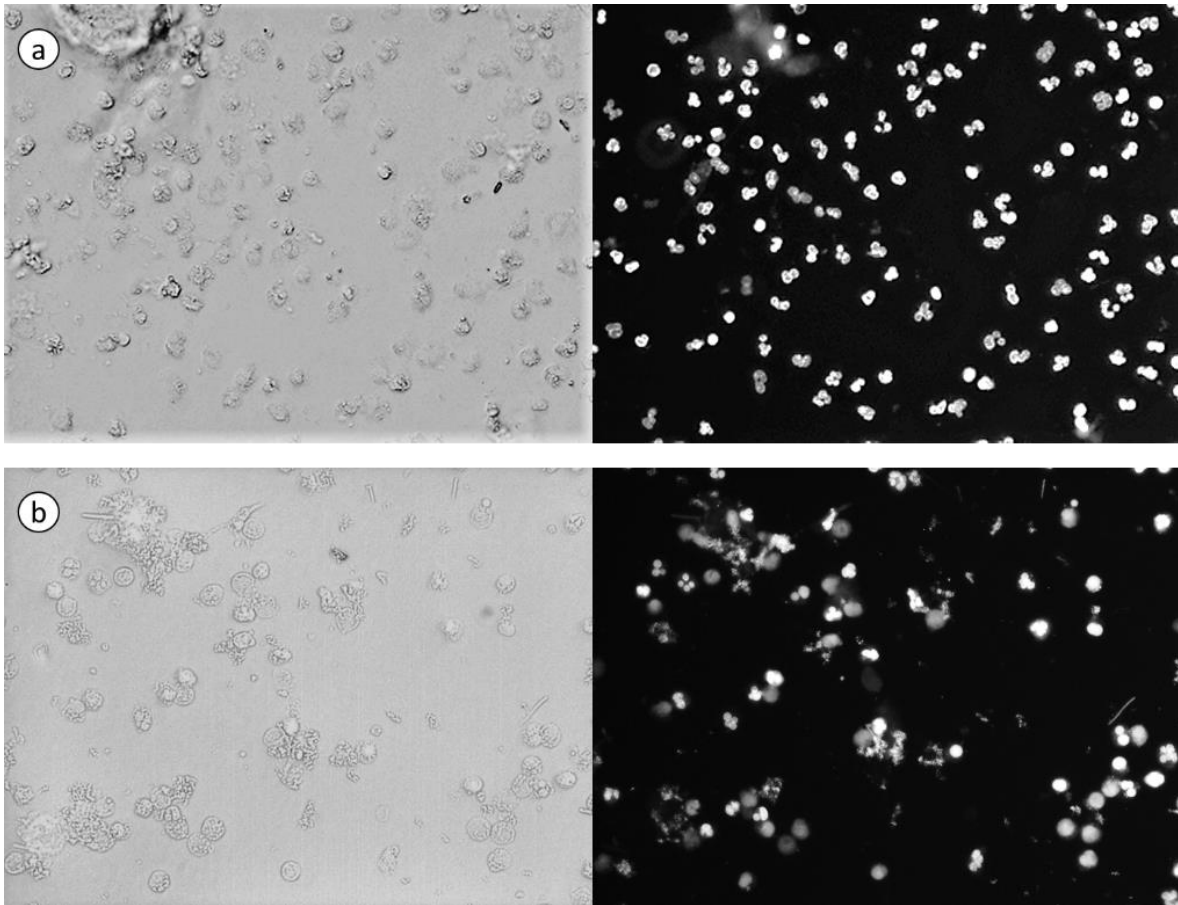


Figura 7. Microscopia en campo claro y fluorescencia utilizando DAPI, de neutrófilos orales. Sin estímulo, inmediatamente después de la purificación. Muestra de un individuo sin inflamación gingival (a) y uno con inflamación gingival (b), a un aumento de 20X.

De forma contraria, los neutrófilos de cavidad oral de individuos con inflamación gingival ya presentaban una morfología del núcleo alterada (Figura 8C) recién aislados de la boca y sin ser estimulados. Estas células, al ser estimuladas con PMA, sólo mostraron un ligero aumento de en el tamaño de sus núcleos y en la cantidad de fibras de cromatina (Figura 8d). Esto sugiere fuertemente que los neutrófilos orales de personas con gingivitis ya se encuentran en un estado de estimulación que los lleva a iniciar el proceso de NETosis en la cavidad oral, sin necesidad de otro estímulo externo como el PMA. Interesantemente, el estímulo adicional de PMA no parece llevar a los neutrófilos orales de individuos con inflamación gingival a una mayor formación NETs.

Para explorar si efectivamente los neutrófilos de cavidad oral de individuos con inflamación gingival ya están pre-estimulados y tienen el potencial de formar más NETs, los neutrófilos de cavidad oral de individuos sanos y de individuos con inflamación fueron aislados y observados en el tiempo. Los neutrófilos de individuos sanos presentaron núcleos multilobulados, que es la morfología normal de estas células. Después de cuatro horas en cultivo, estos neutrófilos no mostraron cambios en la morfología de sus núcleos (Figura 9a, b y c). En cambio, los neutrófilos orales de individuos con inflamación gingival claramente formaron NETs en un lapso de cuatro horas (Figura 9d, e y f). Estos resultados sugieren fuertemente que los neutrófilos en la cavidad oral de individuos con inflamación gingival ya se encuentran pre-activados y pueden proseguir con el proceso de NETosis culminando con la formación de NETs.

Resumiendo, los datos para la formación de NETs, vemos que los neutrófilos de sangre de individuos sanos se encuentran en reposo, pero pueden entrar en NETosis y formar redes al ser estimulados con PMA (Figura 10). De forma similar los neutrófilos de sangre de individuos con inflamación gingival no producen NETs. Sin embargo, al ser estimulados con PMA son capaces de producir más NETs que los neutrófilos sanguíneos de individuos sanos (figure 10). Esto sugiere que, en los individuos con inflamación en la boca, hay un efecto sistémico que hace que los neutrófilos de sangre estén preactivados.

Por otro lado, los neutrófilos de cavidad oral de individuos sanos tampoco producen NETs. Sin embargo, son capaces de entrar en NETosis y formar NETs después de ser estimulados con PMA (Figura 10). Por el contrario, los neutrófilos de cavidad oral de individuos con inflamación gingival, ya se encuentran en un estado activado y muchos de ellos en franca NETosis. La cantidad de NETs que producen estos neutrófilos es incluso mayor que la cantidad que los neutrófilos de individuos sanos producen. Más aún, los neutrófilos orales de individuos con inflamación gingival ya no parecen ser capaces de producir más NETs al ser estimulados con PMA (Figura 10). Esto sugiere, que los neutrófilos orales de individuos con inflamación han sido previamente activados y son capaces de producir grandes cantidades de NETs.

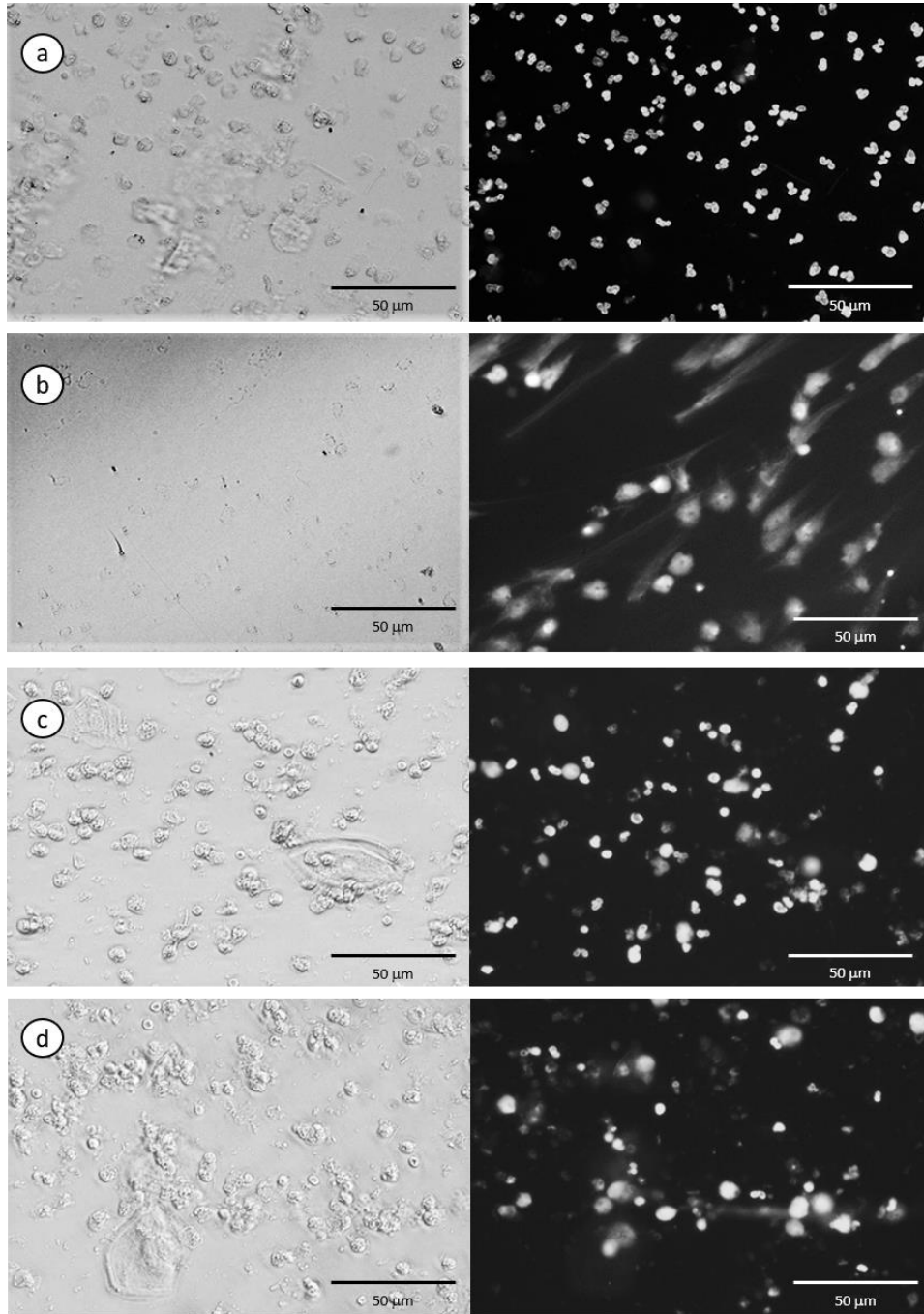


Figura 8. Microscopía en campo claro (paneles de la izquierda) y fluorescencia (paneles de la derecha) de neutrófilos de cavidad oral de individuos sin inflamación gingival (a y b) o de individuos con inflamación gingival (c y d). Los neutrófilos se dejaron sin estímulo (a y c) o se estimularon con 20 nM de PMA (b y d). Las fotografías se tomaron a un aumento de 20X.

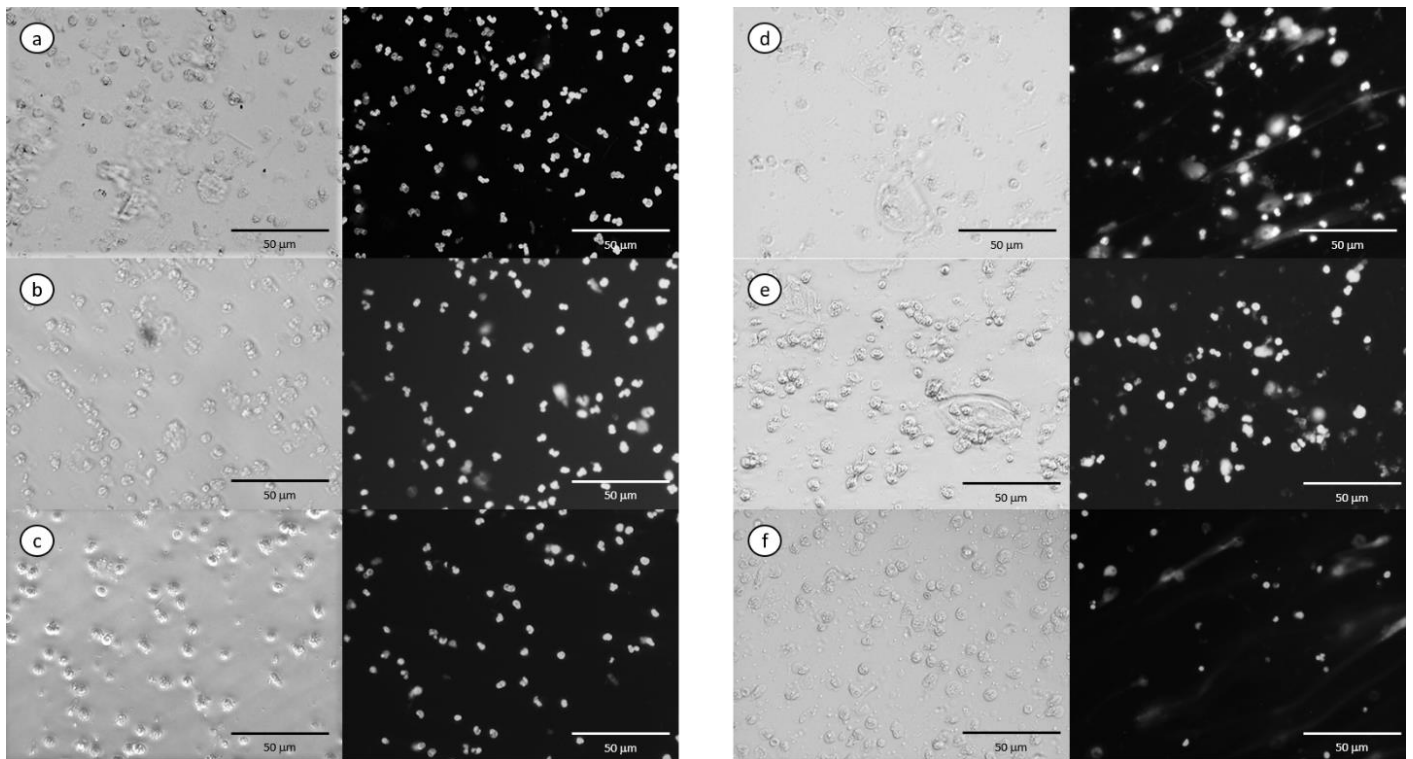


Figura 9. Microscopia en campo claro y fluorescencia de neutrófilos orales provenientes de tres individuos sin inflamación gingival (a, b, c) y de tres individuos con inflamación gingival (d, e, f). Los neutrófilos se aislaron y se dejaron sin ningún estímulo por cuatro horas y se tiñeron usando Sytox Green. Fotografías tomadas con un microscopio de fluorescencia a un aumento de 20X.

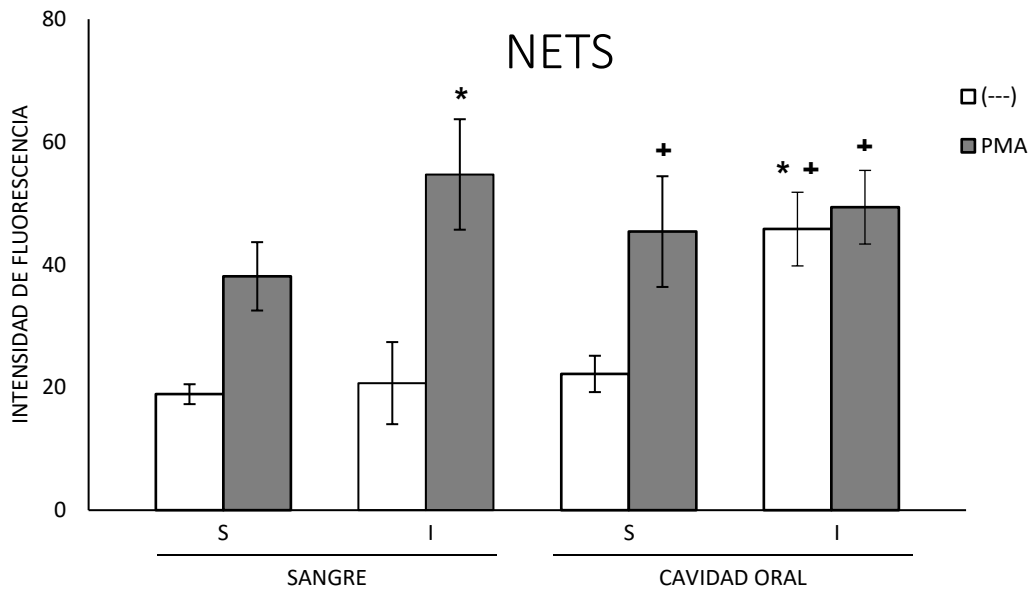


Figura 10. Formación de NETs por neutrófilos de sangre y de cavidad oral provenientes de individuos sin inflamación gingival (S) y con inflamación gingival (I). Los neutrófilos purificados se dejaron sin estímulo (barras blancas) o se estimularon con 20 nM de PMA (barras grises). La formación de NETs fue estimada mediante la intensidad de fluorescencia de Sytox Green. Los datos son la media \pm ESM de 5 experimentos independientes. Los asteriscos indican las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la misma condición evaluada en el otro grupo de estudio (sanos) tanto en sangre como en cavidad oral. Las cruces indican las condiciones donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la misma condición evaluada en el otro grupo de estudio (sanos y con inflamación gingival) entre sangre y cavidad oral.

Fagocitosis

Otra función antimicrobiana de los neutrófilos es la fagocitosis. La fagocitosis es capacidad que tienen los neutrófilos para poder introducir dentro de ellas, microorganismos o partículas patógenas, para poder degradarlos. Durante la fagocitosis, las células incorporan dentro de vesículas especializadas a partículas de más de 0.5 μm . Cuando una partícula es reconocida por los neutrófilos, muchas veces a través de anticuerpos, la membrana del neutrófilo se extiende alrededor de la partícula hasta envolverla completamente. Posteriormente, la membrana que recubre a la partícula se separa formando una nueva vesícula que lleva en su interior a la partícula. La nueva vesícula es denominada fagosoma. Dentro del fagosoma la partícula, que normalmente es un microorganismo, puede posteriormente ser destruída. El fagosoma se une a otras vesículas y gránulos del neutrófilo en un proceso que se conoce como maduración del fagosoma. En este proceso se forma un fagolisosoma, el cual contiene un pH ácido y múltiples enzimas que pueden degradar al microorganismo.

Una de las formas más eficientes de fagocitosis es cuando la partícula está recubierta de anticuerpos. Esto se conoce como opsonización (del griego "hacer más apetitoso"). Las partículas opsonizadas son reconocidas eficientemente por los neutrófilos a través de receptores que se unen a la parte constante (Fc) de las moléculas de anticuerpo. Por eso los receptores se denominan receptores Fc.

Para evaluar la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos, éstos fueron incubados junto con eritrocitos opsonizados. De esta forma, los neutrófilos reconocen a los eritrocitos y los pueden fagocitar. Esto se puede medir con facilidad en el laboratorio al ver a las células a través de un microscopio y contar el número de eritrocitos que son fagocitados (ingeridos) por los neutrófilos. Normalmente, la capacidad de fagocitosis se estima con el Índice fagocítico, que se define como el número de partículas fagocitadas por cada 100 neutrófilos.

Cuando los neutrófilos de sangre que fueron incubados con eritrocitos sin opsonizar, el índice fagocítico fue de alrededor de 20 (Figura 11). Esto representa la actividad fagocítica basal de los neutrófilos. En presencia de un agente estimulador, como el péptido formilado fMLF

(formil-metil-leucil-fenilalanina) que proviene de bacterias, los neutrófilos son activados en muchas funciones incluyendo la fagocitosis. Los neutrófilos de sangre tratados con fMLF y en presencia de eritrocitos no opsonizados mostraron un índice fagocítico de alrededor de 30 (Figura 11). Esto significa que los eritrocitos pueden fagocitar un poco mejor cuando se estimulan, pero aun así la eficiencia de fagocitosis no es muy buena con células no patógenas como los eritrocitos. En cambio, si los eritrocitos están opsonizados con anticuerpos, la fagocitosis se vuelve muy eficiente. Los neutrófilos en presencia de eritrocitos opsonizados, muestran un índice fagocítico de cerca de 100 (Figura 11). Esto significa que los neutrófilos pueden fagocitar partículas opsonizadas con una eficiencia cinco veces mejor que la eficiencia sobre partículas sin opsonizar. Finalmente, al añadir fMLF, el índice fagocítico se eleva casi a 200 (Figura 11). Esto indica que la capacidad fagocítica de los neutrófilos se ve favorecida si las partículas están opsonizadas; además, esta capacidad será mejorada si los neutrófilos han sido previamente expuestos a otras moléculas activadoras como el fMLF.

Posteriormente a estos experimentos, quisimos evaluar la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos de sangre de individuos con gingivitis. Sin embargo, esto resultó muy complicado porque en la facultad de odontología no me dieron permiso de tomar muestras de sangre de los pacientes con enfermedad periodontal. Además, las restricciones sanitarias que se impusieron debido a la pandemia de la covid-19, hicieron que ya no tuvieramos acceso a los pacientes. Por tanto, los experimentos de fagocitosis con neutrófilos de cavidad oral tampoco pudieron ser realizados.

Sin embargo, basados en los resultados de las funciones de formación de ROS y de NETs por los neutrófilos de cavidad oral de individuos con gingivitis, creemos que los estos neutrófilos también presentan una capacidad fagocítica elevada, ya que en la boca se encuentran en un medio inflamatorio con muchas bacterias.

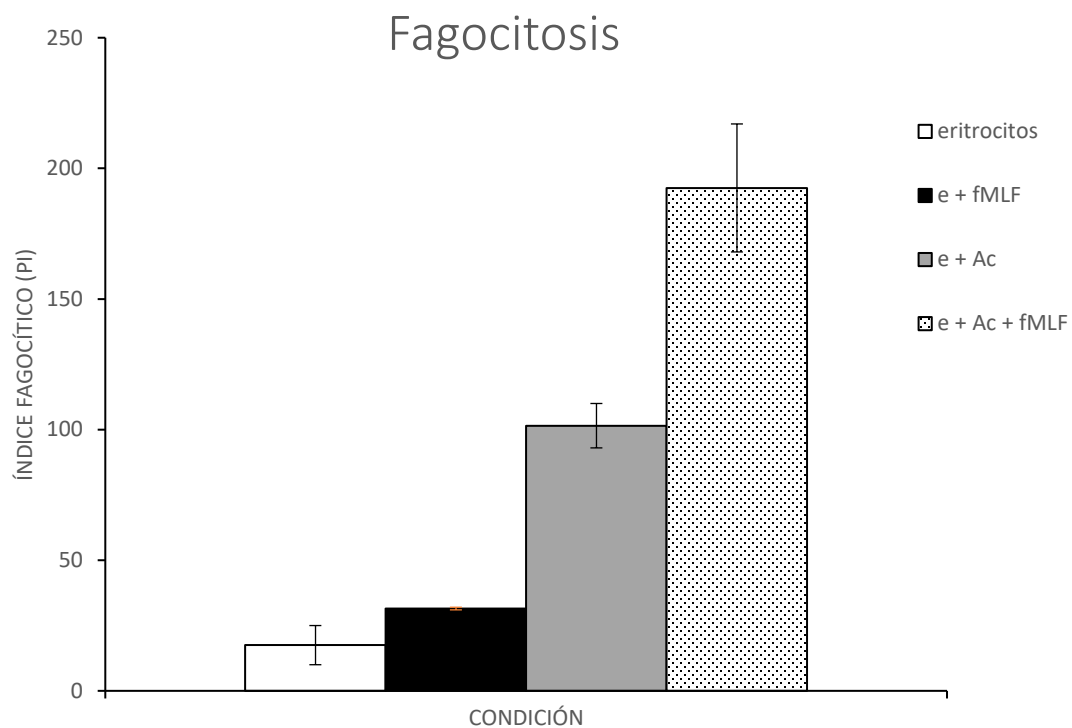


Figura 11. Índice fagocítico de neutrófilos sanguíneos de individuos sanos. De izquierda a derecha, neutrófilos incubados sólo con eritrocitos (eritrocitos); con eritrocitos y fMLF (e+fMLF); con eritrocitos opsonizados (e+Ac); y con eritrocitos opsonizados y fMLF (e+Ac+fMLF). Los datos son la media \pm ESM de 2 experimentos independientes.

13. DISCUSIÓN

En condiciones normales, los neutrófilos pueden viajar de la sangre a distintos tejidos para protegerlos del ataque o lesión, por parte de microorganismos patógenos. Uno de esos sitios a los que los neutrófilos pueden llegar, es la cavidad oral, donde existe una migración constante de estos leucocitos para la protección contra la microbiota residente. La boca es uno de los sitios de eliminación de neutrófilos pues se calcula que alrededor de 30 000 neutrófilos migran a la cavidad oral cada minuto en condiciones basales. Sin embargo, esta cantidad representa solo el 1% de todos los neutrófilos producidos diariamente [15]. Los neutrófilos son capaces de realizar diferentes funciones microbicidas, dependiendo de los tejidos donde se encuentran, debido a su potencial de modificar la expresión de varias moléculas de membrana y producir gran cantidad de citocinas [17].

En este trabajo se logró evidenciar las diferencias y similitudes entre las funciones que llevan a cabo los neutrófilos de cavidad oral y los de sangre, determinada por la producción de ROS y NETs. Los neutrófilos de cavidad oral presentan un fenotipo activado o efecto de cebado, ya que sin necesidad de haber estimulado a las células con PMA, éstas produjeron ROS, similar a como lo hicieron los neutrófilos de sangre estimulados con PMA. El cebado es el cambio de un neutrófilo después de la exposición a citocinas proinflamatorias, quimiocinas y productos microbianos desde un estado basal de "reposo" a un estado "listo" que da como resultado respuestas mejoradas a los estímulos activadores [101]. Los neutrófilos cebados, generalmente presentan una producción mejorada de ROS por la NADPH oxidasa [111].

Se ha reportado que los neutrófilos aislados de sangre de pacientes con periodontitis crónica tienen una mayor actividad de estallido respiratorio en comparación con individuos sin periodontitis [112]. Los neutrófilos de los pacientes presentan un fenotipo cebado determinado por una producción de ROS extracelular significativamente mayor cuando se exponen ex vivo con *S. aureus* opsonizado o patógenos orales no opsonizados como *Fusobacterium nucleatum* o *P. gingivalis* [112]. A pesar de no haber utilizado microorganismos como agentes activadores de los neutrófilos, nuestros resultados

muestran una tendencia similar, en la producción de ROS en células de sangre estimuladas con PMA, asociadas probablemente a inflamación gingival.

También encontramos que los neutrófilos de cavidad oral presentan diferencias en la morfología de su núcleo. En la mayoría de los casos el núcleo mostraba una conformación multilobulada y compacta, equiparándose a la de los neutrófilos de sangre. Sin embargo, también se obtuvieron células con pérdida de la morfología característica de un neutrófilo polimorfonuclear, ya que el núcleo se apreciaba descondensado y circular. Estos aspectos sugieren que los neutrófilos ya han sido estimulados y se encuentran en el proceso de NETosis. Apoyando esta idea es el hecho que pudimos visualizar fibras de cromatina extracelular, mediante la tinción con Sytox Green. Esto es indicativo de la formación de NETs. Mostrando así el metabolismo activo de las células como resultado del cebado, muy probablemente por el contacto con la microbiota oral y la presencia de inflamación [10]. Con estos resultados se pensaría que los neutrófilos orales hiperreactivos se encuentran en un proceso celular de muerte sin embargo, contrario a esto Lakschevitz et al. mencionan que los neutrófilos orales de pacientes con periodontitis crónica muestran una mayor expresión de Bcl-2, un marcador de supervivencia, y una expresión disminuida de Bax, un marcador proapoptótico, tanto por análisis del transcriptoma como por validación por inmunotransferencia y citometría de flujo en comparación con células orales aisladas de controles sanos [105]. Existen diversos estudios realizados con neutrófilos de circulación sanguínea de pacientes con periodontitis donde se compara la producción de citocinas de éstos, contra los neutrófilos de individuos sin la enfermedad. La liberación de IL-8, IL-6, TNF α e IL-1 β de células no estimuladas es similar entre todos los grupos; Sin embargo, los neutrófilos de los pacientes observan una liberación significativamente mayor de todas las citocinas tras el diferente contacto bacteriano (LPS de *Escherichia coli*, o *S. aureus* opsonizado, o *F. nucleatum*, o con *P. gingivalis*) en comparación con la respuesta de los neutrófilos de los individuos sanos [113]. A pesar de ello no existen diferencias en la respuesta de citocinas estimuladas por bacterias en los neutrófilos aislados de pacientes con terapia periodontal, en comparación con los niveles detectados antes de la terapia, lo que podría indicar que el estado de cebado de las células circulantes sigue presente después

de la terapia periodontal o que la hiperreactividad de los neutrófilos está impresa o es constitutiva [113].

Por último, pudimos demostrar que la función fagocítica de los neutrófilos de sangre se ve favorecida por la presencia de anticuerpos que promuevan la opsonización del patógeno o elemento a fagocitar, así como por la presencia de fMLF, un péptido estructural bacteriano que induce tanto la quimiotaxia del neutrófilo, así como su activación de la degranulación de vesículas secretoras y cambios conformacionales en el citoesqueleto para poder engullir a los microorganismos [114]. El estudio de los neutrófilos de cavidad oral cada día logra avances significativos en el conocimiento de estas células, sin embargo, existen limitantes, que exigen la continua investigación en el funcionamiento de estas células dentro de boca. La cavidad oral es la principal vía de entrada a nuestro cuerpo, está conectada con varios sistemas como el respiratorio, el digestivo o el inmunológico, esto nos sitúa en la importancia y complejidad de esta con relación a la salud sistémica. Está reportado que muchas de las enfermedades a nivel sistémico tienen repercusión y manifestaciones en cavidad oral y viceversa. Dada su proximidad y contacto con el medio externo, la cavidad oral constantemente sufre cambios, los cuales deben ser regulados para que haya homeostasis y se mantenga la salud oral.

Sin embargo existen factores que modifican el ecosistema oral, principalmente los hábitos de higiene, los cuales determinarán el grado de heterogeneidad que haya de los géneros y especies de microorganismos que colonicen los tejidos orales; la alimentación, que influye en los factores físicos tales como el pH, la temperatura, o el grado de humedad en la boca, lo cual favorecerá el medio ideal para el crecimiento de ciertos microorganismos, los que sean compatibles con salud o enfermedad; así como el fumar o consumir alcohol, pues componentes químicos como la nicotina o el alquitrán en los cigarros, irritan la mucosa oral favoreciendo el establecimiento de la inflamación. Siendo la conjunción de uno o varios de estos aspectos negativos: la falta de higiene, el consumo constante de azúcares refinados y bebidas carbonatadas, el fumar y consumir alcohol. Lo que favorecerá el establecimiento de la enfermedad periodontal, y donde en mi opinión, radica el verdadero reto para determinar el rol que juegan los neutrófilos dentro de la cavidad oral.

14. CONCLUSIONES

Los resultados nos muestran que los neutrófilos que llegan a cavidad oral manifiestan un fenotipo activado, pues a pesar de que estos llevan a cabo las mismas acciones microbicidas que los neutrófilos de circulación sanguínea, como es la producción de ROS y la formación de NETs, los neutrófilos de cavidad oral ejercen dichas funciones, de manera constitutiva, o sin la necesidad de un estímulo *in vitro*, a diferencia de los neutrófilos de circulación sanguínea. Además, se estableció una diferencia morfológica y funcional entre los neutrófilos de cavidad oral, provenientes de personas con inflamación gingival y de quienes no presentaron inflamación gingival. Pues los neutrófilos de personas con inflamación gingival mostraron un estado de mayor activación determinado por la mayor producción de ROS y por el estado de descondensación nuclear evidente, relacionado con netosis. A diferencia de los neutrófilos de personas sin inflamación gingival. Así mismo, se evidenció que los neutrófilos de circulación sanguínea provenientes de personas con inflamación gingival parecen responder de manera más efectiva, ante un estímulo, en comparación con los neutrófilos de circulación sanguínea de personas sin inflamación gingival. Esto sugiere que los neutrófilos provenientes de ambientes inflamatorios presentan un cebado o preactivación, lo cual deriva en una respuesta exagerada ante el estímulo, por tanto, podríamos pensar que tanto los neutrófilos de cavidad oral, como los de circulación sanguínea de personas con manifestación de inflamación presentan un fenotipo hiperactivo.

Por otro lado, referente al mecanismo de fagocitosis, se pudo comprobar que los neutrófilos de circulación sanguínea ejercen este mecanismo de manera efectiva, sin embargo, la respuesta mejora cuando el agente a fagocitar es opsonizado con anticuerpos. Además, también se comprobó que la respuesta de los neutrófilos para fagocitar se ve favorecida al estimularlos con fMLF componente bacteriano. A pesar de no haber podido evaluar esta función en los neutrófilos de cavidad oral, podríamos inferir que esta acción podría ser efectiva también en dichas células, ya que la producción de ROS está directamente relacionada con la formación y acción del fagolisosoma, y como ya se mencionó, el estallido respiratorio como causa de la producción de ROS es un mecanismo microbicida constitutivo

de los neutrófilos de cavidad oral. Además de que estas células se encuentran en contacto con una gran cantidad de microorganismos bacterianos, en cuyas estructuras celulares se encuentra el componente fMLF.

15. PERSPECTIVAS

La magnitud de la generación de ROS por los neutrófilos orales se podría relacionar con la gravedad de la enfermedad y estudios longitudinales más amplios podrían confirmar si un fenotipo hiperactivo en los neutrófilos orales podría predecir si los pacientes fueran refractarios al tratamiento y más susceptibles a la progresión de la enfermedad [104]. No obstante, los estudios de ROS se ven obstaculizados por diversos problemas técnicos. Idealmente, una sonda para ROS debería ser específica para compartimentos intracelulares particulares y ser capaz de usarse in vivo, sin embargo, las sondas tradicionales para ROS no cumplen con estas especificaciones. Un nuevo enfoque para la detección de ROS que cumple con estos criterios es el uso de sondas basadas en proteínas fluorescentes sensibles a redox, como roGFP. Otros métodos que pueden usarse in vivo son: el perfil de transcripción de genes sensibles a superóxido o peróxido de hidrógeno, así como la detección de productos relativamente estables de oxígeno reactivo mediante espectrometría de masas [115].

Se reporto un análisis del transcriptoma de neutrófilos orales, revela cambios significativos en la expresión génica entre individuos con inflamación crónica e individuos sanos. Siendo estos cambios el resultado de un fenotipo pro-sobrevivencia en los neutrófilos individuos con periodontitis crónica [105]. Por lo que analizar el transcriptoma de estas células en sujetos más jóvenes podría dilucidar si es constitutivo, lo cual favorecería el inicio y desarrollo de la enfermedad.

16. REFERENCIAS

1. Belkaid, Y., *Tailored immunity at mucosae*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 5-7.
2. Belkaid, Y. and S. Naik, *Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals*. Nat Immunol, 2013. **14**(7): p. 646-53.
3. Zenobia, C., et al., *Commensal bacteria-dependent select expression of CXCL2 contributes to periodontal tissue homeostasis*. Cell Microbiol, 2013. **15**(8): p. 1419-26.
4. Aas, J.A., et al., *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5721-32.
5. Meyle, J. and I. Chapple, *Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis*. Periodontol 2000, 2015. **69**(1): p. 7-17.
6. Curtis, M.A., C. Zenobia, and R.P. Darveau, *The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease*. Cell Host Microbe, 2011. **10**(4): p. 302-6.
7. Scott, D.A. and J. Krauss, *Neutrophils in periodontal inflammation*. Front Oral Biol, 2012. **15**: p. 56-83.
8. Hart, T.C. and J.C. Atkinson, *Mendelian forms of periodontitis*. Periodontol 2000, 2007. **45**: p. 95-112.
9. Berezow, A.B. and R.P. Darveau, *Microbial shift and periodontitis*. Periodontol 2000, 2011. **55**(1): p. 36-47.
10. Rosales, C. and E. Uribe-Querol, *Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 9042851.
11. Mydel, P., et al., *Roles of the host oxidative immune response and bacterial antioxidant rubrerythrin during Porphyromonas gingivalis infection*. PLoS Pathog, 2006. **2**(7): p. e76.
12. Nussbaum, G. and L. Shapira, *How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis?* J Clin Periodontol, 2011. **38 Suppl 11**: p. 49-59.
13. Ryder, M.I., *Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis*. Periodontol 2000, 2010. **53**: p. 124-37.
14. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
15. Rosales, C., *Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity*. J Leukoc Biol, 2020. **108**(1): p. 377-396.
16. Tak, T., et al., *What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(4): p. 595-601.
17. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 181-218.
18. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
19. Mocsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond*. J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
20. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.

21. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 459-89.
22. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *Granulopoiesis and granules of human neutrophils*. Immunol Rev, 2016. **273**(1): p. 11-28.
23. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. Trends Immunol, 2010. **31**(8): p. 318-24.
24. Yvan-Charvet, L. and L.G. Ng, *Granulopoiesis and Neutrophil Homeostasis: A Metabolic, Daily Balancing Act*. Trends Immunol, 2019. **40**(7): p. 598-612.
25. Dancey, J.T., et al., *Neutrophil kinetics in man*. J Clin Invest, 1976. **58**(3): p. 705-15.
26. Athens, J.W., et al., *Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects*. J Clin Invest, 1961. **40**: p. 989-95.
27. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *Homeostatic regulation of blood neutrophil counts*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5183-8.
28. Weaver, C.T., et al., *The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 477-512.
29. Cortes-Vieyra, R., C. Rosales, and E. Uribe-Querol, *Neutrophil Functions in Periodontal Homeostasis*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 1396106.
30. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
31. Eskan, M.A., et al., *The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss*. Nat Immunol, 2012. **13**(5): p. 465-73.
32. Kennedy, A.D. and F.R. DeLeo, *Neutrophil apoptosis and the resolution of infection*. Immunol Res, 2009. **43**(1-3): p. 25-61.
33. Kourtzelis, I., G. Hajishengallis, and T. Chavakis, *Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 553.
34. Martin, C., et al., *Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 583-93.
35. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 285-94.
36. Altnauer, F., et al., *Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1343-54.
37. Zarbock, A. and K. Ley, *Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium*. Am J Pathol, 2008. **172**(1): p. 1-7.
38. Petri, B. and M.J. Sanz, *Neutrophil chemotaxis*. Cell Tissue Res, 2018. **371**(3): p. 425-436.
39. Guthrie, L.A., et al., *Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme*. J Exp Med, 1984. **160**(6): p. 1656-71.
40. Zeng, M.Y., et al., *The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses*. Mol Oral Microbiol, 2019. **34**(2): p. 27-38.
41. Sabroe, I., S.K. Dower, and M.K. Whyte, *The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 7**: p. S421-6.

42. Parker, L.C., et al., *The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(6): p. 886-92.
43. El-Benna, J., P.M. Dang, and M.A. Gougerot-Pocidallo, *Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(3): p. 279-89.
44. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.
45. Futosi, K., S. Fodor, and A. Mocsai, *Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways*. Int Immunopharmacol, 2013. **17**(3): p. 638-50.
46. Hager, M., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Neutrophil granules in health and disease*. J Intern Med, 2010. **268**(1): p. 25-34.
47. Nauseef, W.M., *Myeloperoxidase in human neutrophil host defence*. Cell Microbiol, 2014. **16**(8): p. 1146-55.
48. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
49. Borregaard, N., O.E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*. Trends Immunol, 2007. **28**(8): p. 340-5.
50. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3503-21.
51. Borregaard, N., et al., *Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(1): p. 80-7.
52. Delclaux, C., et al., *Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **14**(3): p. 288-95.
53. Soehnlein, O., A. Zerneck, and C. Weber, *Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 198-205.
54. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
55. Roos, D., *Chronic granulomatous disease*. Br Med Bull, 2016. **118**(1): p. 50-63.
56. Uribe-Querol, E. and C. Rosales, *Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1066.
57. Rosales, E.U.-Q.a.C., *Phagocytosis*, in *Encyclopedia of Infection and Immunity*, ScienceDirect, Editor. 2022. p. 99-109.
58. Rosales, C., *Antibody - Fc Receptor Interactions in Antimicrobial Functions* Current Immunology Reviews 2013. **9**(1).
59. Rosales, C., *Fc receptors: Cell activators of antibody functions*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2013. **04**(04): p. 21-33.
60. Levin, R., S. Grinstein, and J. Canton, *The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution*. Immunol Rev, 2016. **273**(1): p. 156-79.

61. Uribe-Querol, E. and C. Rosales, *Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1368.
62. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000639.
63. Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky, *NETs: a new strategy for using old weapons*. Trends Immunol, 2009. **30**(11): p. 513-21.
64. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
65. Metzler, K.D., et al., *Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity*. Blood, 2011. **117**(3): p. 953-9.
66. Hakkim, A., et al., *Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(2): p. 75-7.
67. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2010. **191**(3): p. 677-91.
68. Wang, Y., et al., *Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J Cell Biol, 2009. **184**(2): p. 205-13.
69. Buchanan, J.T., et al., *DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps*. Curr Biol, 2006. **16**(4): p. 396-400.
70. Branzk, N., et al., *Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens*. Nat Immunol, 2014. **15**(11): p. 1017-25.
71. Villanueva, E., et al., *Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 538-52.
72. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
73. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
74. Marcos, V., et al., *CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation*. Nat Med, 2010. **16**(9): p. 1018-23.
75. Lindhe, J., et al., *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5th ed. 2008, Oxford: Blackwell Munksgaard. xx, 569, 26 p. : ill. (some col.).
76. Miyasaki, K.T., *The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria*. J Periodontol, 1991. **62**(12): p. 761-74.
77. Saito, I., et al., *Ultrastructural and immunocytochemical characterization of polymorphonuclear leukocytes from gingival crevice in man*. J Periodontol, 1987. **58**(7): p. 493-7.
78. Darveau, R.P., *The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system*. DNA Cell Biol, 2009. **28**(8): p. 389-95.

79. Uriarte, S.M., J.S. Edmisson, and E. Jimenez-Flores, *Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence*. *Immunol Rev*, 2016. **273**(1): p. 282-98.
80. Hajishengallis, E. and G. Hajishengallis, *Neutrophil homeostasis and periodontal health in children and adults*. *J Dent Res*, 2014. **93**(3): p. 231-7.
81. Dupre-Crochet, S., M. Erard, and O. Nubetae, *ROS production in phagocytes: why, when, and where?* *J Leukoc Biol*, 2013. **94**(4): p. 657-70.
82. Winterbourn, C.C., A.J. Kettle, and M.B. Hampton, *Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function*. *Annu Rev Biochem*, 2016. **85**: p. 765-92.
83. Lacy, P. and G. Eitzen, *Control of granule exocytosis in neutrophils*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 5559-70.
84. Mollinedo, F., *Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis*. *Trends Immunol*, 2019. **40**(3): p. 228-242.
85. Sollberger, G., D.O. Tilley, and A. Zychlinsky, *Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization*. *Dev Cell*, 2018. **44**(5): p. 542-553.
86. Boeltz, S., et al., *To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps*. *Cell Death Differ*, 2019. **26**(3): p. 395-408.
87. Magan-Fernandez, A., et al., *Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis*. *Cells*, 2020. **9**(6).
88. Wang, J., et al., *The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021. **11**: p. 639144.
89. Bugl, S., et al., *Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling*. *Blood*, 2013. **121**(5): p. 723-33.
90. Zhang, D., et al., *Neutrophil ageing is regulated by the microbiome*. *Nature*, 2015. **525**(7570): p. 528-32.
91. Stappenbeck, T.S., L.V. Hooper, and J.I. Gordon, *Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15451-5.
92. Greer, A., et al., *Site-Specific Neutrophil Migration and CXCL2 Expression in Periodontal Tissue*. *J Dent Res*, 2016. **95**(8): p. 946-52.
93. Eke, P.I., et al., *Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010*. *J Dent Res*, 2012. **91**(10): p. 914-20.
94. Darveau, R.P., *Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis*. *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(7): p. 481-90.
95. Socransky, S.S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque*. *J Clin Periodontol*, 1998. **25**(2): p. 134-44.
96. Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. *J Bacteriol*, 2010. **192**(19): p. 5002-17.
97. Kumar, P.S., et al., *New bacterial species associated with chronic periodontitis*. *J Dent Res*, 2003. **82**(5): p. 338-44.
98. Ximenez-Fyvie, L.A., A.D. Haffajee, and S.S. Socransky, *Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis*. *J Clin Periodontol*, 2000. **27**(9): p. 648-57.
99. Lamont, R.J. and G. Hajishengallis, *Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease*. *Trends Mol Med*, 2015. **21**(3): p. 172-83.

100. Hajishengallis, G. and R.J. Lamont, *Dancing with the Stars: How Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts*. Trends Microbiol, 2016. **24**(6): p. 477-489.
101. Miralda, I., S.M. Uriarte, and K.R. McLeish, *Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 217.
102. Hallett, M.B. and D. Lloyds, *Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'*. Immunol Today, 1995. **16**(6): p. 264-8.
103. Swain, S.D., T.T. Rohn, and M.T. Quinn, *Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(1): p. 69-83.
104. Aboodi, G.M., M.B. Goldberg, and M. Glogauer, *Refractory periodontitis population characterized by a hyperactive oral neutrophil phenotype*. J Periodontol, 2011. **82**(5): p. 726-33.
105. Lakschevitz, F.S., G.M. Aboodi, and M. Glogauer, *Oral neutrophil transcriptome changes result in a pro-survival phenotype in periodontal diseases*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68983.
106. Petersen, P.E. and H. Ogawa, *The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control*. Periodontol 2000, 2012. **60**(1): p. 15-39.
107. Rosier, B.T., et al., *Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet?* Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 92.
108. Garcia-Garcia, E., E. Uribe-Querol, and C. Rosales, *A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry*. J Vis Exp, 2013(74).
109. Aleman, O.R., et al., *Differential Use of Human Neutrophil Fcγ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 2908034.
110. Rosales, C., *Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?* Front Physiol, 2018. **9**: p. 113.
111. Sheppard, F.R., et al., *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(5): p. 1025-42.
112. Matthews, J.B., et al., *Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis*. Clin Exp Immunol, 2007. **147**(2): p. 255-64.
113. Ling, M.R., I.L. Chapple, and J.B. Matthews, *Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis*. Innate Immun, 2015. **21**(7): p. 714-25.
114. Sengelov, H., et al., *Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 4157-65.
115. Murphy, M.P., et al., *Unraveling the biological roles of reactive oxygen species*. Cell Metab, 2011. **13**(4): p. 361-366.