



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

TESIS DOCTORAL

***TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN
MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN
CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES***

Tesis doctoral presentado por:

SARMAD MUAYAD RASHID ALBAKRI

Dirigida por:

PROF.D. FRANCISCO LUIS MESA AGUADO

PROF.D. ANTONIO MAGÁN FERNÁNDEZ

Granada, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Sarmad Muayad Rashid Albakri
ISBN: 978-84-1195-358-0
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92812>



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



FACULTAD
DE ODONTOLÓGIA

Granada, 1 de abril de 2024.

De acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, los abajo firmantes certifican:

Que el licenciado en Odontología Sarmad Muayad Rashid Al-Bakri ha desarrollado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulado: **“TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES”** en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del Título de Doctor, siempre que así lo considere la comisión que designe la Universidad de Granada.

Dr. Francisco Luis Mesa Aguado.

Catedrático De Universidad

Departamento de Estomatología. Universidad de Granada.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



FACULTAD
DE ODONTOLÓGIA

Granada, 1 de abril de 2024.

De acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, los abajo firmantes certifican:

Que el licenciado en Odontología Sarmad Muayad Rashid Al-Bakri ha desarrollado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulado: **“TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES”** en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del Título de Doctor, siempre que así lo considere la comisión que designe la Universidad de Granada.

Profesor Ayudante Doctor

Departamento de Estomatología. Universidad de Granada.

“La salud es una bendición escondida, si se encuentra, se olvida, y si se pierde, se menciona. La salud es una bendición por la que no se puede dar gracias”

Proverbio oriental

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido aceptados para su publicación como artículo científico con las siguientes referencias:

- Magán-Fernández A, Rasheed Al-Bakri SM, O'Valle F, Benavides-Reyes C, Abadía-Molina F, Mesa F. Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. *Cells*. 2020 Jun 19;9(6):1494. doi: 10.3390/cells9061494. PMID: 32575367; PMCID: PMC7349145.

Indicios de Calidad: Q2, 53/195, perfil cell biology.

- Al-Bakri SMR, Magan-Fernandez A, Galindo-Moreno P, et al. Detection and comparison of neutrophil extracellular traps in tissue samples of peri-implantitis, periodontitis, and healthy patients: A pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2024; 1-11. doi:10.1111/cid.13325.

Indicios de Calidad: Q1, 22/191, perfil, Dentistry, oral surgery and medicine.

Y como comunicación al II CONGRESO DE INVESTIGACIÓN PTS Con la comunicación en formato (Póster) titulada: los NETs en periimplantitis, facultad de medicina, Universidad de Granada, 2022.

Este proyecto de tesis ha sido financiado por los grupos de investigación:

- Periodoncia e Implantes, CTS 583.
- Biología Oral y Regeneración, CTS 1028.

AGRADECIMIENTOS

Al tutor de esta tesis doctoral, Dr. Francisco Luis Mesa Aguado, por comenzar este proyecto cuando no teníamos tiempo ni fuerzas para cumplir este sueño y por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a esta facultad.

Al director de esta tesis doctoral, Dr. Antonio Magán Fernández por coger las riendas de este proyecto cuando andaba perdido, darle forma y empujarme para poder llegar a la meta.

Gracias Antonio.

Al Dr. Francisco O 'Valle Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología y por el material facilitado y las sugerencias recibidas.

Al Dr. Pablo Galindo Moreno por su ayuda en recolectar las muestras.

A Natividad Martín Morales, que vivió mis retos profesionales como si fueran propios y por su ayuda y consejos desinteresados hacia un extraño. Gracias.

A mis pacientes, que con respeto y paciencia han acudido a la investigación por amistad, respeto o gratitud hacia nuestra investigación.

D. Sarmad muayad rashid albakri

2024

A mis hermanos, Sudad y Dania por darle sentido a la vida

A mi padre Muayad, por su ejemplo de lucha

A mi madre Ibtisam, por compartir este reto conmigo

D. Sarmad muayad rashid albakri

2024

TESIS DOCTORAL

**TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN
MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON
MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES**

ÍNDICE

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Leucocitos polimorfonucleares (PMN).....	1
1.1.1	Descripción y caracterización de PMN maduros.....	1
1.1.2	Activación de PMN	2
1.1.3	Efecto antimicrobiano de PMN	3
1.2	Trampas extracelulares de PMN (NET).....	7
1.2.1	Aspectos generales.	7
1.2.2	Historia de la formación de NET.....	7
1.2.3	Estructura y composición de NET.....	9
1.2.4	Procedimientos de laboratorio para identificar las NET	10
1.2.5	Estímulos involucrados en la formación de NET	11
1.2.6	Función de las NET	13
1.2.7	Efectos microbicidas de las NET	13
1.2.8	Factores de virulencia microbiana utilizados para evitar los efectos NET.....	15
1.2.9	NET degradación y eliminación.....	16
1.2.10	NET en las enfermedades sistémicas.....	17
1.3	Periimplantitis	18
1.3.1	Definición	18
1.3.2	Etiología y prevalencia de la periimplantitis.....	18
1.3.3	Factores de riesgo para periimplantitis	19
1.4	Periodontitis.	21
1.4.1	Definición	21
1.4.2	Etiología, prevalencia y Factores de riesgo de la periodontitis	21
1.4.3	clasificación de periodontitis.....	21
1.4.4	Relación de la Periodontitis con enfermedades sistémicas	22
1.4.5	Papel de los NET en Periodontitis	22
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	25
2.1	JUSTIFICACIÓN.....	25
2.2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.1	DISEÑO Y SUJETOS DE ESTUDIO.....	29
3.2	Criterios de inclusión y exclusión.....	30
3.3	DESCRIPCIÓN DE VARIABLES	32

3.3.1	Variables sociodemográficas.....	32
3.3.2	Variables relacionadas con los implantes dentales	32
3.3.3	Variables clínicas periodontales y periimplantarias.....	32
3.4	Análisis histopatológico	33
3.4.1	Procedimiento de tinción con Rojo Picrosirius para muestras incluidas en parafina	34
3.4.2	Procedimiento de tinción con Pentacrómico de Movat para muestras incluidas en parafina	35
3.4.3	Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina	35
3.4.4	Estudio de microscopía electrónica de transmisión (TEM)	37
3.4.5	Procedimiento de Inmunofluorescencia (IF) para muestras congeladas	37
3.4.6	Cuantificación y análisis digital de imagen de los resultados.....	39
3.5	Tratamiento estadístico	40
4	RESULTADOS	43
5	DISCUSIÓN	53
6	CONCLUSIONES.....	61
7	BIBLIOGRAFÍA.....	64
8	ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

figura 1 : Reclutamiento de PMN en el sitio de inflamación y mecanismos de eliminación de patógenos. (Matthieu Ribon,2015).....	3
figura 2 Fagocitosis del PMN. (Matthieu Ribon,2015).....	6
figura 3 Imágenes de inmunofluorescencia (IF) de microscopía confocal. Expresión de H3 (mostrado en rojo), MPO (mostrado en verde). Formación de NETs en casos de periimplantitis.....	8
figura 4 Mecanismos involucrados en el lanzamiento de NET. Centrarse en los mecanismos clásicos: NET formó la cromatina nuclear. (Matthieu Ribon,2015).....	12
figura 5 Producción inducida por bacterias de NETs. Los neutrófilos se trataron con Pseudomonas fluorescens (a), Vibrio harveyi (B) y Edwardsiella tarda (c), y las células se observaron con SEM. Las flechas indican bacterias atrapadas en NET (Mingli Zhao, 2017).....	14
figura 6: Ortopantomografía de periimplantitis severa. (Dr.Francisco Luis Mesa Aguado).....	18
figura 7. Imágenes de TEM. (A, B) Micrografía de una muestra de periimplantitis. (C, D) Micrografías de muestras de periodontitis.....	46
figura 8 Estudio morfológico e inmunocitoquímico. (A, B, C) Expresión de CD15 en peri.....	47
figura 9. Imágenes con tinción de rojo sirio. Tejido conectivo inferior entre periimplantitis, periodontitis y controles No hubo diferencia en los niveles de colágeno entre los grupos (aumento original x40).....	48
figura 10. Imágenes de IF de microscopía confocal. Expresión de H3 (mostrado en rojo), MPO (mostrado en verde) y tinción de ADN DAPI en los 3 grupos de estudio. Estructuras compatibles con formación de encontradas en casos de periimplantitis y periodontitis.....	50

ÍNDICE DE DIAGRAMA

Diagrama 1: Descripción de la muestra de estudio.....	30
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Los beneficios y las limitaciones de cada método de laboratorio utilizado en el contexto de la evaluación de NET.(Modificado de Stoimenou y cols.,2022).....	10
Tabla 2 resumen de los estudios que evalúan el papel de las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) en la periodontitis.....	23
Tabla 3 Características sociodemográficas de la población de estudio	43
Tabla 4: Características de los implantes dentales con peri-implantitis	44
Tabla 5. Variables clínicas de implantes y dientes en pacientes de periimplantitis y periodontitis incluidos en el estudio	45
Tabla 6. Expresiones de marcadores IHQ e IF de la encía periimplantaria y periodontal Biopsias	47

TESIS DOCTORAL

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AAP: la Academia Americana de Periodoncia

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMP: adenosine monophosphate

AR: artritis reumatoide

BPI: de inglés bactericidal/permeability-increasing protein

BSA: albúmina de suero bovino

C: complemento

CD: Cúmulo de diferenciación

CitH3: citrulinada histona H3

C°: centígrados

DAB: Diaminobenzidina

DFO: deferoxamina

DNase: deoxyribonuclease

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EFP: la Federación Europea de Periodoncia

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ETOH: etanol

FCR: receptors FC

fMLP: formil metionil leucil fenilalanina.

g: gramo

GAS: *Group A Streptococcus*

GCF: Fluido crevicular gingival

H: histona

H₂O: agua

H-E: hematoxilina-eosina

HMGB1: proteína (high mobility group box 1)

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular

IFNs: interferones

Ig A: inmunoglobulina

IgG: inmunoglobulina G

Il: interleuquina

LPS: lipopolisacárido

LT: leucotrienos

Min: minutos

mL: mililitros

Mm: milímetro

mM: milimolar

MMP; Mitogen-Activated Protein Kinases, o proteína quinasas

MPO: mieloperoxidasa

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ng/ml: nanogramos por mililitros

NE: elastasa de neutrófilos

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos

Nm: nanómetro

Nº: número

NOX: Óxidos de nitrógeno

NY: New York

O2: oxígeno molecular

OsO4: Osmium tetroxide

PAD: proteína arginina-deiminasa

PAF: factor activador de plaquetas

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PH: Potencial Hidrógeno

PMA; de inglés phorbol myristate acetate

PMN: polimorfo nucleado

PR3: proteinasa 3

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PS: profundidad de sondaje

ROS: reactivos de oxígeno

Rx: rayos x

SD: derivación estandar

SEM: microscopía electrónica de barrido

SEPA: SOCIEDAD ESPAÑOLA DE PERIODONCIA Y OSTEointegración

TBS: Tris Buffered Saline

TEM: Microscopio electrónico de transmisión

TLR: receptores de tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

μ : micro

USA: Estados Unidos de América

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

TESIS DOCTORAL

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Leucocitos polimorfonucleares (PMN)

Los leucocitos granulocitos, células inmunes con gránulos citoplasmáticos y núcleos multilobulados, están representados por los PMN (95%) eosinófilos (4%) y basófilos (1%). Los PMN representan del 50 al 70% de los leucocitos en la sangre y son las células más importantes del sistema inmune innato (Wang y cols.,2021). Los PMN son las primeras células en llegar al sitio de la inflamación (Ríos-López y cols.,2020) y es muy amplio el arsenal anti patógeno que muestran. Como células fagocíticas, a través del contenido antimicrobiano de sus gránulos, y la secreción de diferentes citocinas y quimiocinas que pueden reclutar otras células inmunes y activación de otros PMN. Desde el año 2004, se conoce un nuevo mecanismo defensivo, la formación de NET (trampas extracelulares de PMN) (Brinkmann y cols., 2004). Estas trampas son redes compuestas por cromatina y proteínas asociadas a ella, tales como proteasas lisosomiales, proteínas citoplasmáticas y nucleares (histonas). Estas trampas podrían definirse como un proceso programado de muerte celular de PMN que permite a estas células inmunes, eliminar patógenos y minimizar el daño a los tejidos sanos circundantes (Brinkmann y cols., 2004). El proceso consistiría en la formación por parte del PMN, de un entramado reticular proteico que englobaría a la bacteria, inmovilizándola, impidiendo su nutrición y desarrollo. Se han caracterizado las trampas extracelulares en diferentes enfermedades y en diversas regiones del cuerpo, no solo la oral. Dentro de la cavidad oral, ha sido en la periodontitis, donde más se ha documentado esta acción de los PMN (Magán-Fernández y cols., 2019), existiendo otras patologías orales, donde aún no se han caracterizado, como es el caso de la periimplantitis. No obstante, recientemente, se ha demostrado que estos mecanismos de defensa pueden llevar incluso a destruir el tejido sano en ciertas condiciones (Brinkmann y cols.,2007).

1.1.1 Descripción y caracterización de PMN maduros

PMN se diferencian de otros granulocitos mediante la tinción de May-Grünwald Giemsa. De hecho, se llaman PMN porque se tiñen con tintes neutros, mientras que los eosinófilos o basófilos se tiñen con eosina y tintes básicos, respectivamente. Los granulocitos se

INTRODUCCIÓN

caracterizan primero por un citoplasma "granular", contienen una panoplia heterogénea de gránulos y un núcleo plurilobulado. También se caracterizan por la heterogeneidad de su tamaño, el tamaño a menudo depende del grado de activación. Estas características morfológicas facilitan la identificación de los granulocitos entre los leucocitos en sangre, en análisis de citometría de flujo, sin tener que utilizar marcadores específicos (Shirakawa y cols.,2022).

1.1.2 Activación de PMN

A lo largo de su corta vida circulatoria, entre 6 y 7 h, los PMN sondean aleatoriamente el revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos en busca de signos de infección. Expresan en su superficie L-selectinas, integrinas que les permiten realizar esta tarea. Los primeros signos de infección son transmitidos por las células endoteliales como reacción a lipopolisacáridos (LPS) y formil metionil leucil fenilalanina (fMLP) de las bacterias. Las células endoteliales también se activan en respuesta a las citocinas inflamatorias secretadas en la etapa temprana de la infección por los macrófagos tisulares como interleuquina (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF). La activación de las células endoteliales se refleja en la expresión en su superficie de selectinas P y E. El encuentro de L-selectinas expresadas en PMN y P-selectinas y E-selectina expresadas en células endoteliales da como resultado una pobre adhesión de PMN a la pared del vaso (Figura 1). Los PMN se mueven de acuerdo con el gradiente de quimiocinas y otros mediadores emitidos por las células endoteliales activadas, factor activador de plaquetas (PAF), Leucotrieno B4 (LTB4) y IL-8. Estos mismos quimioatrayentes implican el compromiso de la integrina β 2 (cúmulos de diferenciación CD11a, b, c, CD18) del neutrófilo que conduce a una adhesión firme a la pared a través de ICAM (molécula de adhesión intercelular). La sobreexpresión rápida de las moléculas de adhesión se permite mediante la fusión de vesículas secretoras con la membrana de PMN. La adherencia firme es seguida inmediatamente por la transmigración a través del endotelio. Este mecanismo se facilitaría mediante el uso de gelatinasas de matriz o metaloproteinasas (MMP-8 y -9) contenidas en los gránulos terciarios. Una vez que se cruza la barrera endotelial, los PMN se encuentran en un medio inflamatorio. Continúan su migración hacia la fuente de infección gracias al gradiente de quimiocinas, pero también gracias al

INTRODUCCIÓN

quimioatrayente derivado de patógenos (fMLP). La activación se completa cuando los PMN alcanzan el "epicentro" del gradiente de quimiocinas. Luego, comienzan la fase final de destrucción del patógeno de acuerdo con cuatro fenómenos; fagocitosis, degranulación, liberación de NET y liberación de reactivos de oxígeno (ROS) o explosión oxidativa. La activación de PMN también da como resultado la secreción de quimiocinas por los propios PMN, particularmente IL-8, para mantener o amplificar la reacción inflamatoria (Witko y cols., 2000) (Amulic y cols., 2012) (Jiang y cols., 2021).

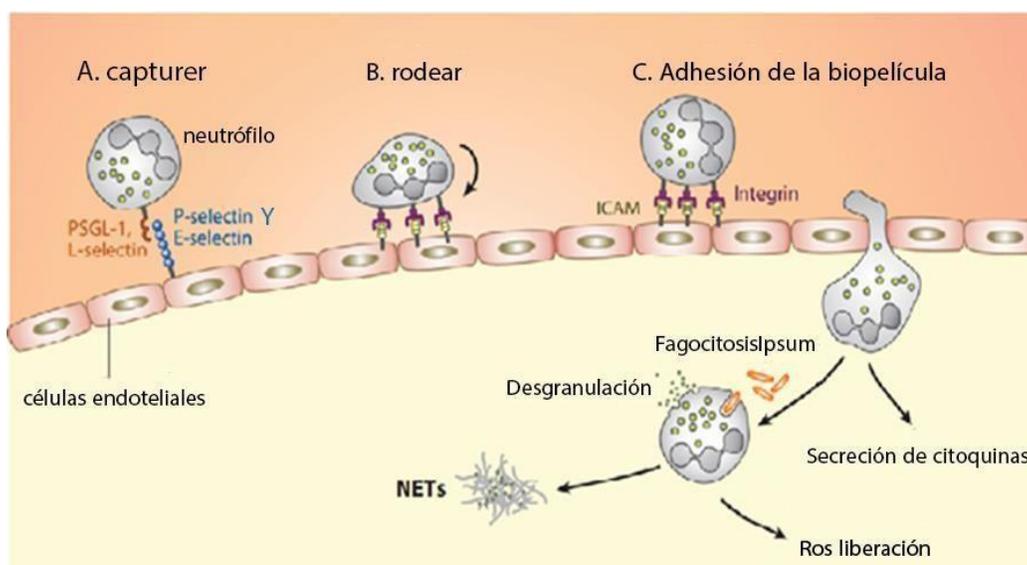


figura 1 : Reclutamiento de PMN en el sitio de inflamación y mecanismos de eliminación de patógenos. (Matthieu Ribon, 2015).

1.1.3 Efecto antimicrobiano de PMN

Para eliminar el patógeno invasivo, los PMN dependen de sus proteínas granulares y de la generación de ROS. Estudios previos sugieren que las proteínas granulares y la actividad oxidasa son necesarias para eliminar el microbio. Esto se ilustra a partir de uno de los estudios previos realizados en animales después de afectar sus ROS o proteínas de PMN (PMN elastasa), donde las nuevas cepas de ratones eran más susceptibles a la infección en comparación con animales normales (Papayanopoulos y cols., 2010).

INTRODUCCIÓN

I. Gránulos citoplasmáticos de PMN

Una de las características definitorias específicas del PMN es la presencia de gránulos en el citoplasma que tiene una amplia gama de moléculas antimicrobianas y su despliegue en el fagosoma o extracelularmente a través de vesículas secretoras. Hay cuatro tipos de gránulos caracterizados por su contenido y su formación durante la diferenciación de PMN. Los gránulos se forman al mismo tiempo que los PMN se diferencian. Durante mucho tiempo se pensó que la formación de gránulos se debía a la fusión de vesículas de la red trans-Golgi (Bainton y cols., 1971), pero hoy se sabe que ciertas proteínas de los gránulos no provienen de esas vesículas. (Sheshachalam y cols., 2014). Los mecanismos exactos todavía son en gran parte desconocidos.

Los gránulos contienen moléculas citotóxicas producidas por los PMN y protegen al PMN de sí mismas. Se distinguen los siguientes gránulos:

- Los gránulos azurofílicos, aparecen temprano durante la formación de PMN en la etapa de promielocitos (Fransson y cols., 2008). Se denominan gránulos primarios y contienen péptidos y proteínas antimicrobianas que se liberarán en la fagolisosoma, en particular la mieloperoxidasa (MPO). Estos gránulos son difíciles de movilizar y no se liberarán hasta el final del ciclo bactericida de los PMN.
- Los gránulos específicos o secundarios aparecen más tarde durante el desarrollo en la etapa de mielocitos (Borregaard y cols., 1997) y contienen principalmente lactoferrina, catelicidina (LL-37) y gelatinasas de bajo nivel, pero no peroxidasa (Bainton y cols., 1971). Estos gránulos, por otro lado, contienen ciertos componentes de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, como el flavocitocromo b558. Al fusionarse con la membrana celular, los gránulos específicos proporcionarán los elementos que faltan para la construcción de una NADPH oxidasa funcional. Estos gránulos son más fáciles de movilizar que los gránulos primarios, pero se liberan relativamente tarde en el proceso citotóxico de los PMN. La liberación de estos gránulos representa el comienzo de la fase bactericida del neutrófilo activado.

INTRODUCCIÓN

- Los gránulos de gelatinasa (o terciaria) se sintetizan a partir de la etapa de metamielocitos. Contienen gelatinasas y otras metaloproteinasas útiles para granulocitos para facilitar su paso a través del endotelio. Estos gránulos son fácilmente movilizados e intervienen temprano en la fase bactericida.
- Hay un cuarto tipo de gránulos, las vesículas secretoras, muy fácilmente movilizadas, que se formaron al final de la diferenciación de PMN. Su función es facilitar la adhesión de PMN después de su cebado.

II. Fagocitosis

La fagocitosis es la internalización de microorganismos o partículas. Eso puede ser activado directamente por el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) o por el reconocimiento por receptores FC (FcR) de partículas de inmunoglobulinas G (IgG) opsonizadas o incluso por el sistema del complemento. La fusión de los gránulos con el fagosoma participa en su maduración (Figura 2). La fagocitosis se ve facilitada por la opsonización de patógenos por inmunoglobulinas (Ig) o proteínas complementarias que serán reconocidas por FcR y receptores de complemento (CR) respectivamente. Una vez internalizados, los patógenos son destruidos por los ROS derivados de la NADPH oxidasa y por las proteínas antimicrobianas contenidas en los gránulos que se fusionan con el fagosoma (Kennedy y cols., 2009).

INTRODUCCIÓN

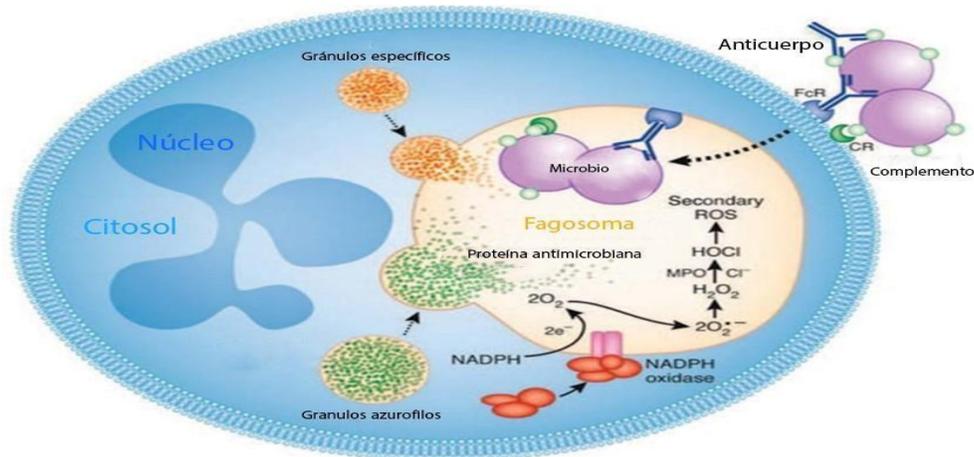


figura 2 Fagocitosis del PMN. (Matthieu Ribon,2015)

III. Degranulación

La liberación de granulos azurófilos y específicos en el medio extracelular provoca la formación de un ambiente inhóspito e incluso tóxico para los patógenos. Estos dos tipos de granulos contienen moléculas bactericidas como catelicidinas (en particular LL-37) y BPI (proteína que aumenta la permeabilidad bacteriana) pero también componentes de la NADPH oxidasa (Óxidos de nitrógeno NOX), que se asocia con el citosol y forman un complejo oxidativo que proporciona oxígeno a las especies reactivas (ROS) con un fuerte efecto bactericida, llamado explosión oxidativa. La degranulación también puede ocurrir en el fagosoma para eliminar el patógeno internalizado durante la fagocitosis (Ambruso y cols., 2004).

IV. trampas extracelulares de PMN (NET)

Los NETs se detallarán en el próximo capítulo con más detalles. Las redes son fibras de cromatina expulsadas por PMN (Brinkmann y cols., 2004). Las NET pueden limitar la propagación de bacterias y también destruirlas directamente a través de moléculas relacionadas con NET como las histonas, MPO y la elastasa de PMN (NE). (Ríos-López y cols.,2020) (Chamardani y cols.,2022).

INTRODUCCIÓN

1.2 Trampas extracelulares de PMN (NET)

1.2.1 Aspectos generales.

Los PMN son células clave del sistema inmune innato, debido a su papel particularmente en la defensa antiinfecciosa (Wang y cols.,2021). Cumplen esta función a través de mecanismos intracelulares y/ o extracelulares, como se describe en el apartado anterior. En ambos casos, los microorganismos son destruidos por la acción combinada de diferentes moléculas antimicrobianas almacenadas en los gránulos citoplasmáticos o generadas. En 2004, el equipo de Zychlinsky en Berlín, describió un mecanismo extracelular para eliminar patógenos compuesto por estructuras de fibras de cromatina descondensada que combinaban varias proteínas de diferentes compartimentos celulares, y eran liberadas del PMN una vez activado. Brinkmann y cols., en 2004, las denominó NET. Desde entonces, se ha realizado un gran esfuerzo para comprender los mecanismos celulares detrás de la producción de NET, así como su papel fisiológico en la defensa antiinfecciosa. Curiosamente, su participación en la fisiopatología de enfermedades tan variadas como enfermedades autoinmunes, cáncer, Enfermedad tromboembólica venosa o sepsis severa ha sido probada y abre un campo importante para muchas investigaciones (Brinkmann y cols., 2012) (Goldmann y cols., 2012) (Kaplan y cols., 2012) (Lu y cols., 2012) (Cooper y cols., 2013) (Saffarzadeh y cols., 2013) (Simon y cols., 2013) (Branzk y cols., 2014) (Chauhan y cols.,2021).

1.2.2 Historia de la formación de NET

Takei y sus colegas describieron por primera vez el fenómeno de la formación NET en 1996 (Takei y cols., 1996). Ellos lo describieron como una forma de muerte rápida por parte de los PMN, diferente de la necrosis y la apoptosis, después de la estimulación con PMA. Observaron que en este fenómeno no se generaba la división típica del ácido desoxirribonucleico ADN observada durante la apoptosis, pero la cantidad de ADN nuclear disminuía significativamente en los PMN tratados con PMA. Además, Takei y cols. también notaron el probable efecto de la NADPH oxidasa en este fenómeno, no obstante, no supieron explicarlo. Es en 2004, cuando Brinkmann identifica las fibras de ADN expulsadas por los PMN, y las denomina trampas extracelulares de PMN o NET (Brinkmann y cols., 2004).

INTRODUCCIÓN

Estos autores describieron con más detalle el fenómeno que Takei había visto varios años antes. Los NET son fibras de ADN asociadas con histonas (cromatina) y otras proteínas (Figura 3). Brinkmann y col. describieron los NET como trampas bactericidas o promotoras para la eliminación de bacterias extracelulares (Figura 5). Posteriormente, se han publicado otros muchos estímulos responsables de la producción de NET como PMA, LPS o IL. En 2007, otro grupo de investigadores Fuchs y cols. informó que la formación de NET se asoció con una nueva forma de muerte celular (la descrita por Takei) y la producción de NET se define como el último paso de un proceso de activación de PMN que puede o no puede provocar la muerte celular. Este proceso se llama NET formación en 2007 (Fuchs y cols., 2007). Más recientemente se ha descrito que la formación de NET no estaba necesariamente asociada con la muerte de PMN (Yousefi y cols., 2009) (Yipp y cols., 2013). Esta forma vital de liberación de NET se debería a la expulsión del ADN mitocondrial (Yousefi y cols., 2009) y no al ADN nuclear. Yipp y Kubes informan que los PMN siguen siendo viables y funcionales después de producir NET, y así, por ejemplo, los PMN todavía son capaces de inducir quimiotaxis después de formar NET (Yipp y cols., 2013).

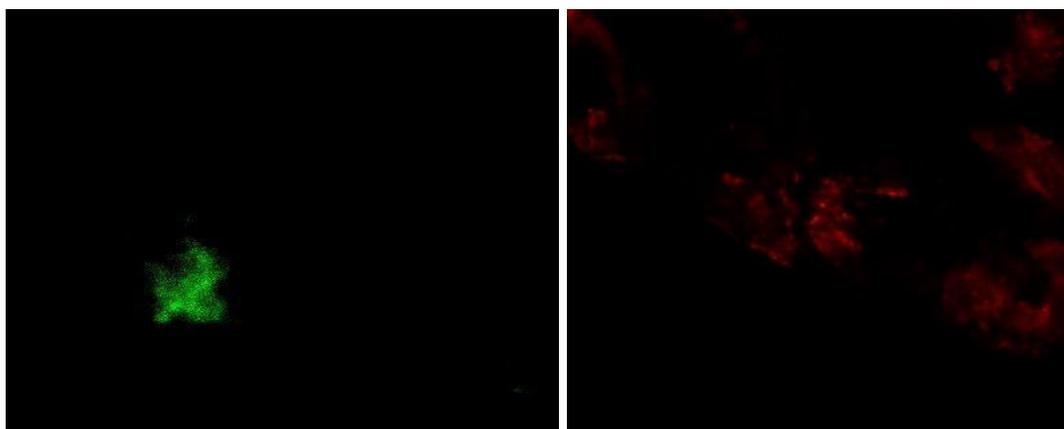


figura 3 Imágenes de inmunofluorescencia (IF) de microscopía confocal. Expresión de H3 (mostrado en rojo), MPO (mostrado en verde). Formación de NETs en casos de periimplantitis.

INTRODUCCIÓN

1.2.3 Estructura y composición de NET

Las NET son una malla de ADN que encierra histonas y proteínas antimicrobianas, pudiendo esta estructura ser degradada por la DNasa y no por proteasas (Brinkmann y cols., 2004). La cromatina está en forma de filamentos de aproximadamente 15 a 17 nm de diámetro. Estos filamentos pueden enrollarse para formar cables que alcanzan hasta 100 nm de diámetro. La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite visualizar estructuras globulares de aproximadamente 50 nm de diámetro (Brinkmann y cols., 2007). Uno de los estudios previos, realizado por Urban y cols. mostró que la cromatina de NET está cubierta con proteínas derivadas de diferentes compartimentos del neutrófilo. En su estudio se identificaron al menos 30 proteínas diferentes en las NET. Las histonas (H2A, H2B, H3 y H4) son las proteínas más abundantes y representan el 70% del total de proteínas. Durante la formación de las NET, las histonas se someten a modificaciones postranscripcionales, como la proteólisis y la citrulinación, lo que da como resultado una reducción de peso de 2 a 5 kilodalton kDa (Fuchs y cols., 2007) (Urban y cols., 2009).

Además de las histonas, los NET expresan proteínas nucleares, granulares, citoplasmáticas y de membrana. (Urban y cols., 2009). La mayoría de las proteínas granulares asociadas NET provienen de granulaciones azurofílicas. NE es la proteína más importante y abundante que corresponde a aproximadamente el 5% de las proteínas totales de las NET. También están presentes PR3, defensinas, deferoxamina DFO, azurocidina y lisozima. La calprotectina, o proteína de unión al calcio S100 es la proteína NET citoplasmática más abundante que corresponde a aproximadamente el 5% del total. Las proteínas del citoesqueleto y el orgánulo también están presentes en las redes, pero en cantidades muy pequeñas. Finalmente, las proteínas de membrana como los componentes de Nox2 y la integrina β 2 CD11b / CD18 también se pueden asociar con NET. La mayoría de estos componentes son proteínas altamente catiónicas, cargadas que pueden interactuar estrechamente con el ADN. La composición de proteínas de los NET puede variar según el estado de activación o el cebado del PMN. Por ejemplo, en presencia de interferones IFN α los NET expresan una cantidad significativa de LL37 y HMGB1 (high mobility group box 1) (García y cols., 2011) (Lande y cols., 2011). Las moléculas asociadas con los NET no solo tienen un papel antimicrobiano sino también inflamatorio, especialmente en las enfermedades autoinmunes. (Kahlenberg y cols., 2013).

INTRODUCCIÓN

1.2.4 Procedimientos de laboratorio para identificar las NET

la investigación científica requiere herramientas confiables y eficientes para la identificación de NET, pero no existe un método estándar de para la evaluación de NET. Se debe utilizar una combinación de diferentes técnicas para evitar posibles erróneas de los resultados. Los beneficios y las limitaciones de cada método lo podemos ver en la siguiente tabla (modificado de Stoimenou y cols.,2022).

Técnicas	Beneficios	Limitaciones	Marcadores	Referencias
Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	Simplicidad, especificidad, rentabilidad, objetivo y cuantitativo	Estandarización de resultados y diferencias entre NET in vivo e in vitro	MPO, CitH3, NE	Thålin y cols., 2017; Masuda y cols., 2017 Kasprzycka y cols., 2019
IF	cuantificación de NET con métodos basados en software y detecta NET in vitro, ex vivo e in situ	lenta, limitada, no disponible para la detección rápida de muchas células o muestras, dependiente del observador y con mucha precaución en la preparación de muestras	MPO, CitH3, NE,	Brinkmann y cols., 2004, Von Köckritz-Blickwede y cols., 2010, Brinkmany cols., 2012, Coelho y cols., 2015, De Buhr y cols., 2016, Lv y cols., 2020
TEM	mecanismos de muerte celular y detecta NET in vitro e in situ	Sesgado basado en el campo de visión y sin distinción confiable entre NET y fibrina por SEM	-----	De Buhr y cols., 2016, Lv y cols., 2020
Imágenes en vivo	examen minucioso de estructuras y distinción de NET	Equipo complejo y costoso	Sytox Green, (NE)	Gupta y cols., 2018
citometría de flujo	Cualitativo, cuantitativo y objetivo, detecta Las células pre-NETóticas, son rápidas y clasifican entre poblaciones celulares y tiene la posibilidad de aplicaciones directas en muestras de sangre.	Precaución extensiva con la preparación de la muestra; detecta solo células pre-NETóticas y es incapaz de detectar NET/remanentes liberados	Sytox Green, Cit H3, MPO	Gavillet y cols., 2015, Masuda y cols., 2017, Kasprzyca y cols.,2019
Western blot	semicuantitativo, especificidad y sensibilidad	Protocolo de varios pasos y optimiza la concentración del anticuerpo primario	H2A/H2B, CitH3. PAD4	Lv y cols., 2020

Tabla 1: Los beneficios y las limitaciones de cada método de laboratorio utilizado en el contexto de la evaluación de NET (Modificado de Stoimenou y cols.,2022).

INTRODUCCIÓN

1.2.5 Estímulos involucrados en la formación de NET

Se ha revelado que muchos estímulos inducen la formación de NET como virus, hongos, parásitos, componentes derivados del huésped, como las citocinas y las plaquetas activadas. Se han identificado tres tipos de formaciones de NET.

A. La forma clásica que se define como una muerte celular programada distinta de la necrosis y la apoptosis caracterizada por la interrupción de la membrana nuclear que dura de 2 a 4 h, lo que les da a los PMN la capacidad de combatir los patógenos más allá de su vida útil. La formación NET comienza con el reconocimiento de varios estímulos (Bacterias, hongos, virus) a través de receptores de PMN (como los receptores tipo Toll-like (TLR, receptores de IgG-Fc y receptores de citoquinas) (Fuchs y cols.,2007). A continuación, tiene lugar la movilización de los iones de calcio almacenados en el retículo endoplásmico, cruciales también para la formación NET. El calcio es necesario para la citrulinación de las histonas y para la activación de proteína arginina-deiminasa 4 PAD4 y la liberación de ROS (Gupta y cols.,2014). La desaminación de las histonas por PAD4 es un evento importante en la descondensación de la cromatina y la liberación de NET. Las moléculas ROS, realizan una parte esencial en la descomposición de la membrana nuclear. NE y DFO están involucrados en la descondensación adicional de la cromatina nuclear (Papayannopoulos y cols.,2010). Además, NE y MPO se desprenden de los gránulos azurofílicos y luego se traslocan al núcleo. Posteriormente, la cromatina nuclear se vierte en el espacio extracelular. La extrusión de NET con la muerte celular predispone al daño de los tejidos periodontales a través de un fenómeno autoinmune (Cooper y cols.,2013). Sin embargo, en 2012, Pilszczek y cols. Demuestran en infección por *Staphylococcus aureus*, que, tras la formación de NET, el PMN sigue siendo vital, con su función fagocítica y otras intactas.

B. Formación de NET que implica el uso de vesículas que transportan la cromatina sin liberación extracelular de ADN (Pilszczek y cols.,2010). Este fenómeno es muy rápido y tiene lugar entre 5 y 60 minutos después de la estimulación y no involucra la NADPH oxidasa. Esta segunda forma de NET denominada como formación vital de NET, los PMN crearon NET sin descomposición de la membrana plasmática o nuclear (Bonaventura y cols.,2018).

INTRODUCCIÓN

C. La tercera forma de formación de NET es conocida como formación de NET mitocondrial, en ella, se libera ADN mitocondrial en lugar de ADN nuclear y no está relacionado con la muerte celular, sino que depende de la formación de ROS (Yousefi y cols.,2009). Esta formación de NET mitocondrial se identifica en PMN en 15 minutos cuando se estimula con C5a o LPS. Hay autores que no están de acuerdo con esta modalidad de NET, como Brinkmann y cols., quienes afirman que la formación de NET conduce inexorablemente a la muerte del PMN (Brinkmann y cols.,2007). Todavía no se conocen todos los mecanismos que dan como resultado la formación de NET por la liberación de ADN mitocondrial o por células viables.

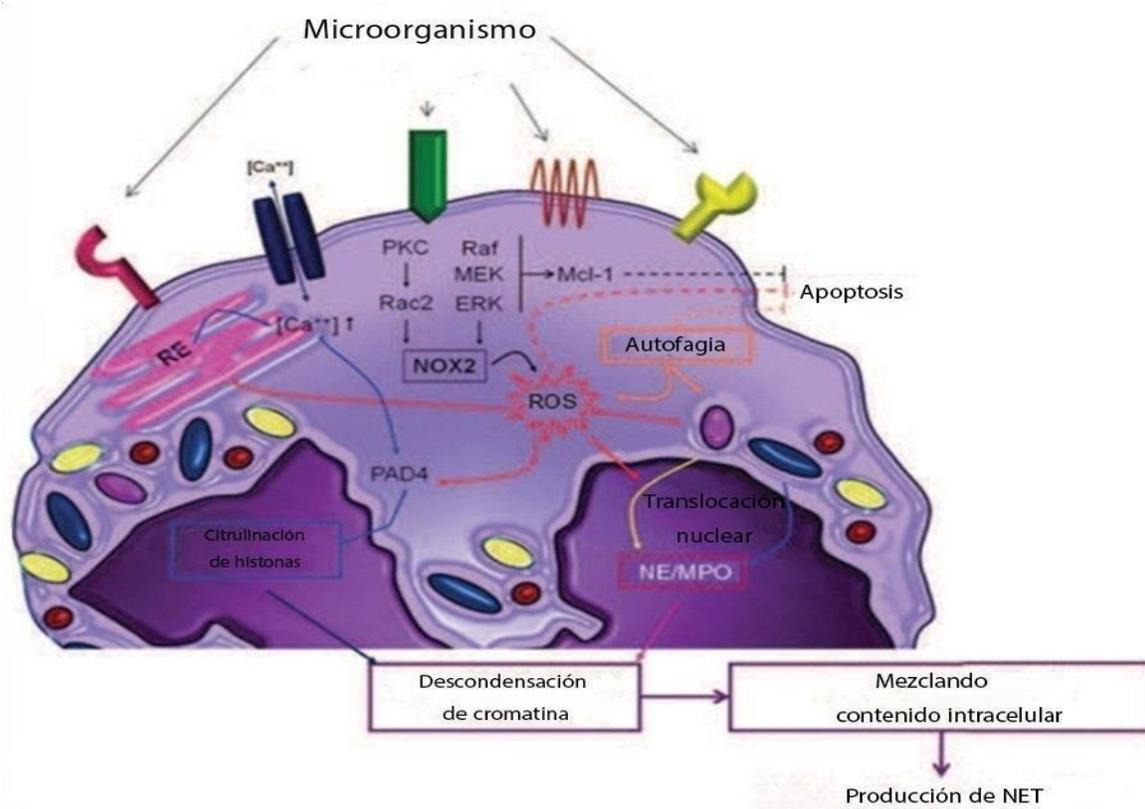


figura 4 Mecanismos involucrados en el lanzamiento de NET. Centrarse en los mecanismos clásicos: NET formó la cromatina nuclear. (Matthieu Ribon,2015).

INTRODUCCIÓN

1.2.6 Función de las NET

La función primaria o fisiológica de NET es la eliminación de microorganismos como *S. aureus* o *S. typhimurium* entre otros, pero también el virus VIH1 y ciertos hongos (Saitoh y cols., 2012) (Wang y cols., 2021). Según Branzk, la capacitación de NET se reservaría para la eliminación de grandes patógenos (Branzk y cols., 2014). Los NET pueden atrapar patógenos y evitar su propagación, pero también gracias a las proteasas presentes en la superficie de los NET, destruirían dichos patógenos. Sin embargo, el efecto antibiótico no solo se debe a la presencia de proteasas en NET, sino que el ADN (Halverson y cols., 2015) y la cromatina (Brinkmann y cols., 2012) también tienen un papel antimicrobiano. NET también tiene efectos secundarios. Se informan más y más efectos nocivos de NET. El LL-37, asociado con NET, tiene un papel proinflamatorio (Kahlenberg y cols., 2013). Entre otras cosas, LL-37 se une a los ácidos nucleicos y facilitaría la internalización de los NET y su encuentro con TLR7 y 9 que conducen a la producción de IFN tipo I (Lande y cols., 2011) (García y cols., 2011).

1.2.7 Efectos microbicidas de las NET

Los microorganismos son los estímulos más poderosos para activar la liberación de NET. A cambio, los NET representan una herramienta importante de inmunidad innata para ayudar en la eliminación de estos agentes infecciosos (Abi Abdallah y cols., 2012) (Arazna y cols., 2013) (Simon y cols., 2013) (Branzk y cols., 2014). Probablemente el efecto microbicida de los NET es el resultado de la combinación de muchos efectos de NET. Los NET pueden atrapar microorganismos (Figura 5) y retrasar su propagación desde el sitio inicial de infección (Brinkmann y cols., 2004). Los mecanismos de participación molecular en este enlace aún no se comprenden totalmente, pero es posible que las interacciones electrostáticas entre los componentes catiónicos de los NET y la superficie aniónica del patógeno, ayude a realizar este mecanismo de interacción (Brinkmann y cols., 2007). NET también pueden inactivar los factores de virulencia de microorganismos patógenos, cuya función es modificar y destruir las células del huésped. Por ejemplo, NET escinde los factores de virulencia de *Shigella*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* y *flexneri*

INTRODUCCIÓN

(Weinrauch y cols., 2002) (Brinkmann y cols., 2004). Finalmente, la actividad antimicrobiana de los NET depende de la estructura de los NET, ya que proporcionan una alta concentración local de proteínas con actividad antiinfecciosa en la proximidad directa del patógeno atrapado (Brinkmann y cols., 2004). Estas proteasas proteicas incluyen enzimas tales como péptidos antimicrobianos (BPI y defensinas, por ejemplo). Las histonas, proteínas más abundantes de las redes, poseen también una gran capacidad para matar microorganismos (Li y cols., 2007).

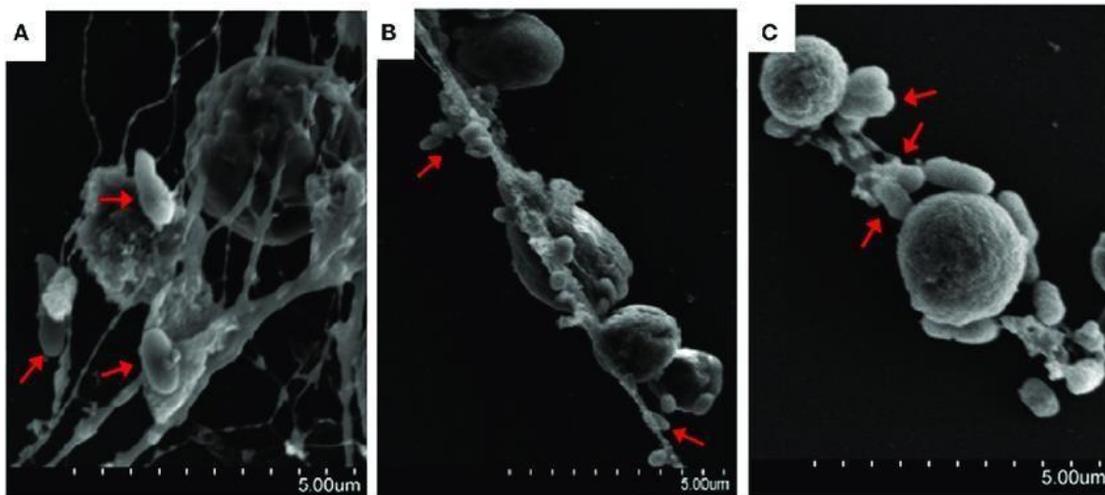


figura 5 Producción inducida por bacterias de NETs. Los neutrófilos se trataron con Pseudomonas fluorescens (a), Vibrio harveyi (B) y Edwardsiella tarda (c), y las células se observaron con SEM. Las flechas indican bacterias atrapadas en NET (Mingli Zhao, 2017).

Desde 2004, muchos estudios han destacado la capacidad de los NET para participar en la destrucción de los agentes infecciosos, como bacterias, parásitos, hongos y, más recientemente, virus. Sin embargo, hay estrategias para escapar de la acción microbicida de NET desarrolladas por estos agentes infecciosos. Se comenta a continuación.

INTRODUCCIÓN

1.2.8 Factores de virulencia microbiana utilizados para evitar los efectos NET

La identificación de estrategias para escapar de las NET en varios microorganismos refleja la coexistencia de PMN y agentes infecciosos a través de la evolución, (Arazna y cols., 2013). Estas estrategias se mencionan a continuación:

I. Secreción de DNasas

Algunas bacterias Gram positivas, producen DNasas y otras nucleasas extracelulares para destruir la columna vertebral del ADN de las NET. Se demostraron DNasas en *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis* (Berends y cols., 2010) (Beiter y cols., 2006) (Palmer y cols., 2012) (Vitkov y cols., 2009). *Streptococcus pneumoniae* expresa en su superficie la nucleasa EndA que, en un modelo murino de neumonía, le permite dismantelar la red de NET y migrar a la parte superior tracto respiratorio y luego a la circulación (Beiter y cols., 2006). El papel de estas DNasas extracelulares se demostró in vivo e in vitro al aumentar significativamente la virulencia de las bacterias después de su inhibición por la actina G (Buchanan y cols., 2006) (Sumbly y cols., 2005).

II. Formación de una cápsula bacteriana

La formación de una cápsula bacteriana es otra estrategia para escapar de la acción de los componentes bactericidas de los NET como se describe en algunos serotipos de *S. pneumoniae*. La membrana externa de esta cápsula estaría cargada positivamente reduciendo así la interacción de las bacterias con los péptidos antimicrobianos cargados positivamente unidos a los NET por repulsión electrostática. (Wartha y cols., 2007).

III. Modificaciones de la carga superficial bacteriana

Las modificaciones de la carga de la superficie de las bacterias también pueden mejorar la supervivencia bacteriana en el huésped, al cambiar su carga superficial aniónica negativa habitual (Ernst y cols., 1999). Se encontró que *S. flexneri* utiliza su superficie cargada negativamente para unirse a los AMP derivados de la degranulación de PMN. Esta adherencia bacteriana mejorada resultó en una hiperinvasión a las células epiteliales y los

INTRODUCCIÓN

autores postularon que *S. flexneri* confía en su adherencia a los AMP para diseminarse en las células epiteliales y escapar de la muerte de PMN. Sin embargo, esto parece ser contraintuitivo, porque, aunque las bacterias pueden recibir capacidades mejoradas de invasión que les permiten propagarse a los tejidos epiteliales, pueden ser susceptibles a la muerte por AMP (Eilers y cols., 2010). *S. pyogenes* Group A (GAS) también usa DNasas y formación de cápsulas para escapar de las NET. El GAS expresa en su superficie la proteína M, un factor de virulencia esencial en su patogénesis que tiene capacidad de inducir la producción de filamentos de ADN por PMN y mastocitos, sin embargo, esta proteína confiere al mismo tiempo resistencia a los efectos microbicidas de la catelicidina LL37 (Lauth y cols., 2009). GAS también fabrica una cápsula hecha de ácido hialurónico que no impide la captura de la bacteria por los NET pero que le permite sobrevivir al promover su resistencia a la acción antimicrobiana de LL-37 (Cole y cols., 2010).

Finalmente, los microorganismos también pueden promover un ambiente adverso a la formación de NET, como se ha descrito para el VIH que activaría la producción de IL-10, citocina antiinflamatoria, e inhibiría la activación de PMN y, por lo tanto, la formación de NET (Saitoh y cols., 2012).

1.2.9 NET degradación y eliminación

Recientemente, muchas investigaciones han sido publicadas sobre la eliminación de NET. Se ha demostrado que la eliminación de NET es esencial para la homeostasis de los tejidos. Los procesos involucrados y el tiempo requerido para la eliminación de las NET no se conocen bien. En 2010 se informó que las NET producidos in vitro son estables durante más de 90 horas. Sin embargo, el tratamiento con NET en humanos da como resultado la degradación del ADN de NET extracelular. Los autores expresaron que fue la deoxyribonucleasa (DNAasa) es la responsable de la deconstrucción de los NET, (Hakim y cols., 2010). Se cree que la degradación de NET por DNasa 1 representa la etapa inicial en la eliminación de NET que luego son eliminadas por los macrófagos. Después del desmontaje, las histonas de ADN y NET se opsonizan por componente del complemento C1q que conduce a la fagocitosis de los desechos NET por los macrófagos. Los autores postularon que las trampas extracelulares de PMN se degradan en el macrófago (componente

INTRODUCCIÓN

del lisosoma). Sin embargo, las nucleasas específicas involucradas en este proceso siguen siendo difíciles de encontrar. La clave de este proceso es que el mecanismo de eliminación de NET es similar al de la apoptosis, por lo que los macrófagos parecen no flogísticos y no liberan citocinas proinflamatorias (Farrera y cols., 2013).

1.2.10 NET en las enfermedades sistémicas

Hay otros estímulos que desencadenan la formación de NET de forma patológica y perjudicial. Los NET promoverían la trombosis a través de histonas y ADN (Martinod y cols., 2014). Los NET, en combinación con las plaquetas, dañarían los vasos sanguíneos durante la sepsis, destruirían las células endoteliales y también causarían oclusiones vasculares (Clark y cols., 2007) (McDonald y cols., 2012). Por otro lado, se ha informado que los NET pueden promover la implantación de metástasis mediante la captación de células malignas circulantes (Cools y cols., 2013). También, las NET se han descrito como una fuente de autoantígenos en diversas enfermedades autoinmunes tales como vasculitis autoinmune, lupus, psoriasis y artritis reumatoide. Finalmente, NET demostró tener efectos adversos en la preeclampsia (Gupta y cols., 2005). Con respecto al aterosclerosis, Los NET se han detectado en pacientes con aterosclerosis y en modelos animales, y los NET están relacionados con diversas patogénias de la aterosclerosis. Los NET juegan un papel en todas las etapas de la aterosclerosis, desde la disfunción endotelial temprana hasta la ruptura de la placa y la trombosis ateroscleróticas (Carbone y cols., 2020).

INTRODUCCIÓN

1.3 Periimplantitis

1.3.1 Definición

La periimplantitis se define como una condición patológica asociada a placa con pérdida ósea alrededor del implante, con una profundidad de sondaje mayor o igual a 6 mm, más sangrado y / o supuración. La pérdida ósea debe ser objetivada por RX, y ser igual o superior a los 3mm apical a la parte más coronal intraósea del implante. (caton y cols.2018)

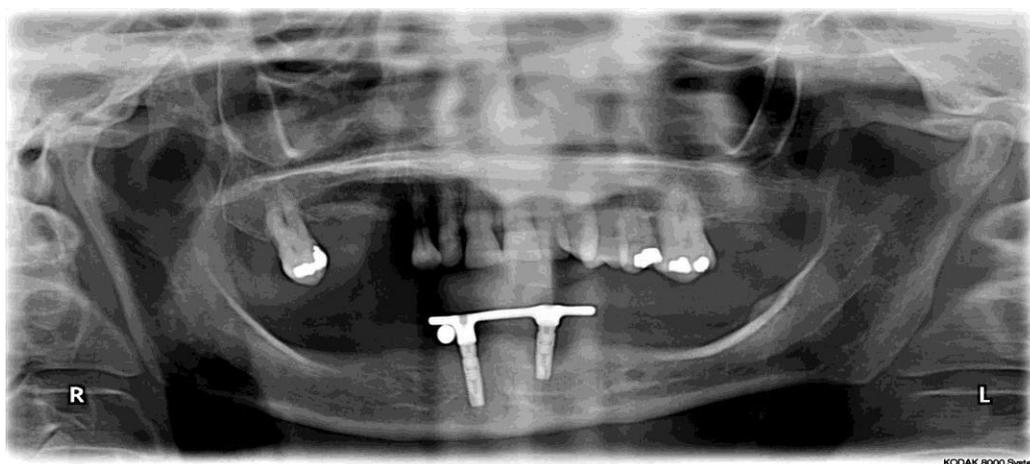


figura 6: Ortopantomografía de periimplantitis severa (Dr.Francisco Luis Mesa Aguado).

1.3.2 Etiología y prevalencia de la periimplantitis

La etiología de la periimplantitis es microbiana, aunque parece que cada vez hay más consenso entre los investigadores, que otros factores deben de estar presentes para que comience dicha condición. En este sentido, dos procesos patológicos distintos están en el origen de la pérdida de la osteointegración, la ruptura del equilibrio biomecánico y la ruptura del equilibrio huésped / parásito (infección). En España, Rodrigo D. y cols. en un estudio publicado en 2018, concluyen que la prevalencia de enfermedades periimplantarias en nuestros pacientes fue del 27% cuando hablamos de mucositis periimplantaria y del 24% para la periimplantitis. Esto supone que 1 de cada 4 pacientes va a desarrollar una periimplantitis. (Rodrigo y cols.,2018). Según Rakic y cols. en un estudio publicado en 2018, la prevalencia de periimplantitis en el mundo por implante se estima con cifras de 12,8%, y

INTRODUCCIÓN

de un 18,5% a nivel del paciente. (Rakic y cols.,2018)

1.3.3 Factores de riesgo para periimplantitis

Están documentado los siguientes factores de riesgo:

- Historia de periodontitis.

Antes de cualquier colocación de implante, todo paciente con diagnóstico de periodontitis debe tratarse para evitar la falla del implante en el futuro. Son numerosos los estudios previos (revisiones epidemiológicas y sistemáticas) que sugieren que la presencia previa de periodontitis aumenta el riesgo de periimplantitis (Renvert y cols., 2009) (Casado y cols., 2013) (Sgolastra y cols., 2013) (Saaby y cols., 2014) (Elemek y cols., 2014) (Renvert y cols., 2014).

- Diabetes no tratada.

La Diabetes se trata de una enfermedad sistémica que afecta la capacidad de curación-cicatrización de las heridas y aumenta la susceptibilidad del paciente a las infecciones y al fracaso de los implantes dentales (Fiorellini y cols., 2000). Un paciente con diabetes y periodontitis, al que se coloca implantes, tiene un riesgo de desarrollar una periimplantitis entre los 6 meses y cinco años, de casi 9 veces más que un paciente sin dichas patologías. (Ferreira y cols.,2006).

- Factores genéticos.

Las interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria. Si bien unos estudios han demostrado la asociación entre un polimorfismo genético de los genes IL-1 α e IL-1 β y la periimplantitis (Jansson y cols., 2005) (Laine y cols., 2006), otros, en cambio, no encuentran dicha relación (Heitz y cols., 2008). Rakic y cols. demuestran en otro estudio genético, que los polimorfismos de CD14 y TNF α estaban asociados con el desarrollo de periimplantitis. (Rakic y cols., 2014).

- Consumo de Tabaco.

Los estudios, demuestran que los pacientes que fuman más de 7 cigarrillos al día tienen

INTRODUCCIÓN

más probabilidad de desarrollar una periimplantitis. (Gruica y cols.,2004). (Feloutzis y cols., 2003) (Strietzel y cols.,2007). En este sentido, otros estudios, demuestra una asociación del consumo de tabaco con la mucositis, la pérdida ósea marginal y la periimplantitis (Roos y cols., 2006) (Fransson y cols. 2008). Además, la asociación de mala higiene bucal con tabaquismo ocasionaría una pérdida ósea periimplantaria 3 veces superior que los no fumadores con mala higiene bucal. (Sgolastra y cols., 2014).

- Higiene oral.

Desde casi los albores de la implantología, se demostró una fuerte asociación entre la mala higiene bucal y la pérdida ósea periimplantaria (Lindquist y cols.,1997). La higiene oral muy deficiente está fuertemente asociada con la presencia de periimplantitis (Ferreira y cols., 2006). Ausencia de mucosa queratinizada. Algunos estudios encontraron que la mucosa queratinizada se debe encontrar alrededor de los implantes. (Padial y cols., 2014) observan que la falta de tejido queratinizado alrededor de los implantes se asocia con la acumulación de placa, inflamación de los tejidos, recesión gingival y pérdida de hueso alveolar.

- Superficie del implante.

Los estudios previos in vivo indican que las características de la superficie de los implantes modificados pueden tener un papel en desarrollo de la periimplantitis, mientras que los estudios clínicos mostraron de que no existe una relación entre la periimplantitis y los distintos tipos de superficies de los implantes. (Andreas y cols.,2021).

- Exceso de cemento para fijar la prótesis al implante.

El estudio de Wilson (Wilson y cols., 2009) intenta vincular entre un exceso de cemento y el riesgo creciente de periimplantitis. Su estudio incluyó a 39 pacientes que mostraban signos clínicos y / o radiográficos de periimplantitis durante un período de 5 años. El autor describió que el exceso de cemento está relacionado con signos de periimplantitis en la mayoría de los casos (81%). Después de la eliminación del exceso de cemento, no se observaron signos clínicos de periimplantitis en el 74% de los implantes que se valoraron. Este estudio está en consonancia con las conclusiones de otros autores quienes consideran que el exceso de cemento juega el mismo papel que una ligadura cuando se desea provocar una periodontitis.

INTRODUCCIÓN

1.4 Periodontitis.

1.4.1 Definición

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de las encías. producida por una infección de una biopelícula disbiótica endógena y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de sostén del diente. En general, se manifiesta con empeoramiento de una gingivitis, y luego, si no se trata, con aflojamiento y pérdida de dientes (Modificada de Vitkov y cols.,2021).

1.4.2 Etiología, prevalencia y Factores de riesgo de la periodontitis

El principal agente causante de la enfermedad periodontal es la colonización bacteriana mixta en el tejido bucal (Lamont y cols.,2015). El microbiota oral es muy diverso y se notifican más de 1200 tipos diferentes de microorganismos. El desarrollo de la periodontitis se asocia con una comunidad microbiana subgingival desequilibrada enriquecida con especies como bacterias anaerobias gram negativas a las que se les ha denominado “complejo rojo” por su patogenicidad y virulencia: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* (Campos Fabri y cols.,2020).

Si bien hay otros factores que actúan como factores etiológicos secundarios que aceleran la propagación y el desarrollo de enfermedades periodontales como el consumo de tabaco, diabetes, mala higiene bucal (placa dental), estrés y factores genéticos como los polimorfismos genéticos para la IL-1, restauraciones sobresalientes. (Modificada de Lamont y cols.,2015).

Durante la última década (de 2011 a 2020), la prevalencia combinada estimada de periodontitis es de casi el 60 %, y su etapa grave afecta aproximadamente al 24 % de la población estudiada. Estos resultados muestran una prevalencia alarmantemente alta en comparación con las estimaciones de 1990 a 2010 (Trindade y cols.,2023)

1.4.3 clasificación de periodontitis

Los cambios más importantes se han producido con respecto a la clasificación de la periodontitis, en la que el sistema de estadificación y graduación de la enfermedad es similar

INTRODUCCIÓN

al sistema utilizado en oncología para clasificar los cánceres. La periodontitis ya no se divide en dos formas: crónica y agresiva; Como sugiere la evidencia, es esencialmente el mismo proceso de enfermedad con diferentes tasas de extensión, progresión y gravedad (Papapanou y cols., 2018). las etapas de la periodontitis, a saber, I, II, III y IV, se basaron en la gravedad y la complejidad del tratamiento. (Berglundh y cols.,2018). La extensión y distribución fueron distribución incisiva localizada, generalizada o molar, y los grados fueron A, B o C, que denotan la tasa de progresión, que fue lenta, moderada o rápida, respectivamente (Chitsazi y cols.,2021).

1.4.4 Relación de la Periodontitis con enfermedades sistémicas

En los últimos años ha habido un interés considerable en los posibles vínculos entre la enfermedad periodontal y las enfermedades sistémicas. (Lewis y cols.,2015). De hecho, la presencia de patógenos periodontales y sus subproductos metabólicos en la boca puede modular la respuesta inmune más allá de la cavidad oral, promoviendo así el desarrollo de condiciones sistémicas. (fiona y cols.,2019). Estas enfermedades incluyen enfermedades cardiovasculares, cáncer gastrointestinal y colorrectal, diabetes y resistencia a la insulina y enfermedad de Alzheimer, así como infecciones del tracto respiratorio y resultados adversos del embarazo. En un estudio publicado en 2022 por Mesa F y cols., mostraron que Los pacientes con periodontitis y disfunción eréctil, ajustados por edad y enfermedad cardiovascular, mostraron 3,7 veces más riesgo de sufrir eventos cardiovasculares adversos mayores tras un seguimiento medio de 4,2 años (Mesa F y cols.,2022).

1.4.5 Papel de los NET en Periodontitis

La implicación de los NETs en la patología periodontal ha sido estudiada en los últimos años. Resumimos los artículos más importantes hasta la fecha que han estudiado el papel de los NETs en la periodontitis en tabla 2.

INTRODUCCIÓN

Autores	Participantes	Tipos de muestras	Marcadores de NET	Resultados
Zhang y cols.,2020	27 periodontitis,17 gingivitis y 20 controles	Sangre periférica	TNFa, IL 8	La periodontitis mostró menor expresión de IL8 en comparación con los controles
Moonen y cols.,2020	1ra parte:38 periodontitis y 38 controles. 2ª parte: 91 periodontitis antes y después del tratamiento	Sangre periférica	SYTOX Green	No hay diferencias en la degradación NET entre sujetos sanos y periodontales a terapia aumentó la degradación de NET.
Magan Fernández y cols.,2019	6 periodontitis, Five gingivitis y 2 controls	Muestra gingival	CitH3 y MPO	Mayor H3 en gingivitis y mayor MPO en periodontitis
Levy y cols.,2019	3 localizado agresivo periodontitis y 3 controles	Sangre periférica	SYTOX Green	La formación de NET fue mayor en PMN expuesto a nupharidina
Kaneko y cols.,2018	40 artritis reumatoide y periodontitis,30 periodontitis y 43 controles	muestras de suero	MPO	Los NET aumentaron en el grupo de AR Y periodontitis
White y cols.,2016	Periodontitis crónica y controles. (40 pares)	Sangre periférica	SYTOX Green	La formación de NET disminuyó y la eliminación de NET fue restaurado después del tratamiento periodontal
Fine y cols.,2016	17 periodontitis crónica y 11 controles	Sangre	CitH3, MPO, CD18	periodontitis mostró altos niveles de NET formación en comparación con los controles
Hirschfeld y cols.,2015	14Gingivitis y 6 controles	placa supragingival Sangre periférica	CitH3, histona H1, CD-177, MPO, NE, Catepsina-G.	Se encontraron NET dentro de la biopelícula oral.
Vitkov y cols.,2010	26 periodontitis	Fluido crevicular gingival (GCF)	SEM, CitH3	El 78% de los PMN de las muestras mostró formación de NETs
Vitkov y cols.,2009	22 periodontitis crónica	(GCF) y Gingival biopsias	(TEM) y SEM: NE	Se encontraron NET en todas las muestras

Tabla 2 resumen de los estudios que evalúan el papel de las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) en la periodontitis.

INTRODUCCIÓN

Como hemos descrito en los apartados anteriores, la formación de NET depende en gran medida de la generación de ROS. En la periodontitis crónica, tiene lugar un aumento en la formación de ROS, la bolsa periodontal proporciona suficiente O₂ y con un PH neutro, proporciona un ambiente amigable para la formación de ROS. Otro mediador inflamatorio muy abundante en la periodontitis interferón alfa (IFN α) que a su vez es un mediador muy importante para estimular la formación de NET. En otro sentido, las bacterias periodontales producen DNAsa que reduce los niveles de NET y la colonización de patógenos podría aumentar en el tejido periodontal (Wang y cols.,2021). La destrucción de las NET por DNAsa, conduciría a la liberación de sus componentes antimicrobianos y esto provocaría un efecto nocivo en el tejido circundante.

Actualmente se acepta que la destrucción de hueso y la progresión de la periodontitis, dependen más de la naturaleza de la respuesta inflamatoria del paciente que del tipo de patógeno. Como sabemos, los PMN son las células inmunes principales y primeras que alcanzan el área infectada y participan en la respuesta inflamatoria. El papel de los PMN en esta respuesta inflamatoria periodontal podría ser paradójicamente contrapuesto. Con una hiporrespuesta, traducida en una disminución en la efectividad y/o cantidad de formación de NET, con una mayor capacidad patógena del microbiota gingival o una gran actividad con hiperrespuesta en formación de NET. Altos niveles de NET en el tejido periodontal podrían estimular la respuesta autoinmune, lo que provocaría un nivel elevado de atracción de PMN y más destrucción de los tejidos (Mayadas y cols., 2009). Esta hipótesis de NET hiperactiva en la periodontitis es respaldada por Vitkovy cols.

Estos autores, en 22 muestras de tejido gingival de pacientes con periodontitis, demuestran altos niveles de NET, y en un tercio de las muestras, la cantidad de NET se asoció con el número de patógenos atrapados (Vitkov y cols., 2009). Por lo tanto, las dos teorías de producción de NET hiper e hipoactiva pueden ser las responsables de la destrucción del tejido (Vitkov y cols.,2022).

TESIS DOCTORAL

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periimplantaria se define como un proceso inflamatorio que afecta a los tejidos que rodean a un implante dental y que ocasiona una pérdida del soporte óseo en el que se ha integrado y como consecuencia a la pérdida del implante dental. Etiológicamente es una enfermedad multifactorial que, si no es tratada precozmente, puede desencadenar el fracaso de la rehabilitación implantológica. Numerosos estudios científicos han sugerido que una gran variedad de NETs que encierra histonas y proteínas antimicrobianas, liberadas por los PMN al espacio extracelular aparecen en los tejidos inflamados de periodontitis, y por lo tanto la producción de NETs jugaría un papel importante en la etiología y severidad de la enfermedad periodontal. Por similitud fisiopatológica, en los últimos cinco años han sido publicados algunos estudios en los que se valoran los NETs como factores que pudieran indicar el desarrollo de la enfermedad periodontal y otras enfermedades sistémicas. En este sentido, de igual modo que la detección de un nivel elevado de NETs y sus proteínas antimicrobianas, y la identificación de una falta de equilibrio entre la producción y la eliminación de NETs se han relacionado con la presencia de enfermedad periodontal, la detección de estas proteínas en ausencia de enfermedad periodontal podría ser un indicativo de periimplantitis que nos permitiría realizar un diagnóstico precoz de la misma. Del mismo modo, debido a que la mieloperoxidasa (MPO) es la proteína más abundante en los PMN y sus NETs, su cuantificación puede ser de ayuda para el diagnóstico precoz de la actividad inflamatoria. Además, al ser la única peroxidasa que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso, es un potente agente oxidante que se ve siempre envuelto en los mecanismos de defensa contra agentes infecciosos. Son necesarios estudios en biopsias gingivales, para la detección precoz de estos marcadores inflamatorios y poder prevenir la ocurrencia de periimplantitis. Hasta la fecha, y hasta dónde llega nuestro conocimiento, no se ha caracterizado aún, la existencia de NET en muestras gingivales de periimplantitis.

2.2 OBJETIVOS

- El objetivo general fue estudiar la caracterización de las trampas de PMN en el tejido periimplantario.
- Estudiar las características de las trampas en pacientes con periimplnatitis y compararlas con las de pacientes con periodontitis y las de un grupo control por analizar los niveles de MPO e histonas.
- Estudiar si existe un gradiente biológico entre la intensidad de las trampas de PMN en el tejido periimplantario y la gravedad de la periimplantitis.

TESIS DOCTORAL

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO Y SUJETOS DE ESTUDIO

Hemos diseñado un estudio Observacional transversal analítico en un grupo de pacientes con periimplantitis, periodontitis y sanos. Los pacientes con implantes dentales diagnosticados de periimplantitis acudieron de forma consecutiva a una clínica dental privada en el área metropolitana de Granada (España) para una revisión de sus rehabilitaciones. Los pacientes diagnosticados de periodontitis, junto con los pacientes sanos sin implantes dentales y sin enfermedades, acudieron de forma consecutiva al centro de salud Almanjayar del Servicio Andaluz de Salud en el área de Granada (España) para consulta dental. Los pacientes con periimplantitis y periodontitis, fueron clasificados según la clasificación definido en el 2017 World Workshop (Chapple et al., 2018). La periimplantitis se define como una condición patológica asociada a placa con pérdida ósea alrededor del implante, con una profundidad de sondaje mayor o igual a 6 mm, más sangrado y / o supuración. La pérdida ósea debe ser objetivada por RX, y ser igual o superior a los 3mm apical a la parte más coronal intraósea del implante. (caton y cols.2018). La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de las encías. Producida por una infección de una biopelícula disbiótica endógena y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de sostén del diente con una profundidad de sondaje mayor o igual a 4 mm. (Modificada de Vitkov y cols.,2021).

El estudio fue realizado durante el período de tiempo comprendido entre enero de 2019 y junio de 2020. Todas las muestras de periimplantitis fueron recogidas entre la franja horaria de 18:00 h a 21:00 h. las muestras de periodontitis y sujetos sanos (control) fueron recogidas entre 10.00 a 12.00 h.

Cada paciente dio su aceptación verbal y escrita para participar en el estudio. A todos los pacientes se les informó que la participación en el estudio era voluntaria y que la decisión de no participar en él no afectaría a su atención odontológica dentro de la Clínica, y que en cualquier momento del estudio los pacientes podían revocar su consentimiento informado (Anexo 1).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue autorizado por el Comité de ética de investigación Biomédica de la Junta de Andalucía con el código de referencia interno 0337-N-20 (Anexo 2) y fue llevado a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki (Anexo 3).

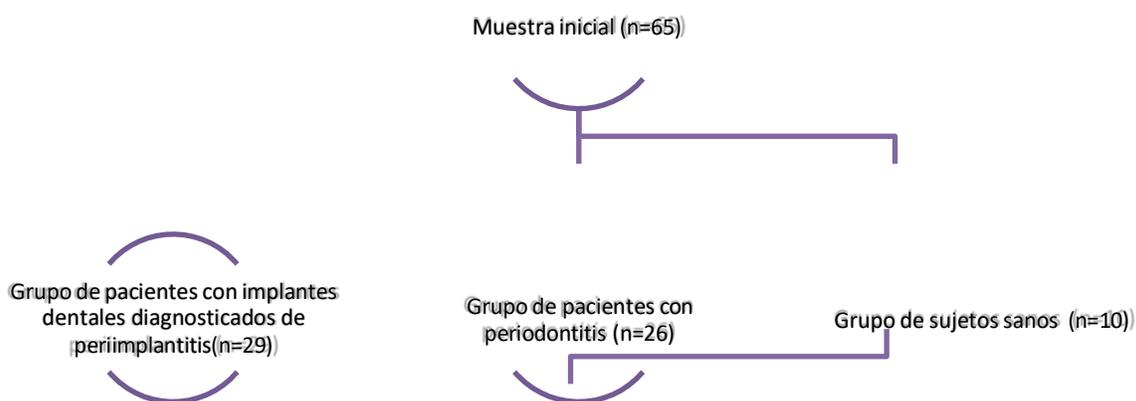


Diagrama 1: Descripción de la muestra de estudio.

3.2 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión para el grupo de pacientes con implantes dentales diagnosticados de periimplantitis:

- Paciente tratado con implantes dentales.
- 89 Pacientes mayores de 18 años.
- Presentar al menos un implante dental con periimplantitis diagnosticada clínica y radiográficamente siguiendo los criterios del Workshop conjunto de la Federación Europea de Periodoncia (EFP) y la Academia Americana de Periodoncia (AAP) de 2018: PS mayor o igual de 6 mm.
- Haber firmado el consentimiento informado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Criterios de inclusión para el grupo de pacientes diagnosticados con periodontitis

- Haber firmado el consentimiento informado
- ser diagnosticado de periodontitis según los criterios del Workshop conjunto de la Federación Europea de Periodoncia (EFP) y la Academia Americana de Periodoncia (AAP) de 2018. PS \geq 4 mm, sangrado al sondaje como factor indicador de la pérdida de tejido de soporte (comprobado radiográficamente) y de inflamación.
- Pacientes mayores de 18 años.

Criterios de inclusión para el grupo de sujetos sanos

- Pacientes mayores de 18 años.
- No ser portador de implantes dentales.
- No ser diagnosticado de enfermedad periodontal y otras enfermedades orales según los criterios del Workshop conjunto de la Federación Europea de Periodoncia (EFP) y la Academia Americana de Periodoncia (AAP) de 2018.
- Haber firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión para los tres grupos

- Pacientes menores de edad.
- la pérdida de los implantes por motivos distintos de periimplantitis como fracturas de corona de la prótesis o traumatismos
- presencia de enfermedades neoplásicas o infecciones severas.
- En caso de una mujer Embarazada
- No haber firmado el consentimiento informado.
- Ingesta de suplementos dietéticos antioxidantes y la ingesta de antibióticos y/o antiinflamatorios tres meses antes.
- Haberse realizado tratamiento periodontal en un año anterior al comienzo estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.3 DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

3.3.1 Variables sociodemográficas

Realizamos una historia clínica completa en la que registramos:

1. Características sociodemográficas: edad y sexo.
2. Consumo de tabaco (cigarrillos/día).
3. Presencia de enfermedades sistémicas

3.3.2 Variables relacionadas con los implantes dentales

Fueron registrados el número total de implantes dentales detallando las siguientes características:

- Tipo del implante usado (Marca comercial).
- Localización.
- Prótesis.
- Tiempo de función.
- Superficie del implante.

3.3.3 Variables clínicas periodontales y periimplantarias

Todas las exploraciones bucodentales, así como el registro del resto de variables recogidas en el estudio fueron realizadas por un mismo explorador (SM.R. A). Se obtuvo un 80% de acuerdo entre (SM.R. A) y el investigador de referencia (F.M) en una muestra de 10 pacientes. Una variabilidad de ± 1 mm en la medición de la profundidad de sondaje (PS) fue Aceptada. Las exploraciones periodontales y periimplantarias fueron realizadas usando un espejo bucal SE plus® (Hahnenkratt E. GmbH, Königsbach-Stein, Alemania) y una sonda periodontal PCPUNC15 (Hu-Friedy, Chicago, USA.). Realizando un periodontograma completo a todos los pacientes incluidos en el estudio.

las variables registradas fueron:

MATERIAL Y MÉTODOS

i. Índice de sangrado:

Hemos seguido el índice de sangrado y Ainamo y Bay (1975) (Ainamo y cols.1975). Este índice determina la severidad de la inflamación gingival mediante la evaluación de la fragilidad capilar. para su determinación se comprueba si unos 20-30 segundos tras el sondaje, el diente sangra en cualquiera de las 6 áreas examinadas;

Se evaluaron 6 superficies:

Por Vestibular: distal, medio y mesial.

Por Palatino / Lingual: distal, medio y mesial.

ii. Profundidad sondable (PS)

Con la sonda manual anteriormente indicada, se midieron seis puntos en cada diente/implante (mesial, medio y distal en bucal y mesial, medio y distal en palatino). En todos los pacientes, realizamos la medición de la PS para el diagnóstico de bolsas periodontales y periimplantarias, definidas como la distancia desde el margen gingival al fondo de la bolsa periodontal (epitelio de unión). Anotando en cada caso el número de bolsas periodontales.

iii. Exploración radiológica:

Su objetivo fundamental es evaluar la altura de hueso alveolar y el perfil de la cresta ósea, se realizaron radiografías intraorales mediante un sistema de radiología digital (RVG Model 5100, Kodak, Rochester, NY, USA) y la pérdida ósea crestal mesial, distal fue medida usando un software de análisis de imagen (ImageJ, National Institutes of Health, USA).

3.4 Análisis histopatológico

Se obtuvieron dos muestras de cada implante / diente de todos los participantes. Usamos un bisturí para tomar papila gingival que incluyeron epitelio sulcular y oral de cada implante/diente del paciente después de la anestesia. El tejido se extirpó con un punzón de 2 mm de diámetro antes de la escala subgingival. Una vez obtenida las dos muestras, unas de ellos almacenaron en tubo con 1 ml de formalina al 10% para su fijación y la otra fue guardada en condiciones de ausencia de luz a 4° C, hasta su congelación y almacenaje a -80°C. Este almacenaje nunca fue superior a 30 minutos Inmediatamente después de la

MATERIAL Y MÉTODOS

recolección, todas las muestras y se enviarán al laboratorio de anatomía patológica, Facultad de Medicina, Granada. Una de las dos muestras de cada paciente Se fijó en tubo con 1 ml de formalina tamponada al 10% durante 48 horas. Pasado este tiempo las muestras se incluyeron en parafina, se seleccionó una muestra de cada bloque de parafina. Las muestras incluidas en parafina se desparafinaron en xilol (3 pases de 5 minutos) y se rehidrataron en etanol de gradación decreciente (absoluto, 96% y 70%, 2 pases de 3 min, respectivamente) y se obtuvieron secciones de 4 μ que se tiñeron con técnica convencional de con hematoxilina-eosina (H-E), Pentacrómico de Movat y Rojo Picrosirius.

El estudio histopatológico e inmunohistoquímico se realizó en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Granada.

3.4.1 Procedimiento de tinción con Rojo Picrosirius para muestras incluidas en parafina

- **Soluciones y Reactivos**

1. Solución roja de picro-sirio (Rojo sirio (0.5g) + Solución acuosa saturada de ácido pícrico (500 ml).
2. Agua acidificada (Añadir 5 ml de ácido acético (glacial) a 1 litro de agua (del grifo o destilada).
3. Hematoxilina de Weigert.

- **Procedimiento**

1. Desparafinar e hidratar secciones de parafina.
2. Teñir los núcleos con hematoxilina de Weigert durante 8 minutos y luego lavar los portaobjetos durante 10 minutos con agua corriente del grifo).
3. Teñir con rojo picro-sirio durante una hora.
4. Lavar en dos cambios de agua acidificada.
5. Quitar la mayor parte del agua de los portaobjetos agitándolos vigorosamente.
6. Deshidratar en tres cambios de etanol (ETOH) al 100%.
7. Limpiar en xileno y montar.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.2 Procedimiento de tinción con Pentacrómico de Movat para muestras incluidas en parafina

- **Procedimiento**

1. Desparafinar e hidratar secciones de parafina.
2. Precalear alcohol alcalino en horno a 60 grados.
3. Mordiente en Bouins en microondas, tapado, a potencia Media durante 45 segundos.
Dejar reposar durante 10 minutos.
4. Enjuagar con agua corriente fría durante 10 minutos.
5. Tiosulfato de sodio durante 5 minutos, lavar durante 5 minutos con agua corriente fría.
6. Teñir en Azul Alcían al 1% por 20 minutos.
7. Agua corriente fría durante 2-5 minutos.
8. Colocar en Alcohol Alcalino precalentado por 10 minutos. (en horno).
9. Agua corriente fría durante 2-5 minutos.
10. Coloque en Movat's Weigerts durante 60 minutos (no en el microondas).
11. Lavar brevemente con agua corriente fría; enjuague bien en agua destilada.
12. Colocar en Crocein Scarlet/Acid Fuchsin durante 1 min.
13. Enjuague en agua destilada
14. Colocar en ácido fosfotúngstico al 5% durante 5 min.
15. Transferir directamente a ácido acético al 1 % durante 5 minutos.
16. Enjuague bien en agua destilada.
17. Deshidratar en 1 cambio de 95% Etanol (ETOH), 2 cambios de 100% ETOH 1 minuto cada uno.
18. Azafrán Alcohólico por 20 minutos.
19. Enjuague en 2 cambios de ETOH al 100 % durante 1 minuto cada uno.
20. Limpiar en xileno y montar.

3.4.3 Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina

1. Protocolo de pretratamiento en módulo PT para desenmascaramiento antigénico en muestras parafinadas

- Montar sobre micrótopo el bloque de parafina.
- Obtener secciones de tejido en parafina de 1mm de espesor.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Recoger en baño de flotación en portaobjetos (Thermo Fisher Scientific).
- Secar a 37° C durante 24 horas.
- Montar sobre los racks.
- Desparafinación, hidratación y desenmascaramiento antigénico de Las secciones de tejidos embebidas en parafina de 1 mm por calor en un único paso.
- Las secciones trataron térmicamente en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (pH 8) (Máster Diagnóstica, Granada, España). en un módulo PT de recuperación de antígeno automático (Autostainer 480) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) a 95 ° C durante 20 min.

2. Procedimiento inmunohistoquímico basado en polímeros conjugados con peroxidasa

➤ **Reactivos necesarios:**

- TBS (Tris Buffered Saline) Tween 20.
- Agua destilada (dH₂O).
- Bloqueante de la peroxidasa endógena.
- anticuerpos monoclonales prediluidos anti-CD 15 (antígeno leucocitario común), Máster Diagnóstica (Granada, España).
- Diaminobenzidina (DAB).
- Intensificación de la DAB.

➤ **Procedimiento:**

Todo el proceso se desarrolla a temperatura ambiente.

- Bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno durante 10 minutos.
- Lavar con TBS Tween 20.
- Eliminar el TBS Tween20.
- Las secciones de micromatrices tisulares se incubaron durante 1 hora temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales prediluidos anti-CD 15.
- Lavar con TBS Tween 20.
- Eliminar el TBS Tween20.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Incubación con Polímero durante 30 minutos.
- Lavar con TBS Tween 20.
- Eliminar el TBS Tween20.
- Revelar las seccion con DAB durante 5 minutos.
- Lavar con dH2O.
- Intensificación de la DAB durante 2 minutos.
- Lavar con dH2O.
- Hematoxilina se usó para la tinción nuclear.

3.4.4 Estudio de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Varios fragmentos de 1 mm² de papila gingival se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5% y luego se fijaron en tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% a 4 ° C durante 2 hora, se lavaron en agua destilada, se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona y se embebieron en Epon (resina TAAB 812) siguiendo un protocolo convencional. Las secciones semifinas se tiñeron con una solución de azul de toluidina. Se obtuvieron secciones ultrafinas (~ 70 nm de espesor) en un ultra micrótopo Reichert Jung ULTRACUT (Leica, Wetzlar, Alemania) y se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo. Las secciones ultrafinas de los NET identificados se examinaron con un Libra 120 Plus TEM (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.4.5 Procedimiento de Inmunofluorescencia (IF) para muestras congeladas

➤ Reactivos

- Solución de permeabilización: Triton X-100 al 0,5% en 1x buffer fosfato salino (PBS).
- Tampón de bloqueo: suero de burro normal al 3 %, gelatina de pescado de agua fría al 3 %, albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % y Tween 20 al 0,5 % en PBS 1x. Preparar

MATERIAL Y MÉTODOS

fresco y conservar durante un máximo de 1 semana a 4 °C.

- Anticuerpo anti-acetil-histona H3, conjugado Alexa Fluor® 647 (06-599-AF647), Sigma-Aldrich.
- Anticuerpo policlonal MPO antihumano de cabra (AF 3667), R&D Systems.
- Alexa Fluor 488 burro anti-cabra IgG (H+L) (A11055), Invitrogen.
- Hoechst 33342 (1:1000 dilución).

➤ **Procedimientos**

- Realizar todos los pasos de tinción dentro de los pocillos.
- Lavar las muestras fijadas tres veces con 200 µl de PBS 1x. Evitar que los cubreobjetos y los artefactos se sequen pipeteando rápidamente en todos los pasos de lavado. Finalmente, aspirar el PBS.
- Agregar 100 µl de solución Triton X-100 al 0,5 % a los pocillos durante 5 min para permeabilizar las células. Aspirar todo el líquido y lavarlo tres veces con PBS.
- Añadir 100 µl de tampón de bloqueo a cada pocillo durante 20 min a 20 °C. Aspirar todo el líquido.
- Añadir 100 µl de Anti-acetyl-Histone H3 Antibody, Alexa Fluor® 647 Conjugate (06-599-AF647) (1-100), en PBS e incubar durante la noche a 4 °C:
- Lavar las células tres veces con 200 µl de PBS 1x y finalmente aspirar la solución.
- Agregar 100 µl del anticuerpo policlonal MPO anti-humano de cabra (AF 3667), R&D Systems en PBS (1-100) e incube durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Lavar las células tres veces con 200 µl de 1xPBS y finalmente aspirar el líquido.
- Agregar 100 µl de Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L) (A11055), Invitrogen en PBS (1-500) e incube durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad.
- Lavar las células una vez con 200 µl de dH₂O y eliminarlo.
- Teñir las células con 100 µl de Hoechst 33342 (dilución 1:1000) durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Lavar las células tres veces con 200 µl de H₂O destilada. No aspire el líquido.
- Extraer con cuidado los cubreobjetos de los pocillos utilizando unas pinzas. Evite rayar y romper los cubreobjetos.
- Incrustar los cubreobjetos en 3 µl de medio de montaje en portaobjetos de vidrio.
- Conservar las muestras a 4 °C en la oscuridad hasta el análisis microscópico.

3.4.6 Cuantificación y análisis digital de imagen de los resultados.

- Se realizó a ciegas en secciones de 4 micrómetros con microscopía óptica BX42 (Olympus Optical Company, Ltd., Tokio, Japón), utilizando el objetivo 40x en un microscopio con una escala adjunta (BH2, Olympus Optical Company), El número de células positivas se cuantificó por mm², contando 100 células por campo de gran aumento (objetivo 40x) en tres experimentos independientes. La cuantificación histomorfométrica se realizó de forma semiautomática utilizando cada inmunotinción. Se capturaron 15 imágenes aleatorias de cada muestra con un objetivo de 40x en un microscopio con una cámara digital conectada (DP70, Olympus Optical Company).
- Las imágenes de IF, Pentacrómico de Movat y Rojo Picrosirius se analizaron con el software ImageJ (NIH, <http://imagej.nih.gov/ij/>) para cuantificar el porcentaje del área ocupada por inmunotinción. Los resultados también se expresaron como porcentajes positivos para cada anticuerpo.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Hemos adquirido las imágenes de IF con sp8. Todas las de plano general están adquiridas con el mismo formato 1024x1024. Hemos tomado algunos detalles con zoom máximo permitido y en algunos casos hemos podido observar detalles de NETs en superresolución. Se trata de técnica lightning que permite alcanzar límite de resolución de 120-130nm.

3.5 Tratamiento estadístico

Se creó una base de datos en formato Excel. Analizamos los datos estadísticos con el análisis de (ANOVA) y la prueba (Fisher's exact test) para comparar las diferencias entre los tres grupos, y se aplicó la prueba (Student's t-test) para hacer comparaciones entre grupos. Todos los procedimientos del análisis estadístico se realizaron con Stata 14 (StataCorpLLC, College Station, Texas, USA.). En todas las pruebas se consideró un nivel de significación $p \leq 0,05$. Estadístico.

TESIS DOCTORAL

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES

Resultados

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Nuestra muestra estaba formada por 65 individuos, 24 hombres (37%) y 41 mujeres (63%), con una edad media de 57.64 ± 13.30 años. El grupo de pacientes con implantes diagnosticados de enfermedad periimplantaria estaba formado por 29 sujetos (45 %), el grupo de pacientes con periodontitis lo componían 26 individuos (40 %) y finalmente la muestra incluía un total de 10 sujetos sanos (15 %). En la Tabla 3, se describen las características sociodemográficas y enfermedades previas de los integrantes del estudio.

Característica muestra paciente				
Variable	Peri-implantitis (n=29)	Periodontitis (n=26)	Control (n=10)	p-value
Muestras totales	51 implante	26 diente	10 diente	
Edad, media± sd	59.0 ± 7.6	59.6 ± 13.3	51.1 ± 22.4	0.132^a
sexo, n (%)				
Hombre	12 (23.5%)	10 (38.5%)	5 (50%)	0.156^b
Mujer	39 (76.5%)	16 (61.5%)	5 (50%)	
fumadore, n (%)				
Si	27 (52.9%)	8 (30.8%)	3 (30%)	0.130^b
No	24 (47.1%)	18 (69.2%)	7 (70%)	
Consumición alcohol, n (%)				
Si	7 (13.7%)	3 (11.5%)	1 (10.0%)	1.000^b
No	44 (86.3%)	23 (88.5%)	9 (90.0%)	
Diabetes, n (%)				
Si	7 (13.7%)	7 (26.9%)	3 (30.0%)	0.240^b
No	44 (86.3%)	19 (73.1%)	7 (70.0%)	
Hipertensión, n (%)				
Si	5 (9.8%)	4 (15.4%)	0 (0%)	0.529^b
No	46 (90.2%)	22 (84.6%)	10 (100%)	
Otras enfermedades, n (%)				
Si	0 (0%)	2 (7.7%)	2 (20.0%)	0.011^b
No	51 (100%)	24 (92.3%)	8 (80.0%)	

a: ANOVA; b: Fisher's Exact Test

Tabla 3 Características sociodemográficas de la población de estudio.

RESULTADOS

Los 29 pacientes de periimplantitis eran portadores de un total de 51 implantes con enfermedad peri implantaría de una media de (1-5) implantes por paciente. Todos los implantes dentales con periimplantitis presentaban la pérdida ósea confirmada radiológicamente. La localización y características de dichos implantes aparece descrita en la Tabla 4.

Número de implantes dentales con peri-implantitis: n =51	
Variable	n (%)
Modelo implante dental , n (%)	
Branemark	2 (3.9)
Astra	29 (56.9)
Microdent	20 (39.2)
Ubicación Ant/Post, n (%)	
Anterior	18 (35.3)
Posterior	33 (64.7)
Ubicación superior/inferior, n (%)	
Maxilar	8 (15.7)
Mandíbula	43 (84.3)
*Tiempo de función, n (%)	
0-5 años	7 (24.1)
5-10 años	6 (20.7)
> 10 años	16 (55.2)
Prótesis, n (%)	
Corona única	3 (5.9)
prótesis parcial fija	39 (76.5)
Sobre dentadura	5 (9.8)
Prótesis híbrida	4 (7.8)
Movilidad, n (%)	
Si	2 (3.9)
No	49 (96.1)
Dolor a la percusión, n (%)	
Si	6 (11.8)
No	45 (88.2)
Gravedad de la periimplantitis	
Early	25
Moderate	12 (23.5)
Advanced	14 (27.5)
* Tiempo de función para 29 implante solo	

Tabla 4: Características de los implantes dentales con peri-implantitis.

RESULTADOS

Resultados de los exámenes clínicos realizados en todos los implantes y dientes incluidos en el estudio se presentan en la tabla 3. Se observaron valores inferior estadísticamente de PS en los controles, presencia de placa y sangrado al sondaje en comparación con implantes con periimplantitis y dientes con periodontitis (Tabla 5).

Variable	Peri implantitis (n=51)	Periodontitis (n=26)	Control (n=10)	p-value
biofilm, n (%)				
SI	44 (86.3%)	21 (80.8%)	2 (20%)	<0.001
No	7 (13.7%)	5 (19.2%)	8 (80%)	
Sangrado al sondaje, n (%)				
SI	42 (82.4%)	23 (88.5%)	1 (10%)	<0.001
No	9 (17.6%)	3 (11.5%)	9 (90%)	
PS del mesial (mm), media ± sd	6.4 ± 2.5	4.4 ± 2.0	1.5 ± 0.7	<0.001
PS del distal (mm), media ± sd	6.8 ± 2.8	4.2 ± 2.0	1.3 ± 0.7	<0.001
PS del vestibular (mm), media ± sd	6.4 ± 2.8	3.8 ± 2.2	1.1 ± 0.3	<0.001
PS del lingual (mm), media ± sd	6.2 ± 2.8	4.2 ± 1.9	1.1 ± 0.3	<0.001
Media del PS (mm), media ± sd	6.4 ± 2.5	4.1 ± 1.5	1.3 ± 0.4	<0.001
Estado de periodontitis				
I		4 (15.4%)		
II		13 (50.0%)		
III		4 (15.4%)		
IV		5 (19.2%)		
Grado de periodontitis				
A		0 (0%)		
B		21 (80.8%)		
C		5 (19.2%)		

Tabla 5. Variables clínicas de implantes y dientes en pacientes de periimplantitis y periodontitis incluidos en el estudio.

Estudio con TEM de periimplantitis (Figura 7 A y B) y periodontitis (Figura 7 C y D) las muestras mostraron un daño generalizado en el tejido conectivo, incluyendo grandes cantidades de células muertas e inflamatorias. Se encontraron PMN en gran cantidad, algunos de ellos mostrando fenómenos relacionados con NET, con núcleos vacíos y membranas nucleares rotas asociadas con expulsión de la cromatina al medio extracelular.

RESULTADOS

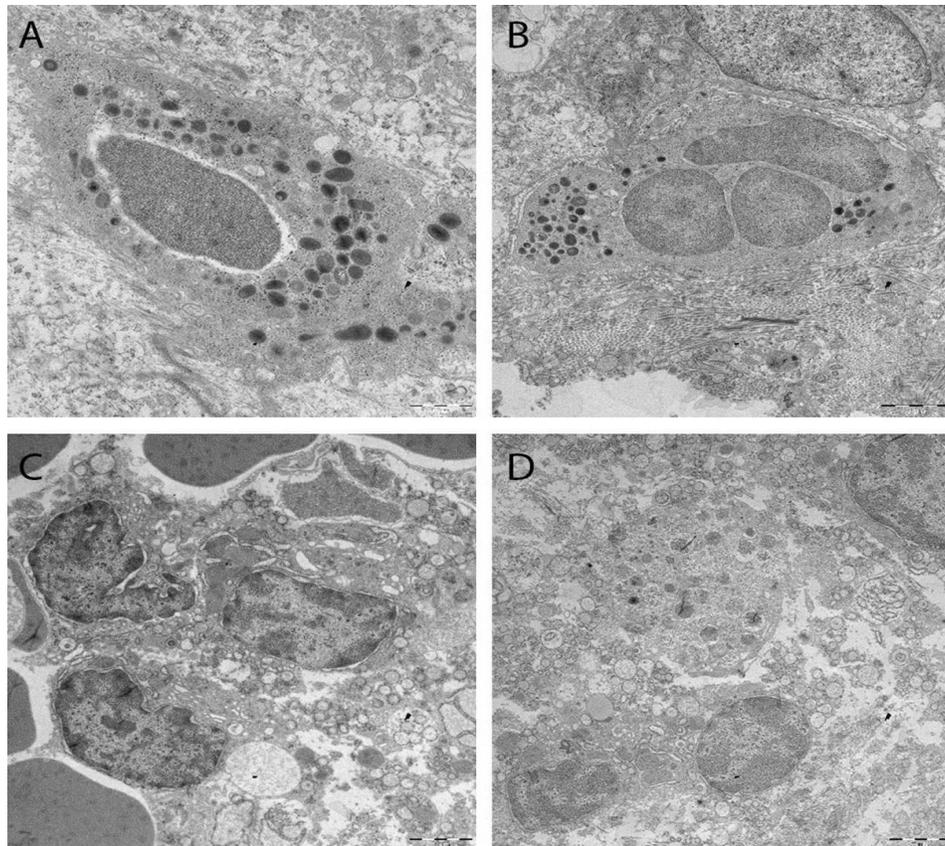


figura 7. Imágenes de TEM. (A, B) Micrografía de una muestra de periimplantitis. (C, D) Micrografías de muestras de periodontitis.

La Tabla 6 muestra los resultados de los análisis IHQ e IF en los tres grupos. La expresión de CD15 fue significativamente menor en los controles en comparación con la periimplantitis ($p < 0,001$) y la periodontitis ($p = 0,035$) (Figura 8 A, B y C). la expresión de CD15 se presentan en epitelio sulcular y oral y mostrar mayor expresión en el epitelio sulcular que oral en los tres grupos del estudio.

RESULTADOS

Variable	Peri- implantitis [A] (n=38)	Periodontitis [B] (n=22)	Controls [C] (n=10)	p-value			
				Global ^a	A vs B ^b	A vs C ^b	B vs C ^b
CD15 Total (células/mm²)	446.7 ± 580.8	495.4 ± 555.9	89.6 ± 81.3	0.121	0.734	0.064	0.050
CD15 Vestibular (células/mm²)	254.5 ± 219.8	192.7 ± 289.5	40.3 ± 30.6	0.033	0.352	0.010	0.094
CD15 Sulcular (células/mm²)	966.3 ± 561.6	649.0 ± 800.1	102.4 ± 130.0	0.001	0.097	<0.001	0.035
Pentachrome %	74.1 ± 11.6	72.3 ± 11.2	78.2 ± 7.9	0.467	0.593	0.365	0.220
Sirius Red - CT %	18.3 ± 10.0	25.7 ± 18.5	50.4 ± 13.9	<0.001	0.039	<0.001	<0.001
Sirius Red - Colágeno %	7.3 ± 5.5	13.4 ± 7.6	15.3 ± 3.3	<0.001	<0.001	0.003	0.490
IF – citH3 (%)	17.3 ± 5.7	1.7 ± 1.8	6.5 ± 5.6	0.002	0.001	0.008	0.193
IF – MPO (%)	12.3 ± 11.7	12.2 ± 16.6	0	0.996	0.996	-	-

Se informan los promedios y las desviaciones estándar para las variables continuas. a: ANOVA; b: prueba t de Student para pares comparaciones

Tabla 6. Expresiones de marcadores IHQ e IF de la encía periimplantaria y periodontal Biopsias.

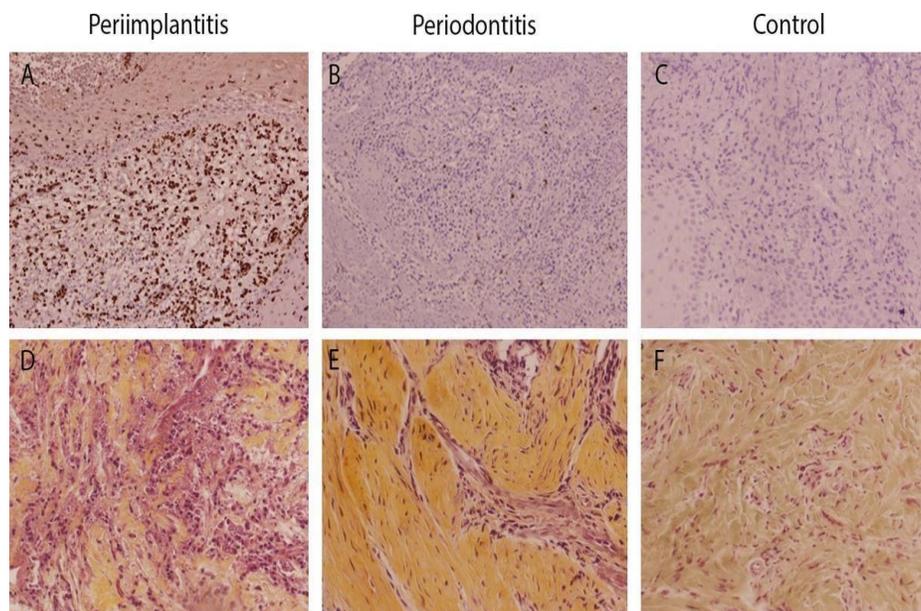


figura 8 Estudio morfológico e inmunohistoquímico. (A, B, C) Expresión de CD15 en periimplantitis, periodontitis y muestras de control. (D, E, F) Imágenes de tinción pentacrómica en periimplantitis, periodontitis y controles (aumento original x40).

RESULTADOS

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el nivel de colágeno medido mediante tinción pentacrómica (Figura 8 D, E y F). La tinción con rojo Sirius tanto para el tejido conectivo como para el colágeno mostró que había diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos. El grupo de periimplantitis presentó niveles más bajos de tejido conectivo y colágeno en comparación con periodontitis ($p = 0,039$ para tejido conectivo y $p < 0,001$ para colágeno) y controles ($p < 0,001$ para tejido conectivo y $p = 0,003$ para colágeno). La periodontitis presentó niveles más altos que la periimplantitis, pero inferior a los controles en tejido conectivo ($p < 0,001$), pero no en los niveles de colágeno ($p = 0,490$) (Figura 9).

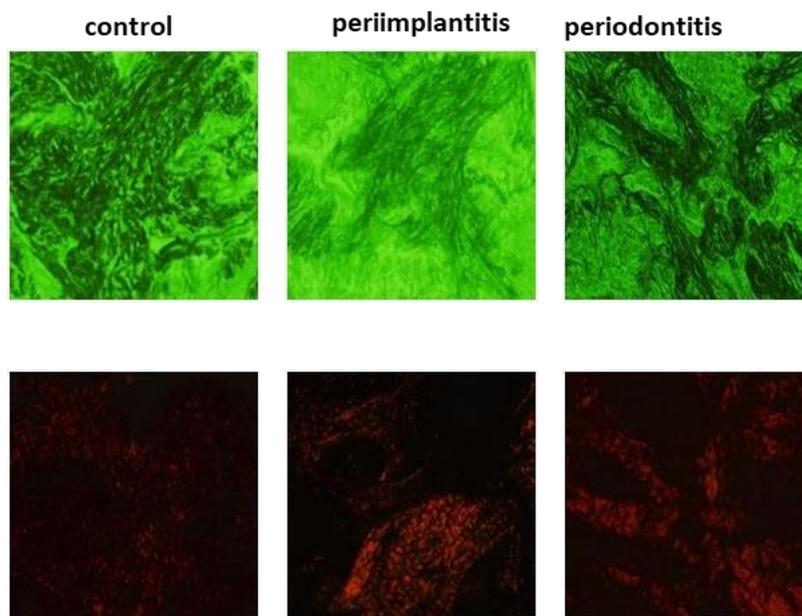


figura 9. Imágenes con tinción de rojo sirio. Tejido conectivo inferior entre periimplantitis, periodontitis y controles No hubo diferencia en los niveles de colágeno entre los grupos (aumento original x40).

RESULTADOS

El análisis de microscopía confocal de imágenes de IF mostró que las biopsias de periimplantitis presentó tinción positiva de citH3 y significativamente mayor que la expresión de este marcador en tanto periodontitis ($p = 0,001$) como controles ($p = 0,008$). No hubo diferencias en la expresión de citH3 entre periodontitis y grupo control ($p = 0,193$). No se encontraron diferencias en la expresión de MPO observado entre los grupos de periimplantitis y periodontitis. La expresión de MPO en el grupo de control fue negativa (Figura 10). la expresión de MPO y CitH3 y se presentan como medidas totales y separadas del epitelio sulcular y oral. Ambos marcadores mostraron mayor expresión en el epitelio sulcular.

RESULTADOS

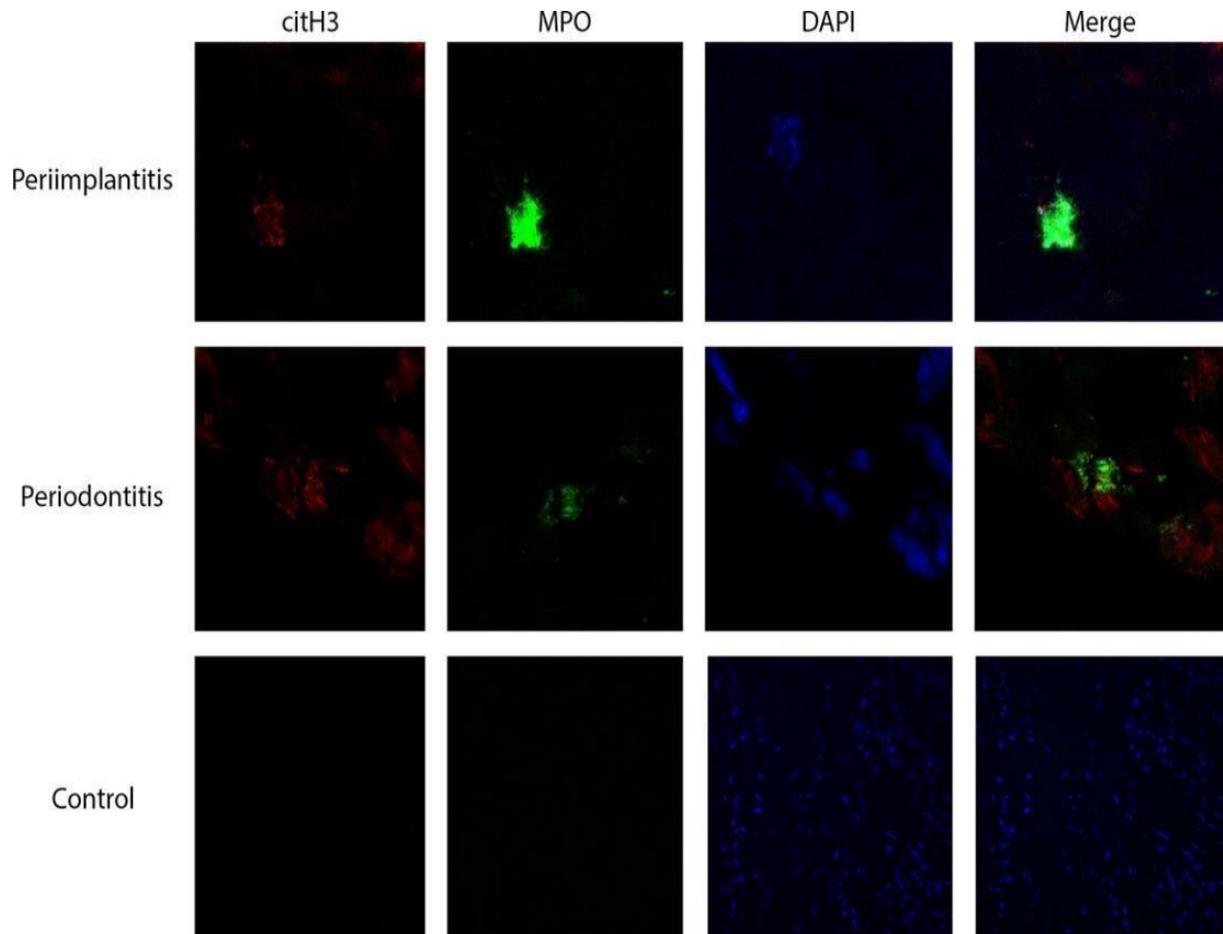


figura 10. Imágenes de IF de microscopía confocal. Expresión de H3 (mostrado en rojo), MPO (mostrado en verde) y tinción de ADN DAPI en los 3 grupos de estudio. Estructuras compatibles con formación de encontradas en casos de periimplantitis y periodontitis.

TESIS DOCTORAL

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

El objetivo del estudio fue caracterizar las trampas de PMN en el tejido periimplantario, además de demostrar si los pacientes portadores de implantes con periimplantitis tienen mayor expresión de NETs en el tejido periimplantario que en pacientes con periodontitis y con un grupo control. Otros objetivos de nuestro estudio fueron analizar los niveles de MPO e histonas en tejido periimplantario en pacientes con periimplantitis y compararlo con muestras gingivales de pacientes con periodontitis y con un grupo control.

La expresión de CD15 fue significativamente menor en los controles en comparación con la periimplantitis y la periodontitis. El grupo de periimplantitis presentó menor superficie de tejido conectivo y fibras de colágeno en comparación con periodontitis y controles. La periodontitis presentó mayor superficie que la periimplantitis pero menor que los controles en tejido conectivo, pero no en los niveles de colágeno. Las biopsias de periimplantitis presentaron mayor expresión de citH3 en comparación con los de periodontitis y los controles. No hubo diferencias en la expresión de citH3 entre la periodontitis y el grupo control. No se observaron diferencias en las células con expresión de MPO entre los grupos de periimplantitis y periodontitis. Las células con expresión de MPO en el grupo de control fueron negativas.

Los PMN, que se encuentran presentes ampliamente en el surco gingival y el epitelio, es una de las células más importantes del sistema inmunológico y representa la primera línea de defensa contra las infecciones bacterianas y fúngicas y se consideran el tipo de célula protectora clave en los tejidos periodontales (Ríos-López y cols.,2020). La histopatología de las lesiones periodontales indica que los PMN forman una "pared " entre el epitelio y la placa dental rica en patógenos. La deficiencia en su número y / o función puede provocar el desarrollo de enfermedad periodontal debido a una respuesta inmunitaria disminuida. Por otro lado, una hiperactividad o una liberación excesiva del contenido celular al compartimento extracelular, puede producir daño tisular que es la principal consecuencia de la enfermedad periodontal. Para eliminar los patógenos periodontales invasores, los PMN utilizan las

DISCUSIÓN

citocinas, NETs, ROS y otras moléculas efectoras (Qingsong y cols.,2021). La reacción entre PMN y bacterias durante la inflamación periodontal ocurre principalmente fuera del tejido gingival y significativamente dentro del surco gingival. El surco puede verse como un conducto que evacua el líquido crevicular gingival junto con bacterias, patrones moleculares asociados a PAMP y DAMP (damage-associated molecular patterns) desde el fondo crevicular hasta la cavidad oral. Los exudados gingivales recogidos de las bolsas periodontales mostraron falta de bacterias fagocitadas, pero una abundancia de NET atrapando las bacterias en el surco gingival. La cantidad de líquido crevicular gingival y su densidad, contenido de NET, dependen de la gravedad de la periodontitis. Este exudado es rico en NET y extremadamente viscoso. El exceso de ADN extracelular de los NET provoca un aumento de la viscosidad. La formación de NET se incrementa en el surco periodontal debido a que es un ambiente rico en oxígeno y un pH natural que favorece la acción de las ROS, en ciertos casos, el pH salival alto también podría acelerar la formación de NETs. Se ha demostrado que el aumento del pH en los neutrófilos estimuló la actividad de Nox y la producción de ROS esenciales para la NETosis, particularmente durante la NETosis dependiente de Nox inducida por agonistas (Khan y cols, 2018). La periodontitis crónica provoca una hipersensibilidad que también involucra ROS, que son inductores de la formación de NET, especialmente peróxido de hidrógeno (Vitkov y cols, 2009).

Las crecientes implicaciones de la formación de NET en la biología de los neutrófilos y la investigación médica traslacional requieren herramientas eficientes para la identificación de NET. Los inmunoensayos, como ELISA y Western blot, se utilizan para la cuantificación de NET, pero los resultados requieren estandarización (Tabla 1). Los métodos de visualización distinguen eficazmente el mecanismo de muerte celular. Sin embargo, la inmunofluorescencia y la microscopía electrónica dependen en gran medida del observador y del campo de visión (Tabla 1). Por lo tanto, parece que no existe un método estándar de oro para la evaluación de la formación de NET. Hasta el día de hoy, se debe utilizar una combinación de diferentes técnicas moleculares para evitar posibles interpretaciones erróneas de los resultados y proporcionar la mayor cantidad de datos comparables. Además, los ensayos funcionales se utilizan para demostrar un papel biológico definido para los NET y diversas proteínas localizadas en NET que se detectan en la circulación y/o los tejidos (Stoimenou y cols.,2022).

DISCUSIÓN

Numerosos estudios sugieren que los NETs y sus productos desempeñan un papel importante en la etiología y severidad de la periodontitis y/o la periimplantitis. La periimplantitis se define como una condición patológica asociada a placa con pérdida ósea alrededor del implante (Caton y cols.2018). La enfermedad periimplantaria es el resultado de un mal balance entre la carga bacteriana y la respuesta inmunitaria (Zitzmann y cols., 2008). Así pues, la enfermedad peri-implantaria es una enfermedad inflamatoria de carácter infeccioso. Estudio de SEPA 2015. (Björn Klinge y cols., 2015) mostraron una prevalencia de periimplantitis en periodo de 5-10 años de seguimiento era del 10% de los implantes y del 20% de los pacientes. La implicación de NETs en la patología periodontal ha sido estudiada en los últimos años (tabla 2). No existen precedentes en la literatura de estudios que midan NETs en pacientes con periimplantitis. La etiología y los mecanismos patogénicos de la periodontitis son los mismos que la periimplantitis (Lindhe y Meyle, 2008). Los NET ofrecen una estrategia de defensa fundamental para prevenir la infiltración de bacterias, y esto puede ser importante en los tejidos periodontales. Por el contrario, es evidente que los NETs también pueden ser perjudiciales si se producen en exceso o si no se eliminan adecuadamente. Una revisión realizada por Kolaparthi y cols. (Kolaparthi y cols., 2015) sobre el papel tanto del ADN del huésped como del ADN microbiano es probablemente crucial en las estrategias de evasión de NET y también en la retención de NET dentro de los tejidos y las posibles consecuencias patológicas. Dada la actividad de los PMN de los pacientes con periodontitis en términos de liberación de ROS y el papel de ROS en la producción de NET, parece probable que en la periimplantitis puede existir una relación entre periimplantitis y los NETs. los pacientes de nuestro estudio tenían una media de 4,70 implantes con periimplantitis en boca. Esta condición no provocó aumentado en los niveles de MPO Y citH3 en biopsia gingival. Nuestro objetivo fue conocer si la periimplantitis puede aumentar los niveles de NETs en biopsia gingival. Nuestros resultados mostraron una mayor expresión de CD15 en comparación con los controles, y no hubo diferencias en la expresión de este marcador entre periodontitis y perimplantitis. La expresión de CD15 fue mayor en la periimplantitis en comparación con la periodontitis, pero estas diferencias no alcanzaron significación estadística. la expresión de CD15 se ha utilizado como un marcador de PMN y se ha correlacionado mucho con actividad inmune de estas células en casos de enfermedades activas y no tratadas, ya que su expresión es mayor en PMN maduros (Ndlovu y cols.,2020) (Blanco y cols., 2021), y se ha utilizado

DISCUSIÓN

junto con MPO como NET marcador positivo (De Andrea y cols.,2021) Se ha informado que un desequilibrio entre MPO de la matriz y los inhibidores tisulares de las MPO es la causa principal de la descomposición del colágeno en el tejido extracelular matriz durante la periodontitis (Seguir y cols.,2001), y estas moléculas son las principales colagenasas en la periimplantitis (Arakawa y cols.,2012), lo que explica la mayor destrucción de tejido conectivo observada en nuestros resultados

Además, Se encontró mayor expresión de citH3 en muestras de perimplantitis en comparación con periodontitis y de control. La naturaleza crónica de la infección periodontal podría iniciar la desaminación de otras histonas centrales como H2A o H4, ocultando la actividad de H3, o la histona en sí misma podría modificar su estructura, haciendo que el ensayo de anticuerpos no pueda detectar el epítipo de H3. (Neeli I y cols,2009). Además de estos hallazgos, algunos autores también han señalado que H3 no es necesario para la formación de NET, sino que es simplemente un producto del proceso posterior a la activación de (proteína arginina-deiminasa 4) PAD4. (Neeli I y cols,2009) (Eliane y cols,2017). Las histonas son una familia de proteínas básicas que se asocian con el ADN en el núcleo de los PMN y ayudan a condensarlo en cromatina. (Thalin C y cols,2017). Las histonas pueden actuar como péptidos antimicrobianos y matar directamente bacterias, hongos, parásitos y virus. Estas histonas antimicrobianas tienen una variedad de funciones, que incluyen la permeabilización de la membrana celular bacteriana, la penetración en la membrana seguida de la unión al ADN y / o ARN bacteriano, la unión al LPS en la membrana, la neutralización de la toxicidad del LPS bacteriano y el atrapamiento patógeno como un componente de las NETs. Esto lleva a la idea de que los NET también pueden ser bactericidas, independientemente de los péptidos antimicrobianos de los PMN. (Neeli I,y cols, 2009).

Igual a citH3, se encontró una mayor expresión de MPO en nuestras muestras de perimplantitis en comparación con los controles. No se encontraron diferencias en la expresión de MPO observado entre los grupos de periimplantitis y periodontitis. La expresión de MPO en el grupo de control fue negativa. La MPO es la proteína más abundante en los PMN. En presencia de peróxido de hidrógeno y haluros, MPO cataliza la formación de intermediarios reactivos de oxígeno, incluido el ácido hipocloroso (HOCl). El sistema

DISCUSIÓN

MPO / HOCl juega un papel importante en la destrucción de microbios por los PMN. Además, se ha demostrado que la MPO es un mediador local del daño tisular y la inflamación resultante en diversas enfermedades inflamatorias. Estudios recientes han demostrado que la deficiencia de MPO da como resultado la exageración de la respuesta inflamatoria y que afecta las funciones de los PMN, incluida la producción de citocinas. (Yasuaki Aratani,2018). La MPO se ha asociado con la destrucción de tejidos periodontales. Las actividades de MPO aumentaron significativamente en la saliva de pacientes con enfermedad periodontal en comparación con individuos sanos. Además, se encontró que la terapia periodontal no quirúrgica es efectiva para mejorar los parámetros clínicos y reducir los niveles de MPO (Mona Dagar y cols ,2015). Según un estudio realizado por Stanislav y cols que compararon implantes clínicamente sanos y otros con periimplantitis, las cantidades totales de MPO fueron significativamente mayores en los implantes con lesiones inflamatorias. Además, los niveles de MPO se correlacionaron con los parámetros clínicos. Nuestros resultados confirman la similitud de la respuesta inflamatoria de los tejidos que rodean a los implantes y los dientes naturales, y sugieren que la MPO podría ser un marcador prometedor de inflamación alrededor de los implantes dentales. (Stanislav y cols, 2004). La MPO se ha asociado con la destrucción de tejidos periimplantario más que de tejidos periodontal y está confirmado por un estudio realizado por Carcuac y cols ,2014. Se incluyeron dos grupos de pacientes: 40 pacientes con periodontitis crónica grave generalizada y 40 pacientes que presentaban periimplantitis grave. Se obtuvieron biopsias de tejidos blandos de sitios enfermos (profundidad de la bolsa de sondaje ≥ 7 mm con sangrado al sondaje), En las muestras de periodontitis, las lesiones de periimplantitis eran más del doble de grandes y contenían proporciones de área, números y densidades significativamente mayores de células positivas para MPO que las lesiones de periodontitis.

Nuestros resultados muestran una mayor presencia y afectación de los PMN, así como una mayor destrucción del tejido conjuntivo en los casos de periimplantitis en comparación con la periodontitis y los controles. En el grupo de periimplantitis se observó niveles más bajos de tejido conectivo y colágeno en comparación con periodontitis ($p = 0,039$ para tejido conectivo y $p < 0,001$ para colágeno) y controles ($p < 0,001$ para tejido conectivo y $p = 0,003$ para colágeno). La periodontitis presentó niveles más altos que la periimplantitis pero inferior a los controles en tejido conectivo ($p < 0,001$). Un estudio reciente ha demostrado que la

DISCUSIÓN

destrucción del tejido blando periimplantario fue mayor en periimplantitis que en periodontitis. (Takamori y cols.,2017).

Hubo algunas limitaciones de este estudio. En primer lugar, el tamaño de la muestra era relativamente pequeño. Sin embargo, fue lo suficientemente grande como para detectar correlaciones significativas entre el recuento de PMN, el nivel de expresión de CD15 y los NETs de los tres grupos del estudio. Estudios longitudinales en pacientes con más número de implantes afectados con periimplantitis serían interesantes para confirmar si la periimplantitis produce aumento de los marcadores de PMN. En segundo lugar, los participantes del estudio procedían de una ciudad de España y es posible que no se puedan generalizar a otros entornos. Sin embargo, hubo una alta proporción de participantes. Se planea seguir trabajando para explorar más a fondo la utilidad potencial de las firmas de PMN en cohortes más grandes y con medidas adicionales de actividad de PMN y sus NETs.

TESIS DOCTORAL

**TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS
DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS
DE PERIODONTITIS Y CONTROLES**

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Mayor presencia y afectación de los PMN en perimplantitis y periodontitis en comparación con los controles, No hubo diferencias en la expresión de CD15 entre periodontitis y perimplantitis. La expresión de CD15 fue mayor en la periimplantitis y periodontitis en comparación con control.
2. Se encontró mayor expresión de citH3 en muestras de perimplantitis en comparación con la expresión de este marcador en periodontitis como controles. Se encontró una mayor expresión de MPO en muestras de perimplantitis en comparación con los de control. La expresión de MPO en el grupo de control fue negativa. No se encontraron diferencias en la expresión de MPO observado entre los grupos de periimplantitis y periodontitis.
3. Mayor destrucción del tejido conjuntivo en los casos de periimplantitis en comparación con la periodontitis y los controles. El grupo de periimplantitis presentó niveles más bajos de tejido conectivo y colágeno en comparación con periodontitis y controles. La periodontitis presentó niveles más altos que la periimplantitis pero inferior a los controles en tejido conectivo, pero no en los niveles de colágeno.

TESIS DOCTORAL

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abi Abdallah D, Lin C, Ball C, King M, Duhamel G, Denkers E. Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun.* 2012; 80:768-777.
- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975 Dec;25(4):229-35. PMID: 1058834.
- Ambruso D, Cusack N, Thurman G. NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation. *Mol Genet Metab.* 2004; 81(4):313–21.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes G, Metzler K, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30:459–89.
- Andreas Stavropoulos, Kristina Bertl, Lewis Winning, Ioannis Polyzois, what is the influence of implant surface characteristics and/or implant material on the incidence and progression of peri-implantitis? A systematic literature review, First published: 12 October 2021.
- Arakawa H, Uehara J, Hara ES, Sonoyama W, Kimura A, Kanyama M, et al. Matrix metalloproteinase-8 is the major potential collagenase in active peri-implantitis. *J Prosthodont Res.*2012;56(4):249-55.
- Arazna, M, Pruchniak M, Demkow U. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: strategies for escaping from killing. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013; 187:74-77.
- Bainton D, Ulliyot J, Farquhar M. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med.* 1971; 134(4):907–34.
- Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark. B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006; 16:401-407.

BIBLIOGRAFÍA

- Berends E, Horswill A, Haste N, Monestier M, Nizet V, von Kockritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun.* 2010; 2:576-586.
- Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J. et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45: S286–S291. doi: 10.1111/jcpe.12957.
- Björn Klinge Thomas Flemming Jan Cosyn Hugo De Bruyn Barbara M. Eisner Margareta Hultin Flemming Isidor Niklaus P. Lang Bodil Lund Jürg Meyle Andrea Mombelli, the patient undergoing implant therapy. Summary and consensus statements. The 4th EAO Consensus Conference 2015, First published: 09 September 2015.
- Blanco-Camarillo C, Alemán OR, Rosales C. Low-Density Neutrophils in Healthy Individuals Display a Mature Primed Phenotype. *Front Immunol.* 2021; 12:672520.
- Bonaventura A, Liberale L, Carbone F, Vecchié A, Diaz-Cañestro C, Camici GG, et al. The pathophysiological role of neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases. *Thromb Haemost* 2018; 118:6-twenty-seven.
- Borregaard N, Cowland J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503–21.
- Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014; 15(11):1017–25.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004 5; 303(5663):1532–5.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5:577-582.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 2012; 198(5):773–83.

BIBLIOGRAFÍA

- Buchanan T, Simpson A, Aziz R, Liu G, Kristian S, Kotb M, Feramisco J. DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.*2006; 16:396-400.
- Campos Fabri GM. Potential link between COVID-19 and Periodontitis: Citokine Storm, Immunosuppression and Dysbiosis. OHDM. 2020, Oral Health and Dental Management, Volume.20, Issue .1, Pages 1-5.
- Carbone F, Bonaventura A, Liberale L, Paolino S, Torre F, Dallegri F, et al. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: promoters and opponents. *Clin Rev Allergy Immunol.* (2020) 58:1–14. 10.1007/s12016-018-8714-z.
- Carcuac, T Berglundh Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions,2014, PMID: 25261052 PMCID: PMC4293768 DOI: 10.1177/0022034514551754
- Casado P, Pereira M, Duarte M, Granjeiro J. History of chronic periodontitis is a high-risk indicator for peri-implant disease. *Braz Dent J.*2013;24 (2):136-41.
- Caton, J. G.; Armitage, G.; Berglundh, T.; Chapple, I. L. C.; Jepsen, S.; Kornman, K. S.; Mealey, B. L.; Papapanou, P. N.; Sanz, M. & Tonetti, M. S. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.*, 45 Suppl. 20: S1-8, 2018.
- Chamardani, T.M., Amiritavassoli, S. Inhibition of NETosis for treatment purposes: friend or foe? *Mol Cell Biochem* 477, 673–688 (2022).
- Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., . . . Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup one of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and PeriImplant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45 (Suppl 20), S68-S77. doi:10.1111/jcpe.12940.
- Chauhan A, Sharma A, Tripathi JK, Sun Y, Sukumran P, Singh BB, Mishra BB, Sharma J. Helminth derived factors inhibit neutrophil extracellular trap formation and inflammation in bacterial peritonitis. *Sci Rep.* 2021 Jun 16;11(1):12718. doi: 10.1038/s41598-021-92001-9. PMID: 34135384; PMCID: PMC8209178.

BIBLIOGRAFÍA

- Chitsazi M, Babaloo A, Mohammadi H. Questions on the new classification of periodontal and preimplantation diseases. *J Adv Periodontol Implant Dent*. 2021 Aug 23;13(2):95-96. doi: 10.34172/japid.2021.012. PMID: 35919683; PMCID: PMC9327478.
- Clark S, Ma A, Tavener S, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly M, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007; 13(4):463–9.
- Coelho L.P., Pato C., Friães A., Neumann A., Von Köckritz-Blickwede M., Ramirez M., Carriço J.A. Automatic Determination of NET (Neutrophil Extracellular Traps) Coverage in Fluorescent Microscopy Images. *Bioinformatics*. 2015; 31:2364–2370. doi: 10.1093/bioinformatics/btv156.
- Cole, J, Pence M, von Kockritz-Blickwede M, Hollands A, Gallo R, Walker M, Nizet V. M protein and hyaluronic acid capsule are essential for in vivo selection of covRS mutations characteristic of invasive serotype MIT1 group A Streptococcus. *MBio*. 2010; 1(4): e00191-10.
- Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013; pii: 67484.
- Cooper P, Palmer L, Chapple I. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol 2000*. 2013; 63:165-197.
- De Andrea CE, Ochoa MC, Villalba-Esparza M, Teijeira Á, Schalper KA, Abengozar-Muela M, et al. Heterogenous presence of neutrophil extracellular traps in human solid tumours is partially dependent on IL-8. *The Journal of Pathology*. 2021;255(2):190-201.
- De Buhr N., Von Köckritz-Blickwede M. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *J. Immunol. Res*. 2016; 2016:4604713. doi: 10.1155/2016/4604713.
- Eilers B, Mayer-Scholl A, Walker T, Tang C, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil antimicrobial proteins enhance *Shigella flexneri* adhesion and invasion. *Cellular microbiology* 2010; 12(8):1134-1143.

BIBLIOGRAFÍA

- Elaine F Kenny, Alf Herzig, Renate Krüger, Aaron Muth, Santanu Mondal, Paul R Thompson, Volker Brinkmann, Horst von Bernuth, Arturo Zychlinsky (2017) Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways eLife 6: e24437 <https://doi.org/10.7554/eLife.24437>.
- Elemek E, Almas K. Peri-implantitis: etiology, diagnosis and treatment: an update. N Y State Dent J.2014; 80(1):26-32.
- Ernst R, Guina T, Miller S. How intracellular bacteria survive surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. Journal of Infectious Diseases 1999: S326-S330
- Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. J Immunol Baltim Md 1950. 2013; 191(5):2647–56.
- Feloutzis A, Lang N, Tonetti M, Burgin W, Bragger U, Buser D, Duff G, Kornman K. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. Clin Oral Implants Res. 2003 Feb; 14(1):10-7.
- Ferreira S, Silva G, Cortelli J, Costa J, Costa F. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. J Clin Periodontol. 2006; 33(12):929-35.
- Fine, N.; Hassanpour, S.; Borenstein, A.; Sima, C.; Oveisi, M.; Scholey, J.; Cherney, D.; Glogauer, M. Distinct oral neutrophil subsets define health and periodontal disease states. J. Dent. Res. 2016, 95, 931–938.
- Fiona Q. Bui a one, Cassio Luiz Coutinho Almeida-da-Silva a b 1, Brandon Huynh a, Alston Trinh a, Jessica Liu a, Jacob Woodward a, Homer Asadi a, David M. Ojcius, Association between periodontal pathogens and systemic disease, Volume 42, Issue 1, February 2019, Pages 27-35.
- Fiorellini J, Nevins M. Dental implant considerations in the diabetic patient. Periodontol 2000. 2000; 23:73-7.
- FRANSSON C, WENNSTROM J, BERGLUNDH T. Clinical characteristic of implants with a history of progressive bone loss. Clinical Oral Implants Res. 2008; 19(2):142-7.

BIBLIOGRAFÍA

- Fuchs T, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007; 176(2):231–41.
- Garcia-Romo G, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011; 3(73):73ra20.
- Gavillet M., Martinod K., Renella R., Harris C., Shapiro N.I., Wagner D.D., Williams D.A. Flow Cytometric Assay for Direct Quantification of Neutrophil Extracellular Traps in Blood Samples. *Am. J. Hematol.* 2015; 90:1155–1158. doi: 10.1002/ajh.24185.
- Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol.* 2012; 3:420.
- Gruica B., Wang H, LANG N, Buser D. Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15 (4): p.393-400.
- Gupta A, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient Neutrophil Extracellular Trap Induction Requires Mobilization of Both Intracellular and Extracellular Calcium Pools and Is Modulated by Cyclosporine A. *PLoS ONE.* 2014; 9(5).
- Gupta A, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol.* 2005; 66(11):1146–54.
- Gupta S., Chan D.W., Zaal K.J., Kaplan M.J. A High-Throughput Real-Time Imaging Technique to Quantify NETosis and Distinguish Mechanisms of Cell Death in Human Neutrophils. *J. Immunol.* 2018; 200:869–879. doi: 10.4049/jimmunol.1700905.
- Hakkim, A, Furnrohr B, Amann K, Laube B, Abed U, Brinkmann V, Herrmann M, Voll R, and Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:9813-9818.
- Halverson TWR, Wilton M, Poon KKH, Petri B, Lewenza S. DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathog.* 2015; 15; 11(1): e1004593.
- Heitz L. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol.* 2008; 35:292-304.

BIBLIOGRAFÍA

- Hirschfeld, J.; Dommisch, H.; Skora, P.; Horvath, G.; Latz, E.; Hoerauf, A.; Waller, T.; Kawai, T.; Jepsen, S.; Deschner, J.; et al. Neutrophil extracellular trap formation in supragingival biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* 2015, 305, 453–463.
- Jansson H, Hamberg K, De bruyn H, Bratthall G. Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2005; 7(1):51-9.
- Jiang Q, Zhao Y, Shui Y, Zhou X, Cheng L, Ren B, Chen Z, Li M. Interactions Between Neutrophils and Periodontal Pathogens in Late-Onset Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Mar 12; 11:627328. doi: 10.3389/fcimb.2021.627328. PMID: 33777839; PMCID: PMC7994856.
- Kahlenberg J, Kaplan M. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2013; 191(10):4895–901.
- Kaneko, C.; Kobayashi, T.; Ito, S.; Sugita, N.; Murasawa, A.; Nakazono, K.; Yoshie, H. Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: A pilot case-control study. *PLoS ONE* 2018, 13, e0192365.
- Kaplan M, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 2012; 189, 2689-2695.
- Kasprzycka W., Homa-Mlak I., Mlak R., Malecka-Massalska T. Direct and Indirect Methods of Evaluating the NETosis Process. *J. Pre-Clin. Clin. Res.* 2019; 13:50–56. doi: 10.26444/jpccr/105563.
- Kennedy A, DeLeo F. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.* 2009; 43:25–61.
- Khan MA, Philip LM, Cheung G, Vadakepeedika S, Grasemann H, Swezey N, Palaniyar N. Regulating NETosis: Increasing pH Promotes NADPH Oxidase-Dependent NETosis. *Front Med (Lausanne).* 2018 Feb 13;5:19. doi: 10.3389/fmed.2018.00019. PMID: 29487850; PMCID: PMC5816902.

BIBLIOGRAFÍA

- Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Swarna C, Devulapalli NS. Neutrophil extracellular traps: Their role in periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol.* 2014 Nov-Dec;18(6):693-7. doi: 10.4103/0972-124X.147399. Retraction in: *J Indian Soc Periodontol.* 2015 Mar-Apr;19(2):128. PMID: 25624623; PMCID: PMC4296451.
- Laine M, Leonhardt A, Roos-jansaker A, Pena A, Van Winkelhoff A., Winkel E, Renvert S. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17(4):380-5.
- Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med.* 2015 Mar;21(3):172-83
- Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011;3(73):73ra19.
- Lauth, X, Von Kockritz-Blickwede M, McNamara C, Myskowski S, Zinkernagel A, Beall B, Ghosh P, Gallo R, Nizet V. M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J Innate Immun.*2009; 1:202-214.
- Levy, D.H.; Chapple, I.L.C.; Shapira, L.; Golan-Goldhirsh, A.; Gopas, J.; Polak, D. Nupharidine enhances aggregatibacter actinomycetemcomitans clearance by priming neutrophils and augmenting their ector functions. *J. Clin. Periodontol.* 2019, 46, 62–71.
- Lewis Winning & Gerard J. Linden Periodontitis and systemic disease BDJ Team volume 2, Article number: 15163 (2015).
- Li G, Mine Y, Hincke M, Nys Y. Isolation and characterization of antimicrobial proteins and peptide from chicken liver. *J Pept Sci.* 2007; 13:368-378.
- Lindhe J, Meyle J, Group e of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; 35:282-5.

BIBLIOGRAFÍA

- Lindquist W, Carlsson G, Jemt T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. *J Dent Res.* 1997; 76(10):1667-74.
- Lv D., Xu Y., Cheng H., Ke Y., Zhang X., Ying K. A Novel Cell-Based Assay for Dynamically Detecting Neutrophil Extracellular Traps-Induced Lung Epithelial Injuries. *Exp. Cell Res.* 2020; 394:112101. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112101.
- Magan-Fernandez, A.; O'Valle, F.; Abadia-Molina, F.; Munoz, R.; Puga-Guil, P.; Mesa, F. Characterization and comparison of neutrophil extracellular traps in gingival samples of periodontitis and gingivitis: A pilot study. *J. Periodontal Res.* 2019, 54, 218–224.
- Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood.* 2014;1;123(18):2768–76.
- Masuda S., Shimizu S., Matsuo J., Nishibata Y., Kusunoki Y., Hattanda F., Shida H., Nakazawa D., Tomaru U., Atsumi T., et al. Measurement of NET Formation in Vitro and in Vivo by Flow Cytometry. *Cytom. Part A.* 2017; 91:822–829. doi: 10.1002/cyto.a.23169.
- Matthieu Ribon, Study of neutrophils, neutrophil cellular traps, and the complement protein C1q in inflammatory responses: physiopathological consequences in rheumatoid arthritis and an experimental model. 2015.
- Mayadas T, Tsokos G, Tsuboi N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation.* 2009; 120:2012–24.
- McDonald B, Urrutia R, Yipp B, Jenne C, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 2012; 12(3):324–33.
- Mesa F, Arrabal-Polo MA, Magan-Fernandez A, Arrabal M, Martin A, Muñoz R, Rodriguez-Agurto A, Bravo M. Patients with periodontitis and erectile dysfunction suffer a greater incidence of major adverse cardiovascular events: A prospective study in a Spanish population. *J Periodontol.* 2022 Aug;93(8):1233-1242. doi: 10.1002/JPER.21-0477. Epub 2022 Jan 19. PMID: 34889466.

BIBLIOGRAFÍA

- Mingli Zhao, Heng Chi, Neutrophil Extracellular Traps of *Cynoglossus semilaevis*: Production Characteristics and Antibacterial Effect, March 2017, DOI:10.3389/fimmu.2017.
- Mona Dagar 1, Dhruv Kumar Deepa 1, Madan Molly 2, Anamika Sharma 1, Braham Prakash Khattak, 2015, Effect of nonsurgical periodontal therapy on salivary myeloperoxidase levels: A biochemical study PMID: 26644720 PMCID: PMC4645540 DOI: 10.4103/0972-124X.162199.
- Moonen, C.G.; Buurma, K.G.; Faruque, M.R.; Balta, M.G.; Lieerink, E.; Bizzarro, S.; Nicu, E.A.; Loos, B.G. Periodontal therapy increases neutrophil extracellular trap degradation. *Innate Immun.* 2019.
- Ndlovu LN, Peetluk L, Moodley S, Nhamoyebonde S, Ngoepe AT, Mazibuko M, et al. Increased Neutrophil Count and Decreased Neutrophil CD15 Expression Correlate with TB Disease Severity and Treatment Response Irrespective of HIV Co-infection. *Front Immunol.* 2020; 11:1872
- Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 2009;1(3):194-201. doi: 10.1159/000206974. Epub 2009 Feb 27. PMID: 20375577; PMCID: PMC6951038.
- Padial-molina M, Suarez F, Rios H, Galino-moreno P, Wang H. Guidelines for the diagnosis and treatment of peri-implant diseases. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2014; 34 (6) p.102-11.
- Palmer L. Chapple J, Wright H, Roberts A, Cooper P. Extracellular deoxyribonuclease production by periodontal bacteria. *J Periodontal Res.* 2012; 47:439-445.
- Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M. et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89: S173–s182. doi: 10.1002/jper.17-0721.
- Papayannopoulos V, Metzler K, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010; 191(3):677–91.

BIBLIOGRAFÍA

- Pilsczek F, Salina D, Poon K, Fahey C, Yipp B, Sibley C, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2010; 185(12):7413–25.
- Qingsong Jiang, Yuxi Zhao¹, Yusen Shui¹, Xuedong Zhou¹, Lei Cheng¹, Biao Ren¹, Zhu Chen and Mingyun Li¹, Interactions Between Neutrophils and Periodontal Pathogens in Late-Onset Periodontitis, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 12 March 2021.
- Rakic M, Galindo-Moreno P, Monje A, Radovanovic S, Wang HL, Cochran D, et al. How frequent does peri-implantitis occur? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2018;22(4):1805-16.
- Rakic M, Petkovic-curcin A., Struillou X, Matic S, Stamatovic N, Vojvodic D. CD14 and TNF α single nucleotide polymorphisms are candidates for genetic biomarkers of peri-implantitis. *Clin Oral Investig.* 2014; 19(4):791-801.
- Renvert S, Aghazadeh A, Hallström H, Persson G. Factor related to peri-implantitis—a retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(4):522-9.
- Renvert S, Persson G. Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36.10:9-14.
- Ríos-López AL, González GM, Hernández-Bello R, Sánchez-González A. Avoiding the trap: Mechanisms developed by pathogens to escape neutrophil extracellular traps. *Microbiol Res.* 2021 Feb; 243:126644. doi: 10.1016/j.micres.2020.126644. Epub 2020 Nov 5. PMID: 33199088.
- Rodrigo D, Sanz-Sánchez I, Figüero E, Llodrá JC, Bravo M, Caffesse RG, Vallcorba N, Guerrero A, Herrera D. Prevalence and risk indicators of peri-implant diseases in Spain. *J Clin Periodontol.* 2018 Dec;45(12):1510-1520. doi: 10.1111/jcpe.13017. Epub 2018 Nov 5.
- Roos-jansaker A, Renvert H, LINDAHL C, Renvert S. Nine to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol.* 2006;33(4) p.296-301.

BIBLIOGRAFÍA

- Saaby M, Karring E, Schou S, Isidor F. Factors influencing severity of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.*2014; 27(1):7-12.
- Saffarzadeh M, Preissner K. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Current opinion in hematology* 2013; 20:3.
- Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus- 1. *Cell Host Microbe.* 2012; 19;12(1):109–16.
- Seguier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol.* 2001;72(10):1398-406.
- Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Periodontitis, implant loss and peri-implantitis. A meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.*2013; 26(4): e8-e16.
- Sgolastra F, Petrucci A, Severino M., GATTO R., MONACO A. Smoking and the risk of peri-implantitis. A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2014; <https://doi.org/10.1111/clr.12333>.
- Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol.* 2014; 5:448.
- Shirakawa, K.; Sano, M. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Cardiovascular Disease: An Overview and Potential Therapeutic Approaches. *Biomedicines* 2022, 10, 1850.
- Simon D, Simon H, Yousefi S. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *Allergy.* 2013; 68:409-416.
- Stanislav Liskmann, Mihkel Zilmer, Tiiu Vihalemm, Olev Salum, Krista Fischer, PMID Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study: 15355396 DOI: 10.1111/j.1600-0501.2004.01061.

BIBLIOGRAFÍA

- Stoimenou M, Tzoros G, Skendros P, Chrysanthopoulou A. Methods for the Assessment of NET Formation: From Neutrophil Biology to Translational Research. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 13;23(24):15823. doi: 10.3390/ijms232415823. PMID: 36555464; PMCID: PMC9781911.
- Strietzel F, Reichart P, Kale A, Kulkarni M, Wegner B, Kuchler I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(6):523-44.
- Sumby, P, Barbian K, Gardner D, Whitney A, Welty D, Long R, Bailey J, Parnell M, Hoe N, Adams G, Deleo F. Extracellular deoxyribonuclease made by group A Streptococcus assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:1679-1684.
- Takamori Y, Atsuta I, Nakamura H, Sawase T, Koyano K, Hara Y. Histopathological comparison of the onset of peri-implantitis and periodontitis in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2017 Feb;28(2):163-170. doi: 10.1111/clr.12777. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26804139.
- Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol.* 1996; 59(2):229–40.
- Thalin C., Daleskog M., Göransson S.P., Schatzberg D., Lasselin J., Laska A.-C., Kallner A., Helleday T., Wallén H., Demers M. Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantification of Citrullinated Histone H3 as a Marker for Neutrophil Extracellular Traps in Human Plasma. *Immunol. Res.* 2017; 65:706–712. doi: 10.1007/s12026-017-8905-3.
- Trindade D, Carvalho R, Machado V, Chambrone L, Mendes JJ, Botelho J. Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *J Clin Periodontol.* 2023 Jan 11. doi: 10.1111/jcpe.13769. Epub ahead of print. PMID: 36631982.
- Urban C, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000639.

BIBLIOGRAFÍA

- Vitkov L, Klappacher M, Hannig M, Krautgartner W. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009; 44:664-672.
- Vitkov L, Knopf J, Krunić J, Schauer C, Schoen J, Minnich B, Hannig M, Herrmann M. Periodontitis-Derived Dark-NETs in Severe Covid-19. *Front Immunol.* 2022 Apr 12; 13:872695. doi: 10.3389/fimmu.2022.872695. PMID: 35493525; PMCID: PMC9039207.
- Vitkov L, Muñoz LE, Schoen J, Knopf J, Schauer C, Minnich B, Herrmann M, Hannig M. Neutrophils Orchestrate the Periodontal Pocket. *Front Immunol.* 2021 Nov 24; 12:788766. doi: 10.3389/fimmu.2021.788766. PMID: 34899756; PMCID: PMC8654349.
- Vitkov, L.; Klappacher, M.; Hannig, M.; Krautgartner, W.D. Neutrophil fate in gingival crevicular fluid. *Ultrastruct. Pathol.* 2010, 34, 25–30.
- Von Köckritz-Blickwede M., Chow O., Ghochani M., Nizet V. Visualization and Functional Evaluation of Phagocyte Extracellular Traps. 3rd ed. Volume 37 Elsevier Ltd.; Amsterdam, The Netherlands: 2010.
- Wang J, Zhou Y, Ren B, Zou L, He B, Li M. The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Mar 18; 11:639144. doi: 10.3389/fcimb.2021.639144. PMID: 33816343; PMCID: PMC8012762.
- Wartha, F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol.* 2007; 9:1162-1171.
- Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro S, Weiss J, Zychlinsky A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* 2002; 417:91-94.
- White, P.; Sakellari, D.; Roberts, H.; Risafi, I.; Ling, M.; Cooper, P.; Milward, M.; Chapple, I. Peripheral blood neutrophil extracellular trap production and degradation in chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2016, 43, 1041–1049.
- Wilson J. The positive relationship between excess cement and peri-implant disease: a prospective clinical endoscopic study. *J Periodontol.* 2009; 80(9):1388-92.

BIBLIOGRAFÍA

- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest.* 2000 May 1; 80(5):617–53.
- Yasuaki Aratani, Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function, 2018 Feb 15;640:47-5218(6):693-697. doi: 10.1016/j.abb.2018.01.004. Epub 2018 Jan 11.
- Yipp B, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013; 17; 122(16):2784–94.
- Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon H. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009; 16(11):1438–44.
- Zhang, F.; Yang, X.M.; Jia, S.Y. Characteristics of neutrophil extracellular traps in patients with periodontitis and gingivitis. *Braz. Oral Res.* 2020, 34, e015.
- Zitzmann N, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35:286-91.

TESIS DOCTORAL

TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-IMPLANTITIS Y SU COMPARACIÓN CON MUESTRAS DE PERIODONTITIS Y CONTROLES

ANEXOS

ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO1:

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

**CARACTERIZACIONES DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN MUESTRAS DE PERI-
IMPLANTITIS con su comparación con muestras de periodontitis.**

De conformidad Con lo dispuesto en la legislación vigente:

- Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad.
- Ley 2/1998, de 15 de junio, de salud de Andalucía (BOJA núm. .74 de 4 de julio de 1998).
- Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en Materia de información y documentación clínica. (BOE num.274 de 15 de noviembre de 2002).
- Ley de investigación biomédica, Ley 14/2007, artículo 3.

YO, (nombre y apellidos), con

D.N.I.....

- He hablado con el profesional responsable del estudio: Sarmad Muayad Rashid Albakri
 - He leído la hoja de información que se me ha entregado.
 - He podido hacer preguntas sobre el estudio.
 - He recibido suficiente información sobre el estudio.
 - Comprendo que mi participación es voluntaria.
 - Comprendo que puedo retirarme del estudio:
1. Cuando quiera.
 2. Sin tener que dar explicaciones.
 - 3 Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
- Puedo revocar libremente por escrito este consentimiento en cualquier momento, acogíendome a la ley de autonomía del paciente 41/2002 de 14 de noviembre, capítulo IV, artículo 8, apartado 5.

Las muestras obtenidas en este estudio solo serán utilizadas para los fines específicos del mismo.

Fecha
del
paciente

Firma

Fecha

Firma del profesional responsable del estudio y N.I.E

ANEXOS

ANEXO 2

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/Dª: CRISTINA LUCIA DAVILA FAJARDO como secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Caracterización de las trampas extracelulares de neutrófilos en muestras de Perimplantitis y su comparación con Periodontitis. (NET en Periimplantitis y Periodontitis)

Protocolo, Versión: última

HIP, Versión: última

CI, Versión: último

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en Granada a 30/04/2020

D/Dª. CRISTINA LUCIA DAVILA FAJARDO, como Secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada



Código Seguro De Verificación:	dd74fca2df763b18a8ddc7d634defcf0dff289c2	Fecha	30/04/2020	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Cristina Lucia Davila Fajardo			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/dd74fca2df763b18a8ddc7d634defcf0dff289c2	Página	1/3	

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 30/03/2020 y recogida en acta 4/2020 la propuesta del/de la Promotor/a (No hay promotor/a asociado/a), para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Caracterización de las trampas extracelulares de neutrófilos en muestras de Perimplantitis y su comparación con Periodontitis. ,(NET en Perimplantitis y Periodontitis)

Protocolo, Versión: última

HIP, Versión: última

CI, Versión: último

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

Presidente/a

D/D^a. José Dario Sánchez López

Vicepresidente/a

D/D^a. Francisco Manuel Luque Martínez

Secretario/a

D/D^a. CRISTINA LUCIA DAVILA FAJARDO

Vocales

D/D^a. Jesús Martínez Tapias
 D/D^a. Juan Ramón Delgado Pérez
 D/D^a. Berta Gorlat Sánchez
 D/D^a. José Cabeza Barrera
 D/D^a. Sonia Domínguez Almendros
 D/D^a. Juan Mozas Moreno
 D/D^a. José Uberos Fernández
 D/D^a. MARIA ESPERANZA DEL POZO GAVILAN
 D/D^a. AURORA BUENO CAVANILLAS
 D/D^a. Paloma Muñoz de Rueda
 D/D^a. Manuel Gálvez Ibáñez
 D/D^a. Esther Espinola García
 D/D^a. ANTONIO MORALES ROMERO
 D/D^a. Encarnación Martínez García
 D/D^a. FRANCISCO LUIS MANZANO MANZANO
 D/D^a. MIGUEL LÓPEZ GUADALUPE
 D/D^a. JUAN ROMERO COTELO
 D/D^a. MANUEL MARTIN DIAZ
 D/D^a. JOSÉ LUIS MARTÍN RODRÍGUEZ
 D/D^a. JUAN DIAZ GARCIA
 D/D^a. LUIS MIGUEL DOMENECH GIL
 D/D^a. Luis Javier Martínez González
 D/D^a. JESÚS CARDONA CONTRERAS
 D/D^a. Pilar Guijosa Campos
 D/D^a. José Luis Martín Ruiz
 D/D^a. MARIANA FÁTIMA FERNÁNDEZ CABRERA
 D/D^a. MARÍA DOLORES GARCÍA VALVERDE
 D/D^a. ESTHER MOLINA RIVAS
 D/D^a. ANTONIO JUAN PÉREZ FERNÁNDEZ
 D/D^a. JOAQUINA MARTINEZ GALAN



Código Seguro De Verificación:	dd74fca2df763b18a8ddc7d634defcf0dff289c2	Fecha	30/04/2020	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Cristina Lucia Davila Fajardo			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificaxFirmaDocumento.iframe/code/dd74fca2df763b18a8ddc7d634defcf0dff289c2	Página	2/3	

ANEXOS

Que dicho Comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Lo que firmo en Granada a 30/04/2020



Código Seguro De Verificación:	dd74fca2df763b18a8ddc7d634defcf0dff289c2	Fecha	30/04/2020	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Cristina Lucia Davila Fajardo			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeistica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iframe/code/dd74fca2df763b18a8ddc7d634defcf0dff289c2	Página	3/3	

ANEXOS

ANEXO 3:

DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA AMM – PRINCIPIOS ÉTICOS PARA LAS INVESTIGACIONES MÉDICAS EN SERES HUMANOS

Adoptada por la

18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la
29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975 35ª Asamblea Médica Mundial,
Venecia, Italia, octubre 1983 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989
48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996 52ª Asamblea General,
Edimburgo, Escocia, octubre 2000

Nota de Clarificación, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002

Nota de Clarificación, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004

59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008

64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013

Introducción

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo debe ser aplicado con consideración de todos los otros párrafos pertinentes.

2. Conforme al mandato de la AMM, la Declaración está destinada principalmente a los médicos. La AMM insta a otros involucrados en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.

Principios generales

3. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula «velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente», y el Código Internacional de Etica Médica afirma que: «El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica».

4. El deber del médico es promover y velar por la salud, bienestar y derechos de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

ANEXOS

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos.
6. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones probadas deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.
7. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales.
8. Aunque el objetivo principal de la investigación médica es generar nuevos conocimientos, este objetivo nunca debe tener primacía sobre los derechos y los intereses de la persona que participa en la investigación.
9. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.
10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.
11. La investigación médica debe realizarse de manera que reduzca al mínimo el posible daño al medio ambiente.
12. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la educación, formación y calificaciones científicas y éticas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente.
13. Los grupos que están subrepresentados en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.

ANEXOS

14. El médico que combina la investigación médica con la atención médica debe involucrar a sus pacientes en la investigación sólo en la medida en que esto acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.

15. Se debe asegurar compensación y tratamiento apropiados para las personas que son dañadas durante su participación en la investigación.

Riesgos, Costos y Beneficios

16. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.

La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo y los costos para la persona que participa en la investigación.

17. Toda investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y los grupos que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o grupos afectados por la enfermedad que se investiga.

Se deben implementar medidas para reducir al mínimo los riesgos. Los riesgos deben ser monitoreados, evaluados y documentados continuamente por el investigador.

18. Los médicos no deben involucrarse en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria.

Cuando los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados definitivos, los médicos deben evaluar si continúan, modifican o suspenden inmediatamente el estudio.

Grupos y personas vulnerables

19. Algunos grupos y personas sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y pueden tener más posibilidades de sufrir abusos o daño adicional.

Todos los grupos y personas vulnerables deben recibir protección específica.

20. La investigación médica en un grupo vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades o prioridades de salud de este grupo y la investigación no puede realizarse en un grupo no vulnerable. Además, este grupo podrá beneficiarse de los

ANEXOS

conocimientos, prácticas o intervenciones derivadas de la investigación.

Requisitos científicos y protocolos de investigación

21. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

22. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos deben describirse claramente y ser justificados en un protocolo de investigación.

El protocolo debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y la información sobre las estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación.

En los ensayos clínicos, el protocolo también debe describir los arreglos apropiados para las estipulaciones después del ensayo.

Comités de ética de investigación

23. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación al comité de ética de investigación pertinente antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser transparente en su funcionamiento, debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida y debe estar debidamente calificado. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración.

El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ninguna enmienda en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité. Después que termine el estudio, los investigadores deben presentar un informe final al comité con un resumen de los resultados y conclusiones

ANEXOS

del estudio.

Privacidad y confidencialidad

24. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal.

Consentimiento informado

25. La participación de personas capaces de dar su consentimiento informado en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona capaz de dar su consentimiento informado debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.

26. En la investigación médica en seres humanos capaces de dar su consentimiento informado, cada participante potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento, estipulaciones post estudio y todo otro aspecto pertinente de la investigación. El participante potencial debe ser informado del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada participante potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información.

Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestado formalmente.

Todas las personas que participan en la investigación médica deben tener la opción de ser informadas sobre los resultados generales del estudio.

27. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el participante potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.

ANEXOS

28. Cuando el participante potencial sea incapaz de dar su consentimiento informado, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud del grupo representado por el participante potencial y esta investigación no puede realizarse en personas capaces de dar su consentimiento informado y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.

29. Si un participante potencial que toma parte en la investigación considerado incapaz de dar su consentimiento informado es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del participante potencial debe ser respetado.

30. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo, los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria del grupo investigado. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

31. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe afectar de manera adversa la relación médico-paciente.

32. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, como la investigación sobre material o datos contenidos en biobancos o depósitos similares, el médico debe pedir el consentimiento informado para la recolección, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones excepcionales en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

ANEXOS

Uso del placebo

33. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con las mejores intervenciones probadas, excepto en las siguientes circunstancias:

Cuando no existe una intervención probada, el uso de un placebo, o ninguna intervención, es aceptable; o cuando por razones metodológicas científicamente sólidas y convincentes, sea necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención el uso de cualquier intervención menos eficaz que la mejor probada, el uso de un placebo o ninguna intervención. Los pacientes que reciben cualquier intervención menos eficaz que la mejor probada, el placebo o ninguna intervención, no correrán riesgos adicionales de daño grave o irreversible como consecuencia de no recibir la mejor intervención probada.

Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

Estipulaciones post ensayo

34. Antes del ensayo clínico, los auspiciadores, investigadores y los gobiernos de los países anfitriones deben prever el acceso post ensayo a todos los participantes que todavía necesitan una intervención que ha sido identificada como beneficiosa en el ensayo. Esta información también se debe proporcionar a los participantes durante el proceso del consentimiento informado.

Inscripción y publicación de la investigación y difusión de resultados

35. Todo estudio de investigación con seres humanos debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.

36. Los investigadores, autores, auspiciadores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación y difusión de los resultados de su investigación. Los investigadores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Todas las partes deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

ANEXOS

Intervenciones no probadas en la práctica clínica

37. Cuando en la atención de un paciente las intervenciones probadas no existen u otras intervenciones conocidas han resultado ineficaces, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Tales intervenciones deben ser investigadas posteriormente a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.

*Los párrafos 26, 27, 28 y 29 han sido revisados editorialmente por el Secretariado de la AMM el 5 de mayo de 2015.