

# Comparación de técnicas de disgregación mecánica, enzimática y mecano-enzimática en la extracción de poblaciones linfocitarias y macrófagos en tejidos con periodontitis crónica avanzada\*

Comparison of mechanical, enzymatic and mechanical-enzymatic disaggregation techniques in extraction of lymphocytary populations and macrophages in tissues with chronic advanced periodontitis

Juanita López Barrera\* \*  
 Patricia Quijano Gómez\*\* \*\*  
 Lina Suárez Londoño\*\*\* \*\*\*  
 Nelly Stella Roa Molina\* \*\*\*\*

Univ Odontol 2007 Ene-Dic; 26(58): 26-33

## RESUMEN

**ANTECEDENTES:** En este estudio se compararon tres técnicas de disgregación en la recuperación de poblaciones linfocitarias y macrófagos en tejidos con periodontitis crónica avanzada. **OBJETIVO:** comparar, por citometría de flujo, el recuento de poblaciones linfocitarias y macrófagos de biopsias de tejidos periodontalmente afectados, con tres procesos previos de disgregación celular (mecánica, enzimática con colagenasa y mecano-enzimática) para observar cuál de éstos es más efectivo en la recuperación celular y produce menos alteraciones en los marcadores de superficie. **MÉTODOS:** Se realizó un estudio descriptivo comparativo donde se eligió una muestra de 11 biopsias de

tejidos con periodontitis crónica avanzada. El procedimiento consistió en tomar las biopsias por medio de biseles internos que se colocaban en un Eppendorf con el medio de transporte. En el grupo 1 se realizó la técnica de disgregación mecánica Medimachine®, en el grupo 2 técnica enzimática (colagenasa 2%), y en el grupo 3 técnica mecano-enzimática (Medimachine® y colagenasa 2%). Posteriormente las muestras fueron analizadas por un citómetro de flujo FACS-Aria (Becton Dickinson San José California). **RESULTADOS:** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las tres técnicas de disgregación en la recuperación de poblaciones linfocitarias; sin embargo, hubo una mayor recuperación de macrófagos con la técnica mecano-enzimática comparada con la mecánica, siendo es-

tas diferencias estadísticamente significativas. **CONCLUSIONES:** Las tres técnicas estudiadas presentaron resultados comparables en cuanto a recuperación y daño a los marcadores de superficie, por lo cual, por tiempo y costo, se aconseja realizar una técnica mecánica con Medimachine®.

## PALABRAS CLAVE

Técnica de disgregación mecánica, técnica de disgregación enzimática, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, aislamiento celular, enfermedad periodontal, tejidos periodontales y gingivales, etiopatogenia

## ÁREAS TEMÁTICAS

Inmunología, técnicas de laboratorio

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Three disaggregation techniques for the recovery of lymphocyte and macrophage populations from tissues with advanced chronic periodontitis were analyzed. **OBJECTIVE:** Compare by flow cytometry the recovery of lymphocyte and macrophage populations from biopsies of periodontal tissues with periodontitis by using three processes of cellular disaggregation (mechanical, enzymatic with collagenase and mechanical-enzymatic) to observe which of these is more effective and produces fewer alterations in the surface markers. **METHODS:** A comparative descriptive study was carried out with a sample of

\* Artículo correspondiente al trabajo de grado para optar al título de especialista en Periodoncia y patología y cirugía.

\*\* Odontóloga, patóloga y cirujana oral, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia.

\*\*\* Odontóloga, periodoncista, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia.

\*\*\*\* Odontóloga, periodoncista, magistra en Inmunología, docente. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia. Directora del trabajo.

\*\*\*\*\* Odontóloga, magistra en Inmunología, docente. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia. Directora del trabajo.

11 biopsies of tissues taken from sites with advanced chronic periodontitis. The procedure consisted of taking the biopsies by means of internal bevels and placing them in an Eppendorf for transportation. In group 1, the mechanical technique of disaggregation (Medimachine®) was carried out. In group 2, the enzymatic technique (collagenase 2%) was used. In group 3, the mechanical-enzymatic technique (Medimachine® and collagenase 2%) was performed. Later on, the samples were analyzed with a FACS-Aria cytometer (Becton Dickinson San José California). RESULTS: There were not statistically significant differences among the three disaggregation techniques for the recovery of lymphocyte populations. However, there was a bigger recovery of macrophages with the mechanical-enzymatic technique when compared to the other two techniques, being statistically significant. CONCLUSIONS: The three techniques studied produce similar results in the recovery and damage to the surface markers; hence, considering time and cost constraints, it is advisable to carry out the mechanical technique with Medimachine®.

#### KEY WORDS

Mechanical disaggregation, enzymatic disaggregation, T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, cellular isolation, periodontal disease, periodontal and gingival tissues, etiopathogenesis

#### THEMATIC FIELDS

Immunology, lab techniques

#### INTRODUCCIÓN

La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria que compromete el aparato de soporte del diente. Tiene como factor etiológico primario la placa bacteriana y se puede dividir según su patrón de progresión en dos grandes grupos, periodontitis crónica y periodontitis agresiva.<sup>1</sup>

El mecanismo por el cual progresa el daño tisular en la periodontitis tiene dos componentes: el primero de ellos, la acción directa de los microorganismos mediante la producción de enzimas proteolíticas, y el segundo y más importante en la progresión de la enfermedad periodontal es el efecto indirecto de las bacterias al inducir la activación del sistema inmune del huésped contra la infección, provocando un aumento en el daño tisular. Ello puede deberse a la hiperactividad de factores del huésped ante un reto bacteriano aumentado en el área del surco gingival.<sup>2,3</sup>

Existen clásicos de la literatura que discuten las poblaciones celulares presentes en la lesión periodontal y se han tomado como base para la creación de modelos teóricos que intentan explicar la progresión de ésta como un fenómeno de inmunopatogénesis. Sin embargo, en la literatura los datos en cuanto a poblaciones celulares que infiltran la lesión son controversiales y hasta confusos.<sup>2,4</sup> Uno de los estudios que ha guiado el desarrollo de modelos de progresión del daño en enfermedad periodontal fue escrito por Page y Schroeder en 1976 en el cual se describe la lesión periodontal histopatológicamente en cuatro etapas: inicial y temprana, que se caracterizan por tener un infiltrado inflamatorio donde predominan los neutrófilos y los macrófagos; y establecida y avanzada, en las cuales están involucrados los linfocitos T, B y células plasmáticas.<sup>2</sup>

La importancia de la inmunidad humoral en la enfermedad periodontal también ha sido discutida, ya que se ha observado la presencia de un gran número de linfocitos B y células plasmáticas en lesiones periodontales en estados avanzados, por lo cual las células de la inmunidad adquirida responsables de la producción de anticuerpos siguen siendo parte im-

portante en todos los modelos de progresión del daño.<sup>2,5,6</sup> Los reportes de la literatura con respecto al número de diferentes poblaciones celulares que infiltran la lesión son muy variados, encontrándose que en pacientes con periodontitis crónica hay rangos de proporciones de linfocitos T CD4 y CD8 entre 0.94 a 9.2<sup>5,7-11</sup>; porcentajes de macrófagos que van de 9,3% a 6,7%<sup>12,13</sup> y de células B que están entre un 1 y 35%.<sup>6,9,11,14</sup> Estas diferencias en los reportes de la literatura pueden deberse al tipo de muestra analizada, a la toma de dicha muestra y a la técnica mediante la cual se realizó el análisis.

Las muestras para detectar poblaciones celulares presentes en las lesiones periodontales pueden ser obtenidas de sangre periférica, fluido gingival o biopsias gingivales de pacientes sanos y afectados. Las técnicas para extraer y marcar las poblaciones celulares también son variadas; existen diferentes técnicas de marcación directa de poblaciones celulares sobre los tejidos que incluyen la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia.<sup>15</sup>

También existen otras técnicas como el análisis por citometría de flujo que permite realizar múltiples marcajes, detectar y caracterizar poblaciones celulares, y almacenar la información obtenida para poder realizar un análisis de significancia estadística. Pero para poder llevarlo a cabo es necesario un procesamiento previo de los tejidos mediante una disgregación mecánica o enzimática para obtener las células que se van a estudiar.<sup>16</sup> Las técnicas de disgregación o extracción celular separan grupos celulares de la matriz extracelular para ser estudiadas. Cuando el tejido es sólido, se emplean métodos mecánicos o enzimáticos con base en tripsina, proteasas, colagenasas, hialuronidasas, DNAasa o cocteles

de ellas. Todos estos procedimientos tienen limitaciones (alteración de las características celulares, expresión de antígenos de membrana y marcadores de superficie) las cuales podrían estar asociadas con errores en los resultados.

Se ha demostrado que tanto la disgregación mecánica como la enzimática están asociadas a un alto daño tisular y baja recuperación de células.<sup>17</sup> En un estudio realizado para detectar células NK en tejido pulpar, se encontró que no hubo una población celular homogénea para establecer la presencia de células NK en las muestras analizadas y se llegó a la conclusión de que la colagenasa puede inducir alteraciones en las moléculas de membrana como fue el caso de los marcadores de las células NK (CD16/CD56) y de los marcadores de Linfocitos T CD4 (CD4 T helper) observados en una biopsia de tejido periodontal. La colagenasa también puede dañar epitopes que son reconocidos por los anticuerpos monoclonales.<sup>18</sup> También se han analizado poblaciones celulares en tejido gingival humano extrayendo células con enzimas como la colagenasa, encontrándose que ésta no afecta la viabilidad de las células ni a sus marcadores de superficie.<sup>13</sup> Por otro lado, al comparar la efectividad de dos técnicas de disgregación celular una mecánica y otra enzimática en biopsias de mucosa gástrica y bazo en una población de roedores, se encontró que con la utilización de enzimas como la colagenasa se obtenía una menor recuperación celular.<sup>14</sup> En otro estudio, en el cual se llevó a cabo una extracción de linfocitos T de linfomas, utilizando dos procesos de disgregación mecánica por medio del Medimachine® (BD), con previa y sin previa digestión con colagenasa, se encontró que al utilizar en conjunto las dos técnicas (colagenasa y Medimachine) se recuperaban de 1.3 a 6.9 veces más células viables.<sup>17</sup> Por otro lado, se

analizaron poblaciones de linfocitos en hígado humano y se determinó cómo afectaba el uso de las técnicas de disgregación mecánica y enzimática a los marcadores de superficie, encontrándose que enzimas proteolíticas como colagenasa y DNAasa no afectaban de manera significativa a CD45, CD3, CD19, CD4, CD8, CD5, CD7 y CD45RA, pero sí había una reducción en la expresión del marcador CD56 en un 29%.<sup>19</sup>

Todas estas variaciones en la literatura con respecto a la recuperación celular por medio de diferentes técnicas de disgregación crean controversia, sobre cuál de éstas es la más efectiva para el estudio de poblaciones celulares en tejidos periodontalmente afectados. Por lo tanto, es importante observar si ésta puede ser la causa de la variabilidad de los reportes en relación con las células que infiltran la lesión en tejidos periodontalmente afectados. El objetivo del presente estudio fue comparar el recuento de poblaciones linfocitarias y de macrófagos, por medio de un análisis de citometría de flujo de biopsias de tejidos periodontalmente afectados, con tres procesos previos de disgregación celular (mecánica, enzimática con colagenasa y mecano-enzimática) para observar cuál de éstos, es el más efectivo en la recuperación celular y produce menos alteraciones en los marcadores de superficie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El tipo de diseño fue descriptivo comparativo. La población estaba constituida por pacientes de la clínica de posgrado de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, con diagnóstico de periodontitis crónica avanzada que requirieran procedimientos quirúrgicos como raspaje y alisado radicular a campo abierto y/o exodoncias indicadas. Se excluyó a los pacientes que habían estado bajo antibioticoterapia o

corticoesteroides y/o sistémicamente comprometidos, mujeres embarazadas y aquellos que hubieran recibido tratamiento periodontal seis meses antes de la toma de la muestra. Se eligió una muestra de carácter intencional que consistió de 11 biopsias de tejidos con periodontitis crónica avanzada. La toma de la biopsia se llevó a cabo realizando biseles internos que incluyeran epitelio surcular, de unión y tejido conectivo. Luego las muestras fueron transportadas en un Eppendorf de 1,5 ml con medio transporte (RPMI 1640 con 2Mm de L-glutamina, 25mM, Suero fetal bovino al 10%, penicilina 50 U/ml y estreptomycinina 50 tg/ml) y eran procesadas dentro de las primeras 2 horas para evitar alteraciones en la viabilidad y expresión de los marcadores de superficie.

**Extracción celular:** Después de retirar las muestras del medio de transporte, eran lavadas con amortiguador de separación (PBS 1X2 mM EDTA, pH 7.4 –Farmacia– BSA al 0,5%) para eliminar el exceso de sangre, con ayuda de una jeringa estéril. La biopsia era pesada y dividida en tres porciones iguales para la respectiva técnica. Seguido a este procedimiento se colocaba cada porción en un Eppendorf previamente marcado con un contenido de 500 µl de amortiguador de separación y se prosiguió a realizar cada técnica de disgregación.

**Grupo 1 disgregación mecánica:** en donde la porción de tejido era transportada al Medicon® por medio de pinzas algodonerías con 1 ml de amortiguador de separación y se realizaban dos ciclos de corte por un minuto en el Medimachine® (BD). Con ayuda de una jeringa desechable estéril, la suspensión era aspirada y filtrada en Filcons® de 70µm, para proceder a un lavado con 6 ml de amortiguador de separación. La suspensión se centrifugó a 2000 rpm por diez minutos para luego descartar el sobrenadante; por últi-

mo el botón fue resuspendido en 300  $\mu$ l de amortiguador de marcación.

**Grupo 2 disgregación enzimática:** la porción de tejido era transportada a tubos de poliestireno de 12 x 75 mm que contenían un volumen de 10 ml de medio completo. Luego era centrifugarla a 2000 rpm por cinco minutos descartando el sobrenadante. Al botón resultante se le agregó la solución stock de colagenasa en una concentración de 2,5 ml x 1 g ó menos (Sigma Chemical Co). Posteriormente, la muestra era incubada a 37°C con agitación por 45 minutos. Pasado el tiempo se colocaron 5 ml de medio completo frío para detener la acción de la colagenasa y se procedió a macerar el tejido en una caja de petri ayudándose con la base de un tubo de vidrio. El material fue recogido con medio completo por medio de una jeringa estéril y se pasó por un Filcon® ubicado en un tubo de poliestireno (este proceso se realizó por lo menos dos veces). Una vez filtrada la muestra, se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, y la suspensión se filtró nuevamente con el Filcon® ubicado en un tubo de poliestireno con 6 ml de amortiguador de separación. Finalmente, se llevó a centrifugar nuevamente a 2000 rpm por diez minutos; se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 300  $\mu$ l de amortiguador de marcación.

**Grupo 3 disgregación mecano-enzimática:** la porción de tejido era transportada a tubos de poliestireno de 12 x 75 mm que contenían un volumen de 10 ml de medio completo. Luego se centrifugó a 2000 rpm por cinco minutos descartando el sobrenadante. Al botón resultante se le agregó la solución stock de colagenasa en una concentración de 2,5 ml x 1 g o menos (Sigma Chemical Co). Posteriormente, la muestra se incubó a 37°C con agitación por 45 minutos. Pasado ese tiempo, se colocaron 5 ml de medio completo frío para detener la acción de la colagenasa y se procedió a

centrifugar a 2000 rpm por diez minutos. El primer botón de células más el tejido disgregado fue transportado al Medicon con 1 ml de amortiguador de separación y se realizaron dos ciclos de corte por un minuto en el Medimachine®. La suspensión fue aspirada con una jeringa desechable estéril para filtrarla con Filcons® de 70  $\mu$ m. Luego se realizó un lavado con 6 ml de amortiguador de separación y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Por último, se descartó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de PBS, se centrifugó nuevamente a 2000 rpm por 5 minutos y se resuspendió el botón en 300  $\mu$ l de buffer de marcación.

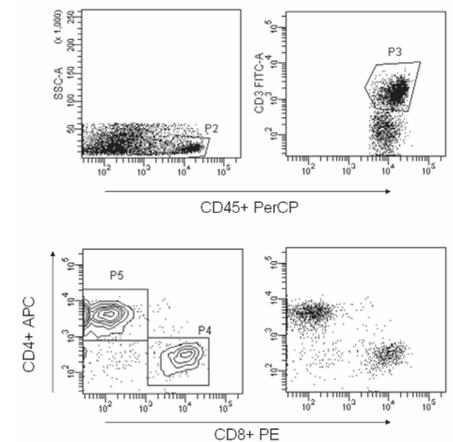
**Marcación de muestras con anticuerpos monoclonales:** Para cada técnica de disgregación se utilizaron los siguientes tubos marcados con su respectivo anticuerpo monoclonal:

- Tubo 1: células solas.
- Tubo 2 para LT: se utilizó 15  $\mu$ l del Multi-test que contenía CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCp/CD4- APC.
- Tubo 03 para LB y macrófagos: se utilizó 10  $\mu$ l de CD163 PE, 10  $\mu$ l de CD19 PercPe, 3  $\mu$ l de CD45 -APC y 5  $\mu$ l de CD3-FITC.

Los anticuerpos, una vez que estaban fuera de la nevera, se conservaban en hielo para realizar la marcación. Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante treinta minutos en oscuridad a 4°C. Pasado este tiempo, se les adicionaron 2 ml de amortiguador de marcación (PBS con 0,09% de Azida de Na y SFB 2%, pH.7.4). Se centrifugó por 5 minutos a 1750 rpm y se descartó el sobrenadante. Finalmente se fijaron las células en 500  $\mu$ l con amortiguador de fijación (paraformaldehído 2% en PBS 1X pH 7.2). Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su lectura en el citómetro de flujo.

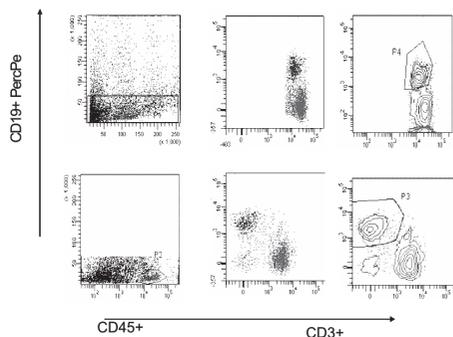
### **Análisis por citometría de flujo:**

Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACS-Aria (Becton Dickinson, San José California). Los resultados eran analizados por el software FACSDiva, en gráficos de puntos y contornos y fueron dados por porcentajes. Los linfocitos B y T se obtenían a partir de la población CD45+ (P2), la cual fue recuperada de la región linfocitaria (P1) caracterizada por células pequeñas y de baja granularidad (Figuras 1 y 2).

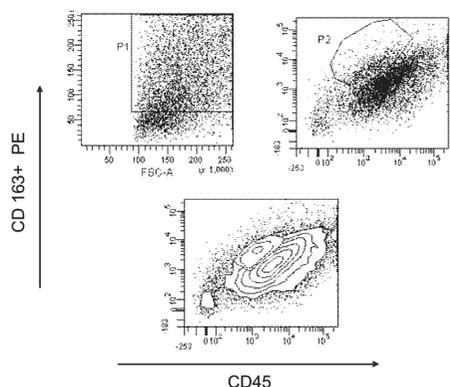


**Figura 1.** Esquema de puntos y contornos de poblaciones celulares de linfocitos T.

Las células CD163+/CD45+ (P2) fueron obtenidas a partir de la región comprendida por células de tamaño y granularidad intermedia (P1) (figura 3). La recolección de la información se realizó por medio de una ficha en donde eran registrados el número de la biopsia y de eventos, al igual que el porcentaje de CD3, CD4, CD8, CD19 y CD163. Para la presentación de los resultados de cada una de las variables incluidas en el estudio se utilizó una estadística descriptiva para el cálculo de frecuencias (absolutas y relativas), medidas de posición o de tendencia central (moda, media y mediana) y medidas de dispersión (desviación estándar). Y para el manejo cualitativo de las variables (comparación del recuento de las tres técnicas de disgregación) se realizó la prueba T Wilcoxon.



**Figura 2.** Esquema de puntos y contornos de poblaciones celulares de linfocitos B.

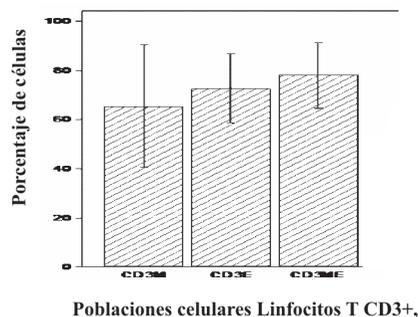


**Figura 3.** Esquema de puntos y contornos de poblaciones celulares de macrófagos CD163+

## RESULTADOS

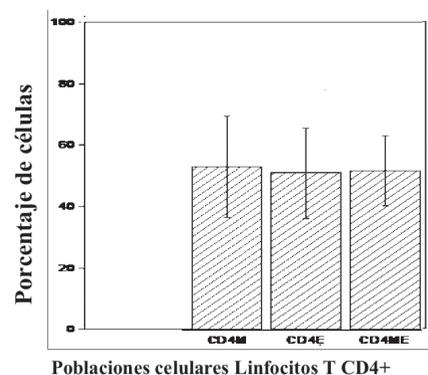
La muestra final estuvo conformada por 9 biopsias, ya que se excluyeron dos debido a problemas en el proceso técnico, puesto que las poblaciones celulares encontradas no estaban dentro de los parámetros de las demás muestras. Al analizar los resultados con respecto al recuento de linfocitos T CD3, la técnica de disgregación celular mecánica presentó una media aritmética de 65,38% con un valor máximo de 86,9% y un valor mínimo de 15,7% ( $SD_{\pm 24.94}$ ). La técnica de disgregación celular enzimática presentó una media aritmética de 67,45% con un valor máximo de 93,9% y un valor mínimo de 55,5% ( $SD_{\pm 14.21}$ ). La técnica de disgregación celular mecano-enzimática presentó una media aritmética 75,5%

con un valor máximo de 92,5% y mínimo de 52,4.8% ( $SD_{\pm 13.36}$ ) (figura 4).



**Figura 4.** Poblaciones celulares de linfocitos T CD3+

Con respecto a los linfocitos T CD4, la técnica de disgregación celular mecánica presentó una media aritmética de 53,24% con un valor máximo de 86,3% y un valor mínimo de 31,67% ( $SD_{\pm 16.60}$ ). La técnica de disgregación celular enzimática presentó una media aritmética de 55,34% con un valor máximo de 71,56% y un valor mínimo de 21,88% ( $SD_{\pm 14.76}$ ). La técnica de disgregación celular mecano-enzimática presentó una media aritmética 55,14% con un valor máximo de 71,89% y un valor mínimo de 31,62% ( $SD_{\pm 11.46}$ ) (figura 5).



**Figura 5.** Poblaciones celulares de linfocitos T CD4+

Con respecto al recuento de linfocitos T CD8, la técnica de disgregación celular mecánica presentó una

media aritmética de 46,77% con un valor máximo de 68,32% y un valor mínimo de 13,7% ( $SD_{\pm 16.60}$ ). La técnica de disgregación celular enzimática presentó una media aritmética de 44,68% con un valor máximo de 78,11% y un valor mínimo de 28,57% ( $SD_{\pm 14.74}$ ). La técnica de disgregación celular mecano-enzimática presentó una media aritmética 44,85% con un valor máximo de 68,37% y un valor mínimo de 28,16% ( $SD_{\pm 11.45}$ ).

Con respecto al recuento de linfocitos B, la técnica de disgregación celular mecánica presentó una media aritmética de 30,04% con un valor máximo de 60,6% y un valor mínimo de 2,36% ( $SD_{\pm 18.96}$ ). La técnica de disgregación celular enzimática presentó una media aritmética de 27,51% con un valor máximo de 55% y un valor mínimo de 8,5% ( $SD_{\pm 16.83}$ ). La técnica de disgregación celular mecano-enzimática presentó una media aritmética de 28,84% con un valor máximo de 52,6% y un valor mínimo de 16,6% con una  $SD_{\pm 14.71}$ .

Con respecto al recuento de macrófagos, la técnica de disgregación celular mecánica presentó una media aritmética de 14,56% con un valor máximo de 24,9% y un valor mínimo de 5,9% ( $SD_{\pm 6.16}$ ). La técnica de disgregación celular enzimática presentó una media aritmética de 15,63% con un valor máximo de 37% y un valor mínimo de 3,7% ( $SD_{\pm 10.60}$ ). La técnica de disgregación celular mecano-enzimática presentó una media aritmética 20,03% con un valor máximo de 32,5% y un valor mínimo de 4,6% ( $SD_{\pm 8.67}$ ).

En el análisis de los resultados se observó una alta variabilidad de los datos con unos rangos bastante amplios y la recurrencia de valores extremos en casi todos los grupos. La distribución de las poblaciones se mantiene al mismo nivel.

Al comparar por pares utilizando la prueba T Wilcoxon se encontró que en los CD3+ no hay diferencias estadísticamente significativas en relación con la cantidad de células obtenidas con los tres métodos de disgregación. Sin embargo, se observó que al parear las técnicas mecánica y mecano-enzimática hubo una tendencia a recuperar más células con la técnica mecano-enzimática. Las subpoblaciones CD8+ y CD4+ no presentaron diferencias significativas, aunque se observó una tendencia a recuperar más células CD8+ con la técnica mecánica al ser comparada con la técnica enzimática; por el contrario, se tiende a recuperar más células CD4+ con la técnica enzimática. Los linfocitos B presentaron un comportamiento similar para las tres técnicas sin diferencias estadísticamente significativas. Para los macrófagos sólo se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la técnica mecánica con la mecano-enzimática, siendo mayor la recuperación celular con la técnica mecano-enzimática ( $p = 0.0488$ ).

## DISCUSIÓN

En la etiopatogenia de la enfermedad periodontal las células cumplen una función vital, por ello han sido estudiadas por medio de diferentes métodos como microscopía, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo, el cual se llevó a cabo en este estudio porque permite observar la morfometría y enumerar varios tipos de células con múltiples conteos y secciones para posteriormente realizar un análisis de significancia estadística. Las muestras que se analizan pueden ser obtenidas de sangre periférica, fluido gingival o biopsias gingivales de pacientes sanos y afectados. Estas últimas traen información más representativa de las células que pueden estar presentes en el sitio de la lesión, pero para poder analizarlas es necesario que se apliquen diferentes protocolos de aislamiento mecánico, enzimático o

mecano-enzimático. En este estudio se quiso identificar cuál de las técnicas aplicadas era la más efectiva en la obtención de linfocitos T CD3+ y de CD3+ CD4+, linfocitos B CD19+ y macrófagos CD163+ en tejidos de pacientes periodontalmente afectados. No hay estudios en ningún tipo de tejido en donde se comparen las tres técnicas; además en biopsias de tejido periodontalmente afectado es muy escasa la literatura con este tipo de análisis.

La polémica que ha surgido alrededor del aislamiento de células es que en los reportes se mencionan que podría ocasionar daños a los marcadores de superficie. En un estudio realizado por García *et al.* por medio de un análisis de citometría de flujo no se encontró expresión del marcador CD4+ de tejido periodontal de un paciente al utilizar una disgregación enzimática con colagenasa en concentraciones de 1 mg por ml.<sup>18</sup> Ello es contrario a lo que se observó en el presente estudio donde las enzimas no afectaron de manera notable a los marcadores de superficie para las diferentes poblaciones celulares. Es importante tener en cuenta que en ese estudio sólo se analizó una biopsia de tejido periodontal, mientras que en el presente trabajo se analizaron 9 biopsias de las cuales se pudo obtener una mayor información.

Garzón *et al.* realizaron un análisis por citometría de flujo llevando a cabo una técnica de disgregación mecánica con Medimachine de células NK de 11 muestras de tejido pulpar sano (grupo experimental), y 3 muestras de tejido gingival inflamado (grupo control), utilizando marcadores de superficie CD4, / CD8, CD3 para linfocitos T y CD3/CD16/CD56 para células NK. Encontraron una población celular homogénea para ambos grupos sin ninguna alteración en los marcadores de superficie utilizados. El porcentaje de poblaciones celulares en tejido pulpar sano de CD3 fue de 0,80

a 5,76%, CD4 de 0,00 a 1,31%, para CD8 de 0,00 a 9,15% y para NK de 0,0 a 0,17%. En tejido periodontal el rango de CD3 fue de 1,29 a 14,80%, CD4 fue de 0,81 a 22,69%, CD8 0,28% a 14,62% Y NK de 0,00 a 0,11%.<sup>20</sup> En ese estudio hubo una variabilidad marcada entre el valor mínimo y el valor máximo de las poblaciones celulares al igual que en el actual trabajo, utilizando las tres técnicas de aislamiento celular, por lo cual se podría pensar que las características celulares de la lesión no reflejan el estado clínico sobre el cual se basa el diagnóstico.

Novelli propone una combinación de métodos de separación mecánico (Medimachine) con enzimático (colagenasa 2%) y lo compara con el método mecánico por sí solo para hallar linfocitos T de linfomas cutáneos y los analizó por medio de citometría de flujo, utilizando los siguientes anticuerpos conjugados: FITC, Pe-, PerCP, y APC. Obtuvo una recuperación 1.3-6.9 veces más elevada con el tratamiento previo con colagenasa para todas las muestras (rangos entre 34.216-452.100 con pretratamiento vs. 20.110-195.875 con un promedio de 166.574 vs. 58.080), encontrando que estas diferencias eran estadísticamente significativas ( $p > 0.0001$ ). El número total de linfocitos obtenidos fue de 34.216 con el pretratamiento con colagenasa y de 25.850 con el Medimachine. Pero la deficiencia de ese estudio es que no reporta la cantidad de cada población linfocitaria por separado. Esos resultados difieren del presente estudio ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para las poblaciones linfocitarias. Para los macrófagos sí se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la técnica mecánica con la mecano-enzimática, teniendo una mayor recuperación celular con la técnica mecano-enzimática. Esto se presentó con los macrófagos y no con las poblaciones linfocitarias posiblemente debido a que

estas células tienen un mayor tamaño y granularidad y con la técnica combinada se permite un rompimiento parcial de la matriz extracelular con la digestión previa con colagenasa, facilitando su recuperación.<sup>17</sup>

Zhong *et al.* realizaron un estudio cuyo propósito era elegir cuál método de aislamiento entre la disgregación mecánica (malla de acero inoxidable con un calibre de 200), y enzimática (colagenasa IV y DNasa I) era la más apropiada para aislar linfocitos de murina hepática, llevando a cabo un conteo con microscopía y también analizando fenotípicamente las subpoblaciones linfocitarias y citoquinas intracelulares por medio de una citometría de flujo. Ellos encontraron un total de células de  $2.6 \times 10^6$  en la disgregación mecánica y de  $2.9 \times 10^6$  en la disgregación enzimática. Esa diferencia no fue estadísticamente significativa. En cuanto a los marcadores de superficie (CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, NK.1, DX5, y  $\alpha\beta$  - TCR) predigestión y posdigestión enzimática, hallaron que CD3, CD4, CD8, CD25, CD69 y  $\alpha\beta$  - TCR no presentaban alteración, sugiriendo que los marcadores afectados fueron los de las células NK. Los porcentajes de las subpoblaciones para la técnica mecánica fueron de (LT:  $36.96 \pm 4.68$ , NK:  $8.35 \pm 2.69$ , NKT  $13.48 \pm 4.25$  y células T  $\alpha\beta$ :  $12.6 \pm 2.74$ ) y para la técnica enzimática fueron de (LT:  $38.56 \pm 5.63$ , NK:  $13.35 \pm 4.61$ , NKT  $20.42 \pm 4.65$  y células T  $\alpha\beta$ :  $13.6 \pm 3.15$ ). En este estudio se concluyó que no hay diferencias en cuanto a la población y viabilidad de linfocitos hepáticos aislados con los dos métodos. Resultados comparables con el actual trabajo donde no se presentan diferencias significativas entre las técnicas para las poblaciones linfocitarias; sin embargo, es importante aclarar que en el presente estudio se dividía cada biopsia en tres partes, para realizar las diferentes técnicas de disgregación lo cual pudo

haber influido en la cantidad de células recuperadas para cada técnica.<sup>21</sup>

### CONCLUSIONES

Al analizar las poblaciones celulares (linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+, linfocitos B y macrófagos) por medio de la citometría de flujo, se encontró que no hay diferencias en cuanto a recuento de linfocitos B, linfocitos T CD3+ y de sus subpoblaciones CD4+ y CD8+, al realizar las diferentes técnicas de disgregación celular (mecánica, enzimática y mecano-enzimática).

Al analizar los macrófagos, se encontró que hay diferencias en cuanto a las poblaciones recuperadas entre las técnicas mecánicas y mecano-enzimática siendo mayor con la técnica mecano-enzimática. Esto se presentó posiblemente por un rompimiento parcial de la matriz extracelular con la colagenasa permitiendo una mayor recuperación debido a que estas células tienen mayor tamaño y granularidad que las poblaciones linfocitarias.

La enzima colagenasa tipo IV en las concentraciones utilizadas en este estudio, no afectó los marcadores de superficie CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ y CD163+, después de un periodo de incubación de cuarenta y cinco minutos.

Se podría pensar que las características celulares de la lesión no reflejan el estado clínico sobre el cual se basa el diagnóstico, ya que el porcentaje de células para las poblaciones estudiadas presentaron una alta variabilidad entre paciente y paciente.

### RECOMENDACIONES

Se recomienda para posteriores investigaciones, procesar las muestras tan pronto se recogen en el medio de transporte para evitar cualquier alteración de las células obtenidas. No hay diferencias en la recuperación de células entre las técnicas de disgregación celular,

por lo cual se recomienda por practicidad, disminución del tiempo y gastos, realizar una técnica de disgregación mecánica. Por último, no es importante no sobrepasar los 45 minutos de incubación con colagenasa ya que diferentes autores han relacionado el daño a los marcadores de superficie después de este tiempo y en el presente estudio no se presentaron alteraciones incubando las muestras con el tiempo correspondiente.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Wassenaar A, Reinhardus C, Thepen T, Inpijn A, Kievits F. Clonig. Characterization and antigen specificity of T-lymphocytes subsets extracted from gingival tissues of chronic adult periodontitis patients; *Infection and immunity* 1995 Jun; 63: 2147-53.
2. Page RC, Schroeder HE. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction; *Periodontology* 2000. 1997; 14: 9-11.
3. Suárez L, Ocampo AM, Dueñas RE, Rodríguez A. Relative proportions of T- cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with aggressive periodontitis; *J Periodontol* 2004 Sep; 75 (9): 1209-15.
4. Seymour GJ, Powell RN, Davies WJR. Conversion of a stable T cell lesion to a progressive of chronic inflammatory periodontal disease: a hypothesis; *J Clin Periodontol* 1979; 6: 267-77.
5. Okada HT, Kassai Y, Kida T. Lymphocytes subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. *J Perio Res* 1984; 19: 595-8.
6. Seymour GJ, Cole KL, Powell RN. Analysis of lymphocyte populations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues; *J Perio Res* 1985; 20: 571-9.
7. Cole K, Seymour GJ, Powell RN. Phenotypic and functional analysis of T cells extracted from chronically inflamed human periodontal tissues; *J Periodontol* 1987; 58: 569-73.
8. Taubman MA, Stoufi ED, Ebersole JL, Smith DJ. Phenotypic studies of cells from periodontal disease tissues; *J Perio Res* 1984; 19: 587-90.
9. Modeer T, Dahllof G, Axio E, Sundqvist KG. Subpopulations of lymphocytes in connective tissue from adolescents with periodontal disease. *Acta Odontol Escandivaca* 1990; 48: 153-9.
10. Lappin DF, Koulouri O, Radvar M, Hodge P, Kiname DF. Relative proportions of mononuclear cells types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry; *J Clin Periodontol*, 1999; 26: 183-9.
11. Zafirooulos G, Flores-de Jacoby L, Schoop B, Havemann K, Heuymanns J. Flow-cytometric analysis of lymphocyte subsets in patients with advanced periodontitis; *J Clin Periodontol* 1990; 17: 636-41.

12. Buduneli N, Bicakci N, Keskinoglu A. Flow-cytometry analysis of lymphocyte subsets and mD14 expression in patients with various periodontitis categories; *J Clin Periodontol* 2001; 28: 419-24.
13. Stoufi ED, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Preparation and characterization of human gingival cells; *J Perio Res* 1987; 22: 144-9.
14. Howard Hughs Medical Institute University of Michigan. Use of flow cytometry to quantify mouse gastric epithelial C Populations; *Dig-Dis-Sci* 2000; 45 (6): 1192-9.
15. Cotran R, Kumar V, Robbins SL. Robbins Pathologic Basis of Diseases, 5a. ed. Philadelphia PA: W.B. Saunders, 1994.
16. Goetzman. Flow cytometry: Basic concepts and clinical applications in immunodiagnostics; *Clin Lab Sci* 1993; 3 (6): 173-83.
17. Novelty M, Savoia P, Cambieri I, Ponti R, Comessatti A, Lisa F, Bemengo MG. Collagenase digestion a mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas; *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 423-31.
18. García J, Rey LF, Sepúlveda DP, Romero MC, Serpa MF, Moreno GC. *Presencia de células NK en tejido pulpar humano usando citometría de flujo: Fase de estandarización*. Trabajo de posgrado en endodoncia. Bogotá, Colombia: Universidad Santo Tomás, 2004.
19. Curry M, Norris S, Golden-Mason L, Doherty DG, Deignan T, Collins C, Traynor O, McEntee GP, Hegarty JE, Farrelly CO. Isolation of lymphocytes from normal adult human liver suitable for phenotypic and functional characterization *J Immunol Methods* 2000 Apr; 242: 21-31.
20. Garzón SP, Morales LC, Vasquez AJ, Vanegas MF, Romero MC, Serpa MF, Moreno GC. *Presencia de células NK en tejido pulpar humano sano*. Trabajo de posgrado en endodoncia. Bogotá, Colombia: Universidad Santo Tomás, 2004.
21. Zhong J, Wei H, Sun R, Gao B, Tian ZG. Isolation of murine hepatic lymphocytes using mechanical dissection for phenotypic and functional analysis of NK1.1 cells. *World J Gastroentero* 2004 Jul; 10 (13): 1928-33.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Genética y al Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana, por el aporte técnico para el desarrollo de esta investigación.

#### CORRESPONDENCIA

Lina Suárez  
Pontificia Universidad Javeriana,  
Facultad de Odontología,  
Departamento del Sistema  
Periodontal.  
Carrera 7 # 40-62, edificio 26.  
Bogotá D.C., Colombia.  
Teléfono: +57-1-3208320,  
extensión 2882.  
Correo electrónico:  
[lisuarez@yahoo.com](mailto:lisuarez@yahoo.com)

Nelly Roa  
Pontificia Universidad Javeriana,  
Facultad de Odontología,  
Centro de Investigaciones  
Odontológicas.  
Carrera 7 # 40-62, edificio 26.  
Bogotá D.C., Colombia.  
Correo electrónico:  
[nelly.roa@javeriana.edu.co](mailto:nelly.roa@javeriana.edu.co)

Juanita López  
Carrera 57A # 127-33.  
Bogotá D.C., Colombia.  
Teléfono: +57-1-6521220.  
Correo electrónico:  
[juanitalopezbarrera@yahoo.es](mailto:juanitalopezbarrera@yahoo.es)

Patricia Quijano  
Carrera 9A # 117A-55.  
Bogotá D.C., Colombia.  
Teléfono: +57-1-6379018.  
Correo electrónico:  
[patiqg@hotmail.com](mailto:patiqg@hotmail.com)