



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**  
**ÁREA DE PATOLOGÍA**  
**LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**INMUNOLocalización DEL COMPLEJO DE SEÑALIZACIÓN DE  
INTERLEUQUINA-6 EN LESIONES PERIAPICALES DE ORIGEN ENDODÓNTICO**

**Catalina Schweitzer Gatica**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Asistente Alejandra Fernández Moraga**

**Adscrito a Proyectos FONDECYT 1160741 y 1120138**

**Santiago - Chile**

**2018**





**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**  
**ÁREA DE PATOLOGÍA**  
**LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**INMUNOLocalización DEL COMPLEJO DE SEÑALIZACIÓN DE  
INTERLEUQUINA-6 EN LESIONES PERIAPICALES DE ORIGEN ENDODÓNTICO**

**Catalina Schweitzer Gatica**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Asistente Alejandra Fernández Moraga**

**Adscrito a Proyectos FONDECYT 1160741 y 1120138**

**Santiago - Chile**

**2018**

## DEDICATORIAS

*Quiero dedicar este trabajo a mi familia y amigos, por el cariño y apoyo incondicional a lo largo de todos estos años.*

## AGRADECIMIENTOS

*Mis más sinceros agradecimientos a la Doctora Marcela Hernández y a Alejandra Fernández por compartir sus conocimientos y guiarme a través de esta investigación, además al Laboratorio de Biología Periodontal por la ayuda entregada y gratos momentos.*

*Agradecer también a los proyectos FONDECYT 1160741 y 1120138, y al Laboratorio de Ecología y Recursos Naturales de la Universidad Andrés Bello por la ayuda y buena disposición otorgada.*

## ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3.1 Hipótesis	
3.2 Objetivo general	
3.3 Objetivos específicos	
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1 Diseño del estudio	
4.2 Obtención de las muestras	
4.3 Procedimiento histopatológico	
4.4 Inmunohistoquímica	
4.5 Inmunofluorescencia doble	
4.6 Evaluación de las muestras	
5. RESULTADOS	13
5.1 Características de los pacientes	
5.2 Localización celular de IL-6, IL-6R y gp-130 en lesiones apicales de origen endodóntico	
5.3 Localización celular del complejo receptor en lesiones epitelizadas y no epitelizadas	
5.4 Presencia del complejo de IL-6 en lesiones apicales de origen endodóntico según sintomatología	
5.5 Co-inmunolocalización de IL-6 e IL-6R en lesiones apicales	
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	27
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
9. ANEXOS Y APÉNDICES	33

## **1. RESUMEN**

### **INTRODUCCIÓN**

Las lesiones apicales (LA) se originan a partir de la respuesta inmune frente a la infección endodóntica. Histológicamente pueden corresponder a un granuloma o quiste apical, este último presenta revestimiento epitelial y derivaría de un granuloma preexistente.

IL-6 es una citoquina pleiotrópica expresada en altos niveles en lesiones periapicales, con efectos locales y potencialmente sistémicos. Actúa a través de un complejo receptor compuesto por IL-6R y la glicoproteína (gp) 130. Hasta ahora se desconoce su participación en lesiones periapicales y en la patogénesis de la evolución de un granuloma a quiste apical.

### **OBJETIVOS**

Determinar la inmunolocalización del complejo de señalización de IL-6 en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas y no epitelizadas de pacientes con periodontitis apical sintomática y asintomática.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se incluyeron LA de pacientes con diagnóstico clínico de periodontitis apical (n=15) sintomáticas y asintomáticas, a las cuales se les realizó diagnóstico anatomopatológico. Las muestras se procesaron por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia doble para determinar la presencia y localización de IL-6, IL-6R y gp-130.

### **RESULTADOS**

IL-6, IL-6R y gp-130 se inmunolocalizaron en células endoteliales y leucocitos mononucleares de lesiones no epitelizadas y epitelizadas. En las lesiones epitelizadas el complejo de señalización de IL-6 además se identificó en el epitelio proliferante y en el estrato basal del revestimiento epitelial, en un patrón de localización de membrana, y la intensidad fue disminuyendo hacia la superficie a

la altura del estrato espinoso. IL-6 e IL-6R se co-inmunolocalizaron en plasmocitos y linfocitos.

### **CONCLUSIONES**

IL-6, su receptor y gp-130 se encuentran en lesiones periapicales de origen endodóntico, específicamente leucocitos, células endoteliales y epitelio de quistes apicales, contribuyendo a explicar los efectos mediados por IL-6 durante la formación del revestimiento epitelial de quistes apicales.



## 2. MARCO TEÓRICO

Las lesiones apicales se originan como resultado de la respuesta inmune del hospedero frente a la infección endodóntica (Aw, 2016). Desde el punto de vista clínico, representan una manifestación de las formas crónicas de periodontitis apical (PA) que pueden presentarse sintomáticas o asintomáticas (Bernardi y cols., 2015; Garrido y cols., 2015). Éstas se caracterizan por la destrucción de los tejidos peri-radicales, particularmente del hueso alveolar, identificable en una radiografía periapical como una lesión radiolúcida; mientras que desde el punto de vista anatomopatológico una lesión periapical puede corresponder a un granuloma o quiste apical (Çalışkan y cols., 2016; Vidal, 2015).

El granuloma apical se caracteriza histológicamente por estar constituido por tejido de granulación. El quiste radicular está compuesto por una cavidad quística formada por tejido conectivo y delimitada por un revestimiento epitelial escamoso estratificado, con grados variables de inflamación (Bernardi y cols., 2015). Se propone que un granuloma preexistente podría evolucionar a un quiste radicular por estimulación inflamatoria de los restos epiteliales de Malassez incluidos en el periodonto, permitiendo la epitelización de la lesión, hasta generar el revestimiento epitelial completo que caracteriza al quiste (Bernardi y cols., 2015); sin embargo, los estímulos de señalización involucrados se desconocen.

El componente central de la patogenia de las lesiones apicales es la inflamación. Los leucocitos infiltrantes producen citoquinas pro-inflamatorias y osteolíticas, tales como, la interleuquina (IL)-6, IL-1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), entre otras (Garrido y cols., 2015). La IL-6 es una citoquina con una estructura de cuatro hélices de 184 aminoácidos (Rose-John, 2012), altamente pleiotrópica (Hernández-Caldera y cols., 2017), involucrada en procesos fisiológicos y patológicos (Hosokawa y cols., 2014). Presenta funciones en la regulación del sistema inmune y desempeña un papel central en infecciones bacterianas y virales. De forma general, IL-6 junto con otras citoquinas, está principalmente involucrada en la inflamación al controlar la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis de células diana. Sin embargo, también participa en una gran variedad

de procesos como el control metabólico del organismo, regeneración de tejidos, el desarrollo embrionario, la consolidación de la memoria (Rose-John, 2012; Scheller y cols., 2014), respuesta de fase aguda y patologías como el cáncer, obesidad, sepsis y enfermedades autoinmunes (Garbers y Rose-John, 2018). Su síntesis es inducida en diferentes tipos celulares por lipopolisacáridos (Wolf, 2014) y proteínas proinflamatorias, como IL-1 y TNF- $\alpha$ , con las cuales presenta efectos sinérgicos, estimulando la inflamación, osteoclastogénesis y la resorción ósea (Hernández-Caldera y cols., 2017). Adicionalmente, IL-6 es capaz de estimular la proliferación del tejido epitelial (Hernández-Caldera y cols., 2017).

El complejo de señalización de IL-6 está conformado por IL-6 (ligando), el receptor de IL-6 (IL-6R) y la subunidad del receptor, la cual corresponde a dos moléculas de glicoproteína 130 (gp-130) (Scheller y cols., 2014; Rose-John y cols., 2017). Existen dos mecanismos de señalización del complejo de IL-6: 1) La *forma clásica*, donde IL-6 soluble se une al receptor de IL-6 de membrana celular (IL-6Rm), el cual interactúa con las moléculas de gp-130 que se encuentran también en la membrana. La gp-130 es una glicoproteína de cadena de transducción de señal común que se encuentra en la mayoría de las células del organismo, a diferencia de IL-6R que sólo se ha detectado en hepatocitos, algunas células epiteliales, macrófagos, neutrófilos y algunos linfocitos (Scheller y cols., 2014). Por lo anterior, la presencia de IL-6Rm determina si una célula es o no sensible a IL-6; mientras que en aquellas células carentes del receptor de membrana, el efecto de IL-6 puede estar mediado por el mecanismo de trans-señalización (Rose-John y cols., 2017; Fig. 1). 2) La *trans-señalización* consiste en la unión de la IL-6 con el receptor soluble de IL-6 (IL-6Rs). Este complejo se une a las moléculas de gp-130 de la membrana celular, generando la homodimerización de éstas y siguiente señalización intracelular (Garbers y Rose-John, 2018; Fig.1).

La trans-señalización es importante en células madre embrionarias, hematopoyéticas, neuronales, células musculares lisas (Garbers y Rose-John, 2018) y células endoteliales (Scheller y cols., 2014). A diferencia de la mayoría de los receptores solubles, que actúan como antagonistas, IL-6Rs tiene propiedades agonistas y al formar un complejo con IL-6 activan células que presenten gp-130

en la superficie de membrana (Scheller y cols., 2014). La generación de IL-6Rs está mediada por dos mecanismos. El primero corresponde a una segmentación proteolítica de IL6-Rm, el cual depende de metaloproteasas de membrana, como ADAM17 y ADAM10 (Scheller y cols., 2011; Fig.1). El segundo mecanismo, que genera el 1 a 10% del receptor soluble, depende de corte y empalme alternativo del ARNm de IL-6R que codifica el dominio transmembrana (Wolf, 2014). Las formas solubles resultantes pueden interactuar con aquellas células que no expresan IL-6R unida a la membrana celular (Garbers y Rose-John, 2018).

Se ha demostrado que las diferentes formas de señalización de la IL-6 tienen diferentes funciones. La señalización clásica tiene actividades homeostáticas, antiinflamatorias y regenerativas, tales como regeneración de células epiteliales, inhibición de apoptosis epitelial y activación de la respuesta de fase aguda hepática (Rose-John, 2012). Además, participa en neovascularización y cicatrización (Korotaeva y cols., 2018). Estas actividades dependen de IL-6R unido a la membrana (Scheller y cols., 2014; Baran y cols., 2018). Por otro lado, la trans-señalización tiene actividades asociadas a patología, principalmente enfermedades inflamatorias y desarrollo del cáncer (Garbers y cols., 2011). Dentro de éstas se incluyen el reclutamiento de células inflamatorias, la inhibición de la apoptosis de células inflamatorias (Rose-John, 2012), proliferación de células T y regulación de la expresión de la molécula de adhesión en las células endoteliales (Scheller y cols., 2011). Es por esta razón que la trans-señalización tiene un rol importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas (Garbers y cols., 2011). Por lo tanto, las diferentes funciones de esta citoquina la definen como una proteína anti y proinflamatoria (Prso y cols., 2007).

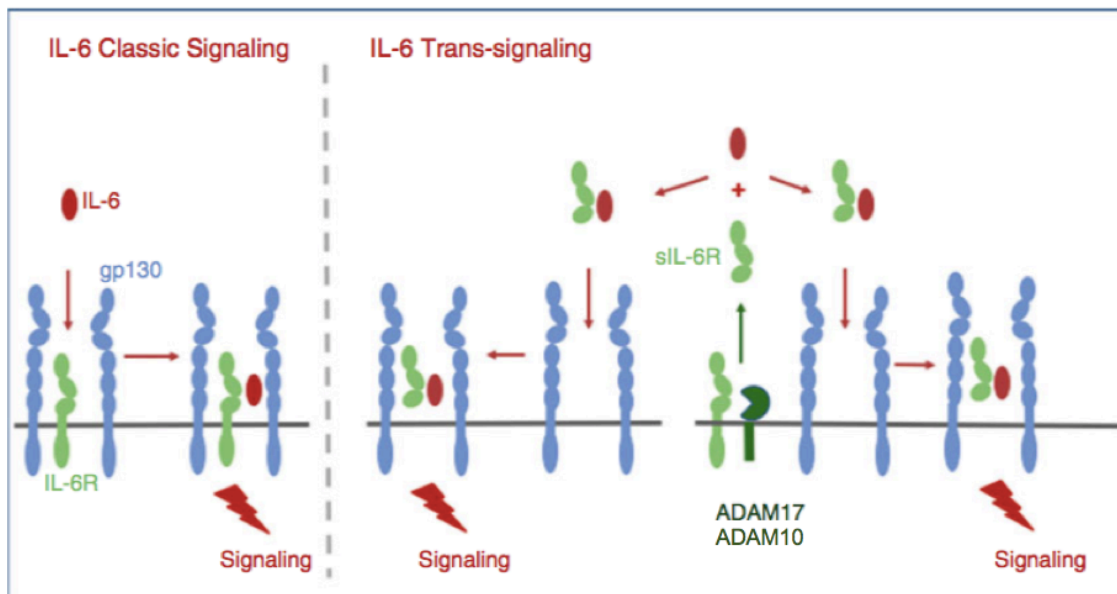


FIGURA 1. Señalización clásica y trans-señalización de IL-6. A la izquierda se grafica la *señalización clásica* de IL-6. IL-6 se une a IL-6Rm, y este complejo se asocia a gp-130 en la membrana celular. La *trans-señalización* se grafica al centro, donde IL-6 se une a IL-6Rs, y este complejo se asocia a las moléculas de gp-130 presentes en la membrana. Luego de conformado el complejo de señalización en su totalidad, en ambos casos, ocurre la homodimerización de gp-130 y se inicia la transducción de señales intracelulares. Extrema derecha: IL-6R se sintetiza en algunos tipos celulares específicos y luego es escindido por las metaloproteasas ADAM17 y ADAM 10 unidas a membrana para generar la forma soluble del receptor que permitirá la *trans-señalización* en otros tipos celulares que no lo expresan (Garbers y Rose-John, 2018).

En general, las principales células que sintetizan IL-6 son los monocitos, macrófagos, linfocitos B activados y neutrófilos. Sin embargo, también las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y adipocitos han demostrado síntesis de IL-6 (Graunaite y cols., 2011; Baran y cols., 2018). A nivel de las lesiones apicales, por un lado, se ha demostrado *in vitro* que los macrófagos y neutrófilos sintetizan IL-6 en respuesta a estímulos bacterianos (Azuma y cols., 2013). Por otro lado, se ha reportado que IL-6 se expresa en queratinocitos, mayormente a nivel del estrato basal, y células endoteliales de vasos sanguíneos cercanos al epitelio en quistes radiculares inflamatorios (Bernardi y cols., 2015). Adicionalmente, los niveles de IL-6 demostraron ser más altos en las lesiones apicales sintomáticas (Jakovljevic y

cols., 2015), epitelizadas (Radics y cols., 2003) y de mayor tamaño (Azuma y cols., 2013), comparadas con las lesiones apicales asintomáticas, no epitelizadas y de menor tamaño. También se ha reportado que el crecimiento quístico puede deberse a la estimulación endocrina de los queratinocitos por TNF-alfa e IL-6, y a la actividad osteolítica de estas citoquinas, que causa la pérdida ósea local (Prso y cols., 2007), esto último debido a que IL-6 puede inducir la formación de osteoclastos (Azuma y cols., 2013).

Con respecto al resto de los constituyentes del complejo de IL-6, la expresión de gp-130 es ubicua, y en los tejidos periapicales se ha detectado en ligamento periodontal sano; IL-6R, por otro lado no se ha detectado en el ligamento periodontal sano. Por el contrario, el receptor de IL-6 se ha detectado en lesiones apicales, sin embargo, se desconocen los tipos celulares en los cuales sería expresado. Sobre la base de lo anterior, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación determinó que el mecanismo de acción de IL-6 en tejido periodontal sano y lesiones periapicales estaría mediado vía trans-señalización. Este mecanismo, tendría relevancia en la regulación de la homeostasis periodontal y la respuesta inflamatoria sistémica y consecuente riesgo cardiovascular asociado a lesiones periapicales (Garrido y cols., 2015; Hernández-Caldera y cols., 2017). Respecto de la patogenia de las lesiones periapicales, estos antecedentes sugieren que el complejo de señalización de la IL-6 podría participar en la formación de un quiste radicular a partir de un granuloma preexistente. Sin embargo, los reportes sobre el complejo de señalización de la IL-6 en lesiones apicales humanas de origen endodóntico son escasos y se limitan a la expresión de IL-6, pero no del complejo receptor. El objetivo del presente estudio es determinar la inmunolocalización del complejo de señalización de IL-6 en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas y no epitelizadas.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

El complejo de señalización de interleuquina-6 se expresa durante la epitelización de las lesiones apicales de origen endodóntico de pacientes con periodontitis apical sintomática y asintomática.

#### **3.2 Objetivo general**

Determinar la inmunolocalización del complejo de señalización de IL-6 en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas y no epitelizadas de pacientes con periodontitis apical sintomática y asintomática.

#### **3.3 Objetivos específicos**

- Determinar la localización tisular de IL-6, IL-6R y gp-130 en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas y no epitelizadas.
- Caracterizar la localización tisular del complejo de IL-6 en lesiones apicales de origen endodóntico sintomáticas y asintomáticas.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1 Diseño del estudio**

Se realizó un estudio observacional descriptivo. El estudio está adscrito al Fondecyt 1160741, aprobado por el comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (Anexos 1-2).

#### **4.2 Obtención de las muestras**

Las muestras fueron obtenidas a partir de dientes con indicación de exodoncia en la clínica de Odontología de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago. Los *criterios de inclusión* fueron muestras de pacientes mayores de 18 años, con diagnóstico clínico de periodontitis apical, compatible radiográficamente con granuloma o quiste (lesión radiolúcida  $\geq$  a 3 mm), en dientes con caries dental, con respuesta negativa al test de sensibilidad pulpar, con o sin sintomatología a la percusión vertical. Los *criterios de exclusión* fueron pacientes con enfermedades sistémicas distinta a la descrita y/o con consumo de antibióticos y/o anti inflamatorios en los últimos 6 meses previos al estudio. Los antecedentes y examen clínico fueron registrados en una ficha clínica especialmente diseñada con este fin (Anexo 3). Las muestras se enviaron al Servicio de anatomía patológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, para su procesamiento.

Se obtuvieron un total de 15 muestras, distribuidas en cuatro grupos; lesiones epitelizadas sintomáticas (n=3), lesiones epitelizadas asintomáticas (n=5), lesiones no epitelizadas sintomáticas (n=2) y lesiones no epitelizadas asintomáticas (n=5).

#### **4.3 Procedimiento Histopatológico**

Se incluyeron muestras de tejido en parafina y se les realizó el procesamiento de rutina para el diagnóstico de lesión apical epitelizada (8) y no epitelizada (7). IL-6, IL-6R y gp-130 se inmunolocalizaron en secciones de tejido mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

#### 4.4 Inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes de 4  $\mu\text{m}$ , se desparafinaron, hidrataron y se realizó la recuperación antigénica con tampón citrato pH 6, se bloqueó la peroxidasa endógena mediante incubación con peróxido de hidrógeno/ metanol al 0,3% y se bloquearon las uniones inespecíficas con suero equino al 2,5% (Normal Horse Serum, R.T.U Vectastain Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Posteriormente, se incubaron los anticuerpos primarios; anti-IL-6, IL-6R y gp-130 humanos (# ab9324, # ab128008 y # ab202850, respectivamente, Abcam, Cambridge, MA) durante la noche en diluciones 1:500, 1:400 y 1:500, respectivamente. La inmunotinción se realizó con el kit comercial de revelado Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) que utiliza anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados con peroxidasa, según corresponda (R.T.U Biotinlated Universal Antibody Anti-rabbit/ mouse IgG) y DAB (Zymed Labs Inc, San Francisco, CA). Los procedimientos se realizaron según las indicaciones del fabricante respectivo. Finalmente, se efectuó la contratinción con hematoxilina de Mayer (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se montaron en portaobjetos.

#### 4.5 Inmunofluorescencia doble

Para realizar la inmunofluorescencia doble se realizó el mismo procedimiento anterior hasta la incubación con los anticuerpos primarios anti-IL-6 y anti-IL-6R, pero en diluciones de 1:10 y 1:75 respectivamente y con bloqueo de uniones inespecíficas mediante Blackground Block (Cell Marque, Rocklin, CA) y glicina 0,3M. Luego se lavaron las muestras con una solución salina tamponada con fosfato y detergente (PBS-tween 0,05%), y se incubaron los anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 anti-ratón de alpaca y Alexa Fluor® 647 anti-conejo de cabra apropiados (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA), en diluciones de 1:100 y 1:200 respectivamente, durante 6 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Finalmente se realizó el lavado con PBS-T 0,05% y se incubó con DAPI (Vector Laboratories) durante 3 minutos. Posteriormente los portaobjetos se montaron en tris 20 mM pH8 en glicerol al 90%. Las muestras se examinaron y capturaron usando un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Leica



Microsystems). Las imágenes digitales se procesaron con un software de edición de imágenes (Leica Application Suite X, Leica Microsystems) y se seleccionaron imágenes bidimensionales.

#### **4.6 Evaluación de las muestras**

La inmunolocalización de IL-6, IL-6R y gp-130 se realizó por dos anatomopatólogos independientes en un microscopio óptico y confocal, respectivamente dependiendo de la técnica inmunológica. Se adquirieron imágenes representativas utilizando una cámara digital montada en el microscopio. Los controles positivos y negativos se procesaron dentro de cada serie. Las células positivas se identificaron sobre la base de criterios morfológicos.

## 4. RESULTADOS

### 5.1 Características de los pacientes

Se incluyeron un total de 15 muestras de lesiones apicales de origen endodóntico, de las cuales, 8 correspondieron a lesiones apicales epitelizadas y 7 correspondieron a lesiones no epitelizadas. Las características clínicas y demográficas de los pacientes con periodontitis apical crónica se presentan en la tabla 1. No se obtuvieron los datos de 6 pacientes.

TABLA 1: Características clínicas y demográficas.

Diagnóstico	Nº	Asintomáticas (n)	Sintomáticas (n)	Mujeres (%)	Edad (Mediana (RIQ))
L.A. epitelizada	8	5	3	80	37 (25,5)
L.A. no epitelizada	7	5	2	50	30 (17,75)

\*L.A: Lesión apical; RIQ: Recorrido intercuartílico.

## 5.2 Localización celular de IL-6, IL-6R y gp-130 en lesiones apicales de origen endodóntico

El complejo de señalización de IL-6 se detectó en todas las muestras de lesiones apicales evaluadas, y su localización se identificó principalmente en el infiltrado inflamatorio y epitelio de las lesiones (Fig. 2). Este patrón de localización fue similar para lesiones epitelizadas y no epitelizadas.

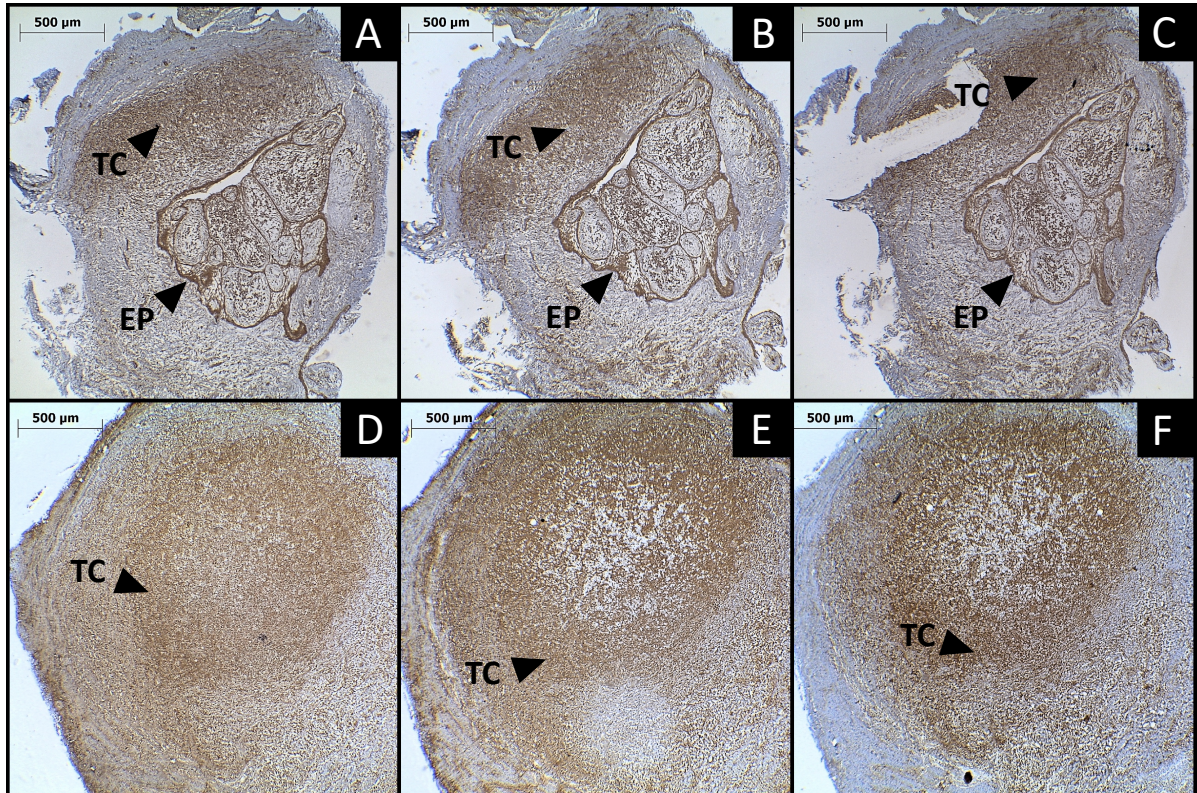


FIGURA 2. Inmunodetección de IL-6, IL-6R y gp-130 en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas y no epitelizadas. (A-C) Lesiones epitelizadas 4x, (D-F) lesiones no epitelizadas 4x. (A y D) IL-6, (B y E) IL-6R, (C y F) gp-130. EP: Inmunotinción positiva en epitelio. TC: Inmunotinción positiva en tejido conectivo inflamado en lesiones epitelizadas y no epitelizadas.

### 5.3 Localización celular del complejo receptor en lesiones epitelizadas y no epitelizadas

IL-6, IL-6R y gp-130, tanto en las lesiones apicales epitelizadas como no epitelizadas se inmunolocalizaron mayoritariamente en células mononucleares del infiltrado inflamatorio, particularmente en linfocitos, células tipo macrófago, plasmocitos y células endoteliales. Además, se observaron algunos neutrófilos inmunopositivos. En lesiones epitelizadas se identificó además inmunopositividad para IL-6, IL-6R y gp-130 en el tejido epitelial. De interés, particularmente IL-6R en tejido epitelial se inmunolocalizó en un patrón de superficie de los queratinocitos del epitelio de revestimiento maduro; no así en el epitelio inmaduro proliferante de granulomas, donde el patrón fue difuso (Fig. 3, 4 y 5).

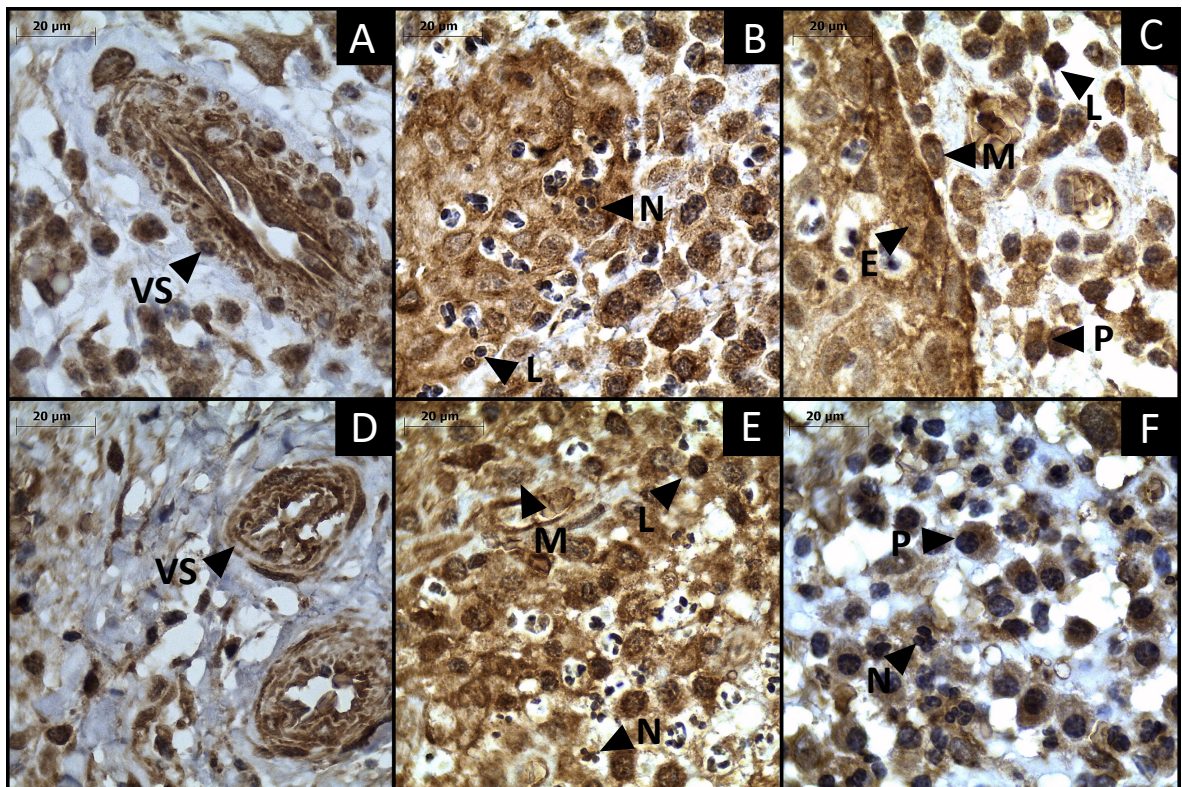


FIGURA 3. Inmunolocalización de IL-6 en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas y no epitelizadas. (A-C) Lesiones epitelizadas 100x, (D-F) lesiones no epitelizadas 100x. P, células plasmáticas. L, linfocitos. N, Neutrófilos. E, células epiteliales. M, células tipo macrófago. VS, vaso sanguíneo.

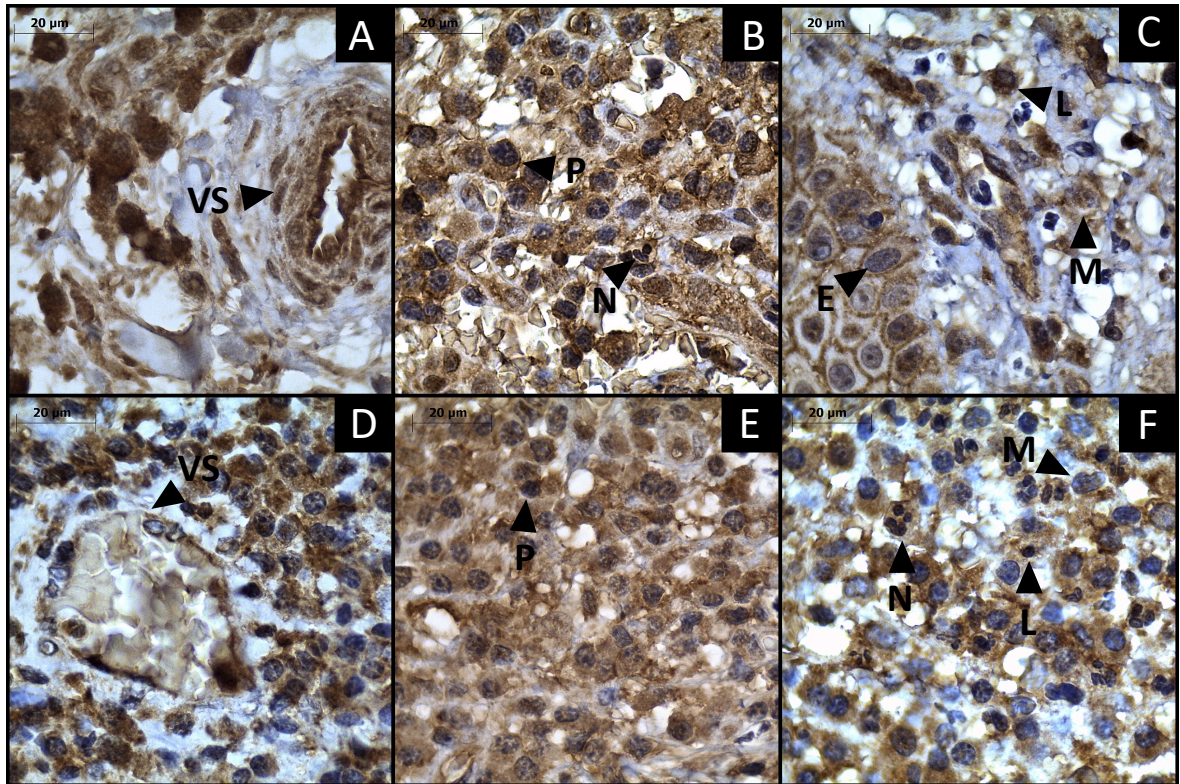


FIGURA 4. Inmunolocalización de IL-6R en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas y no epitelizadas. (A-C) Lesiones epitelizadas 100x, (D-F) lesiones no epitelizadas 100x. P, células plasmáticas. L, linfocitos. N, Neutrófilos. E, células epiteliales. M, células tipo macrófago. VS, vaso sanguíneo.

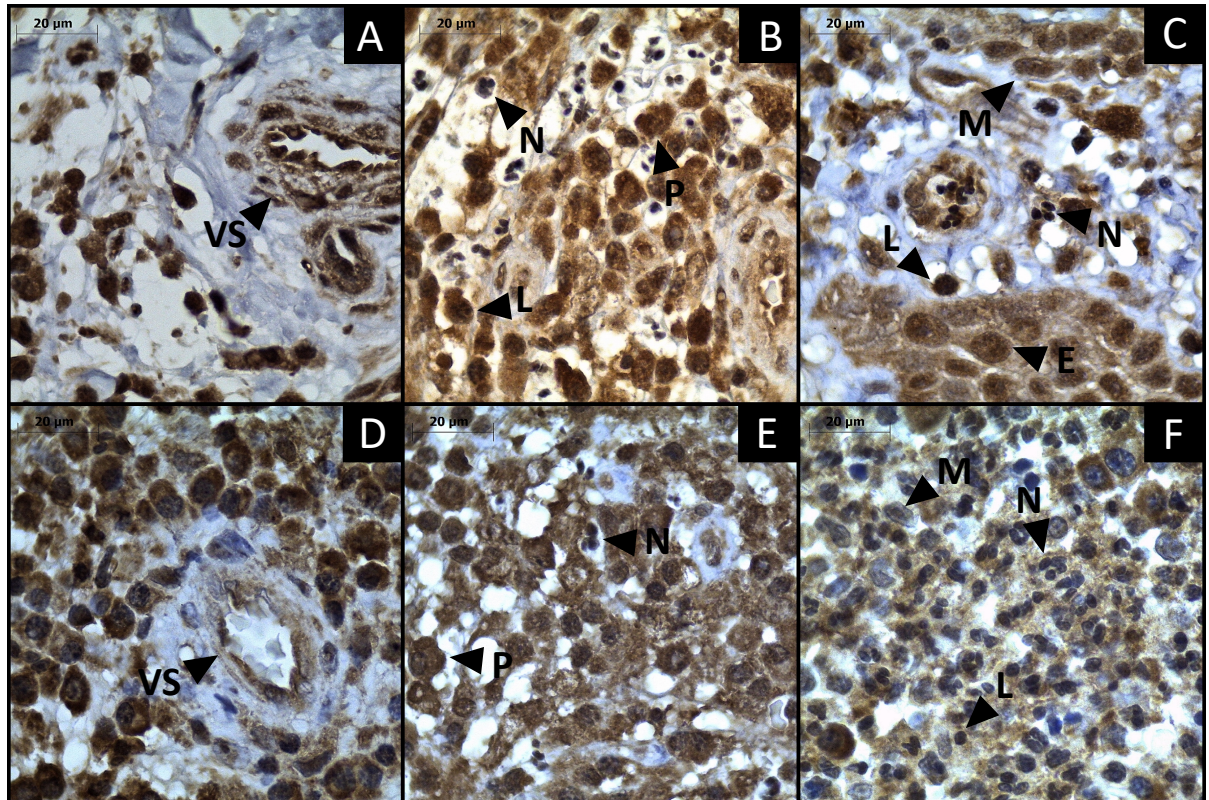


FIGURA 5. Inmunolocalización de gp-130 en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas y no epitelizadas. (A-C) Lesiones epitelizadas 100x, (D-F) lesiones no epitelizadas 100x. P, células plasmáticas. L, linfocitos. N, Neutrófilos. E, células epiteliales. M, células tipo macrófago. VS, vaso sanguíneo.

La extensión e intensidad de la inmunotinción varió en el espesor del epitelio. El estrato basal presentó una inmunoexpresión positiva de alta intensidad, mientras que ésta fue disminuyendo progresivamente hasta ser negativa en el estrato superficial (Fig.6).

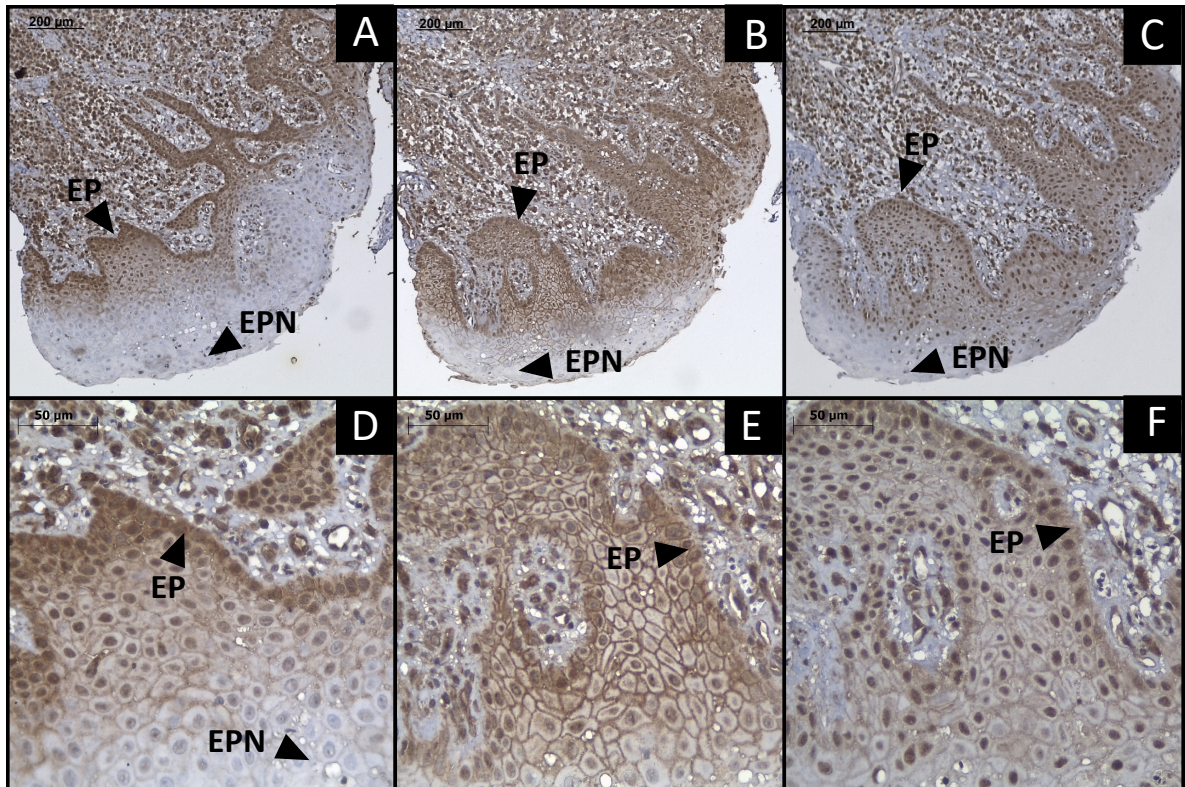


FIGURA 6. Inmunolocalización de IL-6, IL-6R y gp-130 en lesiones apicales de origen endodóntico epitelizadas. (A-C) Lesiones epitelizadas 10x, (D-F) lesiones epitelizadas 40x. (A y D) IL-6, (B y E) IL-6R, (C y F) gp-130. EP: estrato basal con inmunotinción positiva para los distintos componentes del receptor de IL-6. EPN: estrato superficial con inmunotinción negativa para IL-6, IL-6R y gp-130.

#### 5.4 Presencia del complejo de IL-6 en lesiones apicales de origen endodóntico según sintomatología

En las lesiones epitelizadas y no epitelizadas, tanto sintomáticas como asintomáticas, se observó la inmunotinción de IL-6, IL-6R y gp-130 en en infiltrado inflamatorio según se describió previamente. A su vez el patrón de inmunoposividad anteriormente descrito en el epitelio se observó indistintamente de la sintomatología de la lesión (Tabla 2). No se identificaron diferencias cualitativas en el patrón de tinción de ambos tipos de lesiones.

TABLA 2. Células inmunopositivas en lesiones apicales según sintomatología.

<i>Tipo celular</i>	SINTOMÁTICAS (5)			ASINTOMÁTICAS (10)		
	IL-6	IL-6R	gp-130	IL-6	IL-6R	gp-130
<i>LINFOCITOS</i>	+	+	+	+	+	+
<i>NEUTRÓFILOS</i>	+	+	+	+	+	+
<i>MACRÓFAGOS</i>	+	+	+	+	+	+
<i>PLASMOCITOS</i>	+	+	+	+	+	+
<i>ENDOTELIOCITOS</i>	+	+	+	+	+	+
<i>QUERATINOCITOS</i>	+	+	+	+	+	+

(+): Inmunopositivo; (-): Inmunonegativo.



### 5.5 Co-inmunolocalización de IL-6 e IL-6R en lesiones apicales

Se demostró la colocalización de IL-6 y su receptor en las lesiones periapicales en el infiltrado inflamatorio mononuclear en cápsula y en el revestimiento epitelial (Fig. 7, 8 y 9). El patrón de colocalización de IL-6 e IL-6R en el epitelio fue evidente en los estratos basal y parabasal.

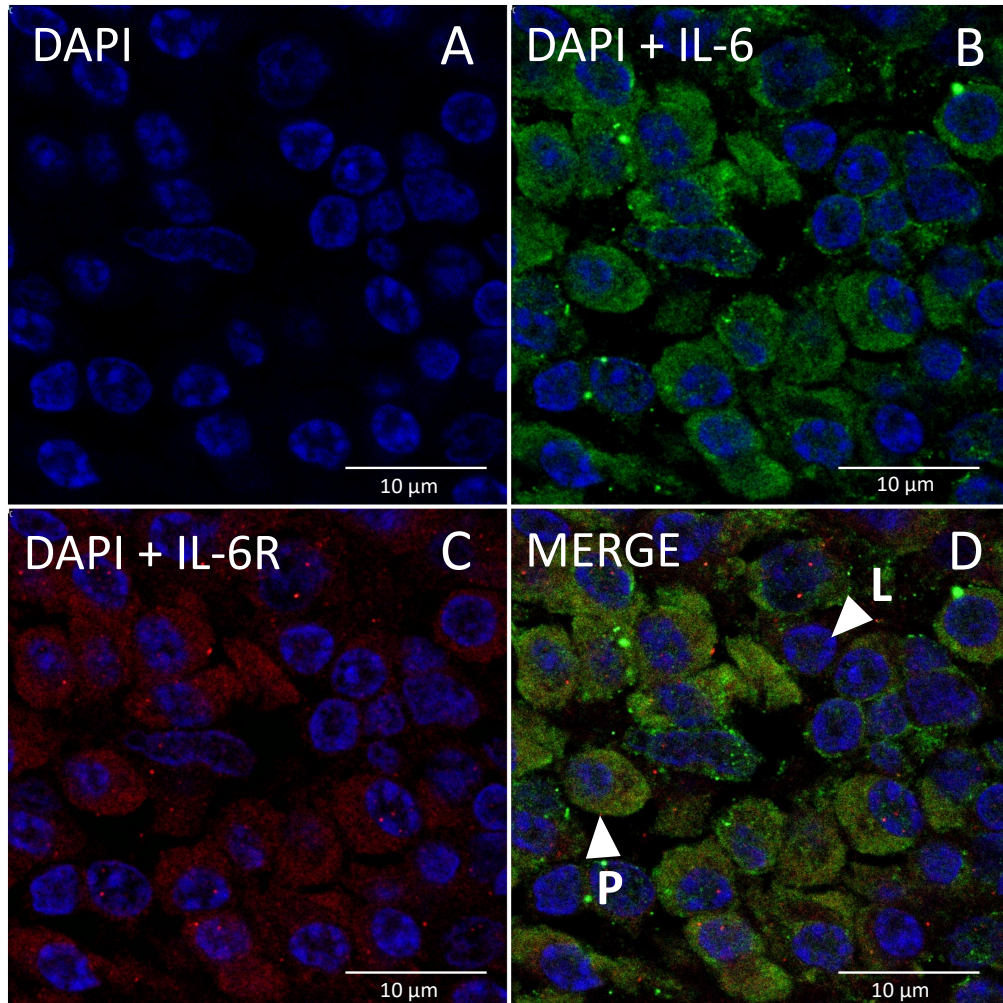


FIGURA 7. Colocalización de IL-6 e IL-6R en células mononucleares en lesiones apicales de origen endodóntico. (A) DAPI (núcleos), (B) DAPI + IL-6, (C) DAPI + IL-6R y (D) fusión, mostrando la co-inmunolocalización de IL-6 e IL-6R en linfocitos (L) y plasmocitos (P), 63x.

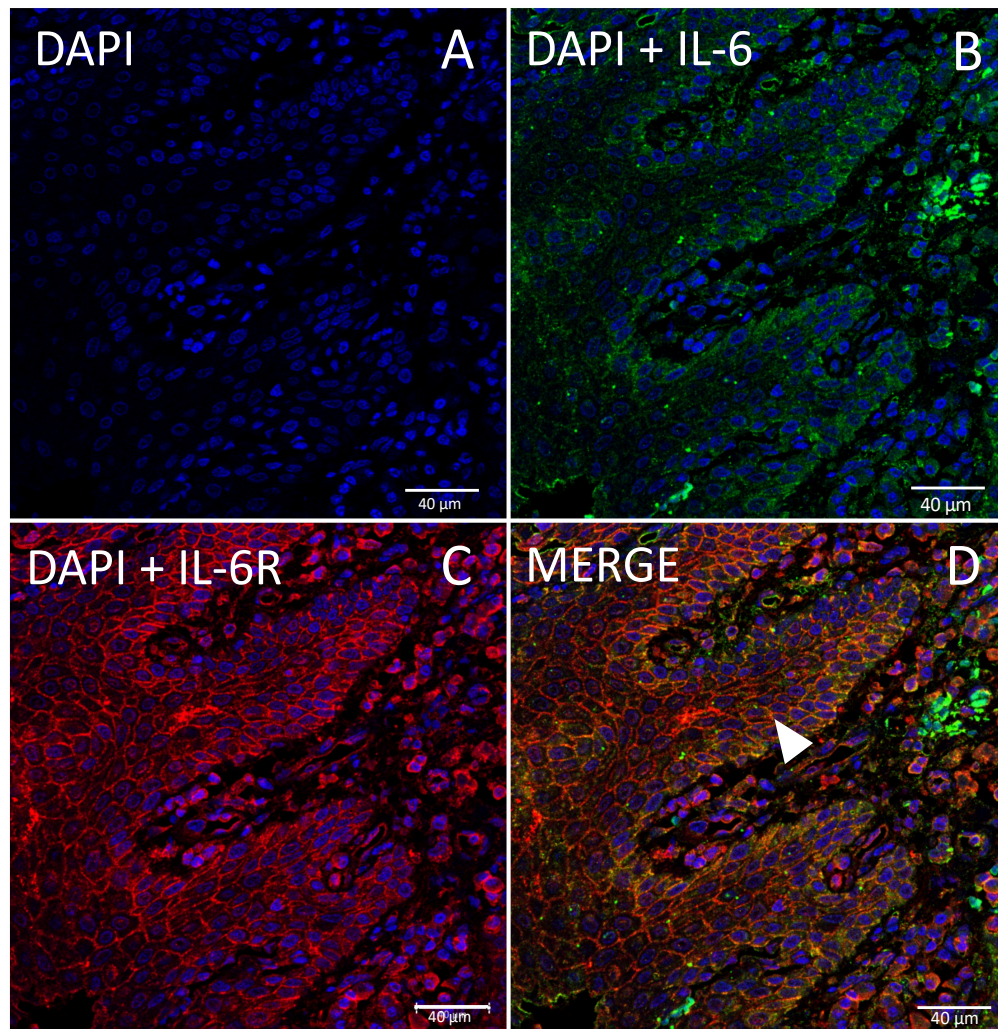


FIGURA 8. Colocalización de IL-6 e IL-6R en el revestimiento epitelial de lesiones apicales de origen endodóntico. (A) DAPI (núcleos), (B) DAPI + IL-6, (C) DAPI + IL-6R y (D) fusión, mostrando localización en membrana celular de queratinocitos basales y parabasales, 40x.

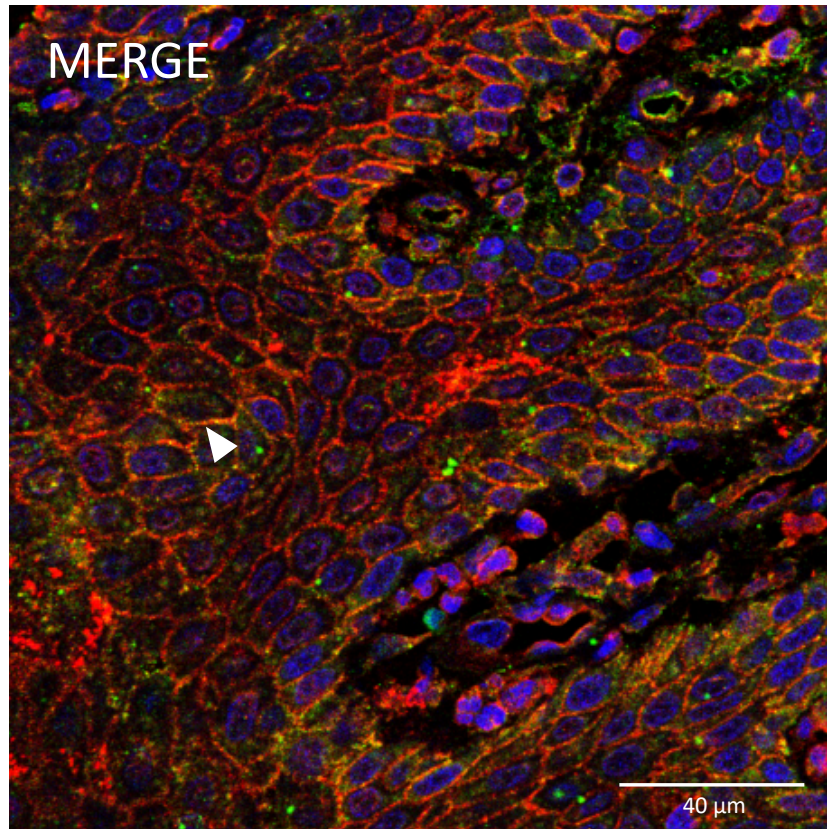


FIGURA 9. Imagen aumentada de fusión de IL-6 e IL-6R en lesiones apicales de origen endodóntico. Flecha muestra localización en membrana celular de queratinocitos basales y parabasales, 40x.

## 5. DISCUSIÓN

Las lesiones periapicales son un mecanismo de respuesta del hospedero frente a la infección bacteriana persistente del sistema de canales radiculares del diente, donde intervienen diferentes células y sus mediadores inflamatorios. En este estudio reportamos que el complejo de señalización de IL-6 se inmunolocalizó en el epitelio de las lesiones apicales, como también en el infiltrado inflamatorio, sugiriendo que participa en la epitelización de estas.

La IL-6 ha sido previamente detectada en lesiones apicales humanas. Estudios realizados por nuestro equipo de trabajo detectaron mRNA de IL-6 e inmunolocalizaron IL-6 en lesiones apicales asintomáticas (Garrido y cols., 2015). Además se ha reportado que los niveles de IL-6 son mayores en lesiones apicales sintomáticas que asintomáticas y controles sanos, y mayores en lesiones asintomáticas que en los controles (Prso y cols., 2007). Coincidentemente, en nuestro estudio inmunodetectamos la presencia de IL-6 en las lesiones periapicales epitelizadas y no epitelizadas, sintomáticas y asintomáticas. Estos resultados apoyan el concepto de que IL-6 presenta un papel esencial en el desarrollo de las lesiones apicales, mostrando relevancia en la forma epitelizada. En el presente estudio inmunodetectamos IL-6 en células tipo macrófagos, plasmocitos, algunos neutrófilos, linfocitos, células endoteliales y epiteliales. En la misma línea, otros autores inmunodetectaron IL-6 en neutrófilos y células plasmáticas en granulomas apicales (Euler y cols., 1998) y en células tipo macrófagos en quistes apicales (Bracks y cols., 2014). Hasta la fecha, no existen reportes previos sobre la localización de IL-6 en células endoteliales y linfocitos en LA; sin embargo IL-6 sí se ha inmunolocalizado en macrófagos, células T, células B CD20+, células endoteliales y fibroblastos del tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica (Matsuki y cols., 1992). IL-6 se ha inmunodetectado también en otros tipos de tejidos, especialmente en células T CD2+ en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Hirano y cols., 1988). De este modo, IL-6 tendría un rol central en la patogenia de enfermedades inmunoinflamatorias y particularmente en lesiones apicales. Es conocido que la producción excesiva y continua de citoquinas, como la IL-6, en tejidos periodontales inflamados es la

principal determinante del progreso de la periodontitis crónica en términos de la destrucción de los tejidos periodontales, ya que desempeñan un importante papel en el reclutamiento crónico de leucocitos, la respuesta inmune adaptativa (Th1, Th17), inducción de metaloproteinasas de matriz y diferenciación y activación osteoclástica (Okada y cols., 1998; Prso y cols., 2007). Por lo tanto, IL-6 podría participar en la destrucción del tejido óseo apical participado en progresión de la PA.

La evidencia muestra que los quistes odontogénicos surgen de restos epiteliales de Malassez provenientes de la odontogénesis (Meghji y cols., 1996; Mundi y cols., 2011; Bernardi y cols., 2015). A pesar de que no existen estudios previos que reporten la presencia de IL-6 en las células epiteliales de las lesiones apicales, se ha detectado mRNA de IL-6 en células epiteliales gingivales humanas (Yang y cols., 2014). Además, se han encontrado mayores niveles de IL-6 en queratinocitos de carcinoma oral de células escamosas (COCE) con metástasis a linfonodos en comparación con aquellos sin metástasis (Nakano y cols., 1999). Estos antecedentes sugieren que los queratinocitos locales participan en la señalización mediada por IL-6 y en particular, la IL-6 podría estar participando en la epitelización de las lesiones apicales, posiblemente en procesos de proliferación y/o migración queratinocítica. También reportamos por primera vez la inmunodetección de IL-6 en células endoteliales de lesiones apicales. Sin embargo, por un lado un estudio demostró que IL-6 estimula la proliferación de células endoteliales dérmicas *in vitro* (Neiva y cols., 2014). Por otro lado, en un estudio se observó que la estimulación de células endoteliales vasculares humanas con LPS de *Porphyromonas gingivalis* conduce la secreción de IL-6, *in vitro* (Triantafilou y cols., 2007). Esto sugiere que IL-6 podría ser clave en la angiogénesis (Hirano y cols., 1998) en lesiones apicales.

Nuestros resultados demuestran por primera vez la presencia de IL-6R y gp-130 en células epiteliales de LA de origen endodóntico epitelizadas. Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó la expresión proteica de IL-6R en lesiones apicales asintomáticas, mientras que no se detectó en ligamento periodontal sano (Hernández-Caldera y cols., 2017). Esto coincide con nuestros resultados, los

cuales mostraron la inmunodetección de IL-6R en el tejido de granulación y epitelial de todas las lesiones apicales epitelizadas y no epitelizadas. Estudios *in vitro* respaldan la presencia de IL-6R en macrófagos y linfocitos (Polgár y cols., 2000; Sawada y cols., 2013). Si bien, reportes previos de nuestro laboratorio indican que los efectos derivados de IL-6 en lesiones apicales y fibroblastos de ligamento periodontal estarían principalmente mediados por trans-señalización, es decir, vía receptor soluble de IL-6 (Hernández-Caldera y cols., 2017), el patrón superficial de inmunolocalización de IL-6R en queratinocitos demostrado en el presente estudio, sugiere la presencia de su forma unida membrana en lesiones epitelizadas, que clásicamente se expresa en hepatocitos (Gabay y cols., 1995). Este patrón también se ha descrito en el epitelio de cáncer nasofaríngeo (Zhang y cols., 2013) y de ovario (Wouters y cols., 2014). La vía clásica de señalización de IL-6 promueve la migración de células epiteliales de la córnea (Ebihara y cols., 2011), mientras que la vía trans media la osteoclastogénesis inducida por RANKL dependiendo de la concentración de este último, en modelo animal (Feng y cols., 2017). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la ligación de IL-6 a su receptor de membrana en el epitelio de las lesiones apicales de origen endodóntico ocurriría mediante señalización clásica, estimulando su migración y proliferación. Mientras que en el tejido de granulación, la señalización predominante sería la trans, estimulando una respuesta pro-inflamatoria.

En relación con gp-130, y en línea con lo reportado por la literatura, ésta presentó una distribución ubicua en las lesiones periapicales. De modo similar a IL-6 y IL-6R, gp-130 se inmunolocalizó en células mononucleares y polimorfonucleares de las LA; en plasmocitos, linfocitos, células tipo macrófago, neutrófilos, células endoteliales y epiteliales. Un estudio previo *in vitro* respalda nuestros hallazgos, en que neutrófilos aislados de sangre humana estimulados con IL-15 e IL-18 secretaron gp-130 e IL-6Rs (Jablonska y Marcinczyk, 2003). En adición, en un estudio realizado en pacientes con preeclampsia, se inmunodetectó gp-130 en vasos sanguíneos de tejido subcutáneo (Wang y cols., 2011). Además, en un estudio de cáncer de próstata donde se evaluó IL-6 y gp-130 mediante inmunohistoquímica, se inmunodetectó IL-6 en el estrato epitelial de próstata normal, hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata, en cambio gp-130

sólo se detectó en el epitelio de hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata (Rodríguez- Berriguete y cols., 2010). Por lo tanto, todos estos antecedentes en conjunto sugieren que el complejo de la IL-6 es clave en la patogénesis de las lesiones apicales.

En cuanto a la sintomatología de las lesiones apicales, observamos que el patrón de tinción fue similar en lesiones sintomáticas y asintomáticas. Esto, debido a que en ambos tipos de lesiones hubo inmunotinción de IL-6, IL-6R y gp-130 para las células mononucleares y polimorfonucleares estudiadas. Esto se asemeja con un estudio realizado en lesiones apicales crónicas sintomáticas y asintomáticas, donde se inmunodetectó IL-6 en células inflamatorias. En éste se observó que las células predominantes en las LA fueron linfocitos T y B, independientemente de la sintomatología (Lukić y cols., 2008). Sobre la base de lo anterior, el patrón de inmunolocalización de complejo receptor de IL-6 sería similar en LA sintomáticas y asintomáticas, y que lo que podría variar serían los niveles secretados de IL-6.

Sobre la base de lo anterior, las lesiones apicales de origen endodóntico humano podrían actuar como reservorio de IL-6, y ésta a su vez es capaz de sintetizar proteína C reactiva en lesiones periapicales asintomáticas y tejidos periodontales actuando como una fuente extra-hepática, de modo que podrían contribuir en la génesis de la inflamación sistémica de bajo grado que a su vez representa un factor de riesgo cardiovascular (Garrido y cols., 2015). Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó mayores niveles de IL-6 y CRP, entre otros mediadores inflamatorios, en el suero de pacientes con periodontitis apical asintomática en relación con individuos sanos, demostrando una asociación entre la presencia de LA y riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes (Garrido y cols., 2018). En línea con lo anterior se ha reportado un aumento de los niveles séricos de IL-6 en sangre en modelos experimentales de lesiones apicales inducidas en ratas. Esto condujo a cambios inflamatorios reversibles en el arco aórtico, miocardio y bazo, así como cambios irreversibles en el hígado (Zhang y cols., 2016).

## **6. CONCLUSIONES**

IL-6, IL-6R y gp-130 se encuentran expresadas en lesiones periapicales de origen endodóntico, específicamente células tipo macrófagos, neutrófilos, linfocitos, plasmocitos, células endoteliales y epitelio de lesiones epitelizadas, en estas últimas en un patrón de superficie celular. Estos hallazgos sugieren que IL-6 mediaría la formación del revestimiento epitelial de quistes apicales, vía señalización clásica y la respuesta pro-inflamatoria vía trans-señalización.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aw, V. (2016). Discuss the role of microorganisms in the aetiology and pathogenesis of periapical disease. *Aust Endod J*, 42(2), 53-59. doi:10.1111/aej.12159
- Azuma, M. M., Samuel, R. O., Gomes-Filho, J. E., Dezan-Junior, E., & Cintra, L. T. (2014). The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J*, 47(7), 615-621. doi:10.1111/iej.12196
- Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H. J., . . . Scheller, J. (2018). The balance of Interleukin (IL)-6, IL-6: soluble IL-6 receptor (IL-6R) and IL-6: sIL-6R: sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.RA117.001163
- Bernardi, L., Visioli, F., Nör, C., & Rados, P. V. (2015). Radicular Cyst: An Update of the Biological Factors Related to Lining Epithelium. *J Endod*, 41(12), 1951-1961. doi:10.1016/j.joen.2015.08.036
- Bracks, I. V., Armada, L., Gonçalves, L. S., & Pires, F. R. (2014). Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. *J Endod*, 40(1), 63-68. doi:10.1016/j.joen.2013.09.037
- Ebihara, N., Matsuda, A., Nakamura, S., Matsuda, H., & Murakami, A. (2011). Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(12), 8549-8557. doi:10.1167/iovs.11-7956
- Euler, G. J., Miller, G. A., Hutter, J. W., & D'Alesandro, M. M. (1998). Interleukin-6 in neutrophils from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues. *J Endod*, 24(7), 480-484. doi:10.1016/S0099-2399(98)80051-4
- Feng, W., Liu, H., Luo, T., Liu, D., Du, J., Sun, J., . . . Li, M. (2017). Combination of IL-6 and sIL-6R differentially regulate varying levels of RANKL-induced osteoclastogenesis through NF-κB, ERK and JNK signaling pathways. *Sci Rep*, 7, 41411. doi:10.1038/srep41411
- Gabay, C., Silacci, P., Genin, B., Mentha, G., Le Coultre, C., & Guerne, P. A. (1995). Soluble interleukin-6 receptor strongly increases the production of acute-phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes. *Eur J Immunol*, 25(8), 2378-2383. doi:10.1002/eji.1830250838
- Garbers, C., & Rose-John, S. (2018). Dissecting Interleukin-6 Classic- and Trans-Signaling in Inflammation and Cancer. *Methods Mol Biol*, 1725, 127-140. doi:10.1007/978-1-4939-7568-6\_11

- Garbers, C., Thaiss, W., Jones, G. W., Waetzig, G. H., Lorenzen, I., Guilhot, F., . . . Scheller, J. (2011). Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem*, *286*(50), 42959-42970. doi:10.1074/jbc.M111.295758
- Garrido, M., Cárdenas, A. M., Astorga, J., Quinlan, F., Valdés, M., Castillo, C., Chaparro, A., Carvajal, P., Huamán-Chipana, P., Pussinen, P. & Hernández, M. (2018). Chronic apical periodontitis associates with cardiovascular risk serum markers in young adults. *J Endod*. "En prensa".
- Garrido, M., Dezerega, A., Bordagaray, M. J., Reyes, M., Vernal, R., Melgar-Rodríguez, S., . . . Hernández, M. (2015). C-reactive protein expression is up-regulated in apical lesions of endodontic origin in association with interleukin-6. *J Endod*, *41*(4), 464-469. doi:10.1016/j.joen.2014.12.021
- Graunaite, I., Lodiene, G., & Maciulskiene, V. (2012). Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*, *2*(4), e1. doi:10.5037/jomr.2011.2401
- Hernández-Caldera, A., Vernal, R., Paredes, R., Veloso-Matta, P., Astorga, J., & Hernández, M. (2017). Human periodontal ligament fibroblasts synthesize C-reactive protein and Th-related cytokines in response to interleukin (IL)-6 trans-signalling. *Int Endod J*. doi:10.1111/iej.12872
- Hernández-Ríos, P., Pussinen, P. J., Vernal, R., & Hernández, M. (2017). Oxidative Stress in the Local and Systemic Events of Apical Periodontitis. *Front Physiol*, *8*, 869. doi:10.3389/fphys.2017.00869
- Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., . . . Feldmann, M. (1988). Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, *18*(11), 1797-1801. doi:10.1002/eji.1830181122
- Hosokawa, Y., Shindo, S., Hosokawa, I., Ozaki, K., & Matsuo, T. (2014). IL-6 trans-signaling enhances CCL20 production from IL-1 $\beta$ -stimulated human periodontal ligament cells. *Inflammation*, *37*(2), 381-386. doi:10.1007/s10753-013-9750-8
- Jablonska, E., & Marcinczyk, M. (2003). Role of interleukin-15 and interleukin-18 in the secretion of sIL-6R and sgp130 by human neutrophils. *Mediators Inflamm*, *12*(3), 179-183. doi:10.1080/0962935031000134905
- Jakovljevic, A., Knezevic, A., Karalic, D., Soldatovic, I., Popovic, B., Milasin, J., & Andric, M. (2015). Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J*, *41*(2), 72-77. doi:10.1111/aej.12072

- Korotaeva, A. A., Chepurnova, D. A., Shuvalova, Y. A., Zhitareva, I. V., Samoilo, E. V., & Prokazova, N. V. (2018). Soluble glycoprotein 130 is inversely related to severity of coronary atherosclerosis. *Biomarkers*, 1-18. doi:10.1080/1354750X.2018.1458151
- Lukić, A., Danilović, V., & Petrović, R. (2008). [Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions]. *Vojnosanit Pregl*, 65(6), 435-440.
- Matsuki, Y., Yamamoto, T., & Hara, K. (1992). Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*, 76(1), 42-47.
- Meghji, S., Qureshi, W., Henderson, B., & Harris, M. (1996). The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Arch Oral Biol*, 41(6), 523-531.
- Mundi, V., Dezerega, A., Osorio, C., Dutzan, N., Franco, M. E., Ortega, A. V., & Hernández, M. (2011). Immunodetection of matrix metalloproteinases (MMPs)-2, -9, -13 and -14 in periapical lesions associated with asymptomatic apical periodontitis. *Revista Clínica Periodoncia Implantología y Rehabilitación Oral*, 4(1), 17-21.
- Nakano, Y., Kobayashi, W., Sugai, S., Kimura, H., & Yagihashi, S. (1999). Expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 90(8), 858-866.
- Neiva, K. G., Warner, K. A., Campos, M. S., Zhang, Z., Moren, J., Danciu, T. E., & Nör, J. E. (2014). Endothelial cell-derived interleukin-6 regulates tumor growth. *BMC Cancer*, 14, 99. doi:10.1186/1471-2407-14-99
- Okada, N., Kobayashi, M., Mugikura, K., Okamatsu, Y., Hanazawa, S., Kitano, S., & Hasegawa, K. (1997). Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontal Res*, 32(7), 559-569.
- Polgár, A., Brózik, M., Tóth, S., Holub, M., Hegyi, K., Kádár, A., . . . Falus, A. (2000). Soluble interleukin-6 receptor in plasma and in lymphocyte culture supernatants of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit*, 6(1), 13-18.
- Prso, I. B., Kocjan, W., Simić, H., Brumini, G., Pezelj-Ribarić, S., Borčić, J., . . . Karlović, I. M. (2007). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm*, 2007, 38210. doi:10.1155/2007/38210


- Radics, T., Kiss, C., Tar, I., & Márton, I. J. (2003). Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral Microbiol Immunol*, *18*(1), 9-13.
- Rodríguez-Berriguete, G., Prieto, A., Fraile, B., Bouraoui, Y., de Bethencourt, F. R., Martínez-Onsurbe, P., . . . Royuela, M. (2010). Relationship between IL-6/ERK and NF-κB: a study in normal and pathological human prostate gland. *Eur Cytokine Netw*, *21*(4), 241-250. doi:10.1684/ecn.2010.0211
- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*, *8*(9), 1237-1247. doi:10.7150/ijbs.4989
- Rose-John, S., Winthrop, K., & Calabrese, L. (2017). The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol*, *13*(7), 399-409. doi:10.1038/nrrheum.2017.83
- Sawada, S., Chosa, N., Ishisaki, A., & Naruishi, K. (2013). Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1β and IL-6. *Biomed Res*, *34*(1), 31-40.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, *1813*(5), 878-888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Scheller, J., Garbers, C., & Rose-John, S. (2014). Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol*, *26*(1), 2-12. doi:10.1016/j.smim.2013.11.002
- Triantafyllou, M., Gamper, F. G., Lepper, P. M., Mouratis, M. A., Schumann, C., Harokopakis, E., . . . Triantafyllou, K. (2007). Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol*, *9*(8), 2030-2039. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00935.x
- Vidal, F., Fontes, T. V., Marques, T. V., & Gonçalves, L. S. (2016). Association between apical periodontitis lesions and plasmatic levels of C-reactive protein, interleukin 6 and fibrinogen in hypertensive patients. *Int Endod J*, *49*(12), 1107-1115. doi:10.1111/iej.12567
- Wang, Y., Lewis, D. F., Gu, Y., Zhao, S., & Groome, L. J. (2011). Elevated maternal soluble Gp130 and IL-6 levels and reduced Gp130 and SOCS-3 expressions in women complicated with preeclampsia. *Hypertension*, *57*(2), 336-342. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163360

- Wolf, J., Rose-John, S., & Garbers, C. (2014). Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, *70*(1), 11-20. doi:10.1016/j.cyto.2014.05.024
- Wouters, M., Dijkgraaf, E. M., Kuijper, M. L., Jordanova, E. S., Hollema, H., Welters, M., . . . van der Burg, S. H. (2014). Interleukin-6 receptor and its ligand interleukin-6 are opposite markers for survival and infiltration with mature myeloid cells in ovarian cancer. *Oncoimmunology*, *3*(12), e962397. doi:10.4161/21624011.2014.962397
- Yang, X., Zhang, J., Ni, J., Ouyang, B., Wang, D., Luo, S., . . . Xuan, D. (2014). Toll-like receptor 4-mediated hyper-responsiveness of gingival epithelial cells to lipopolysaccharide in high-glucose environments. *J Periodontol*, *85*(11), 1620-1628. doi:10.1902/jop.2014.140087
- Zhang, J., Huang, X., Lu, B., Zhang, C., & Cai, Z. (2016). Can apical periodontitis affect serum levels of CRP, IL-2, and IL-6 as well as induce pathological changes in remote organs? *Clin Oral Investig*, *20*(7), 1617-1624. doi:10.1007/s00784-015-1646-6
- Zhang, G., Tsang, C. M., Deng, W., Yip, Y. L., Lui, V. W., Wong, S. C., . . . Tsao, S. W. (2013). Enhanced IL-6/IL-6R signaling promotes growth and malignant properties in EBV-infected premalignant and cancerous nasopharyngeal epithelial cells. *PLoS One*, *8*(5), e62284. doi:10.1371/journal.pone.0062284
- Çalışkan, M. K., Kaval, M. E., Tekin, U., & Ünal, T. (2016). Radiographic and histological evaluation of persistent periapical lesions associated with endodontic failures after apical microsurgery. *Int Endod J*, *49*(11), 1011-1019. doi:10.1111/iej.12554

## 8. ANEXOS Y APÉNDICES

Anexo 1. Acta de aprobación de protocolo de investigación (2 páginas).

Ed-29 junio 2016



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO**

---

**ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

---

Dr. Eduardo Fernández Pdlie / Sra. P. Navarrete Secr/ Dr. M. Cornejo Vico-Pdte/ Sr. R. La Rosa / Dr. R. Cabello/ Dr. Mauricio Baeza/ Dra. Weronika Weil / Dr. A. Molina

INFORME N°:2016/08

1. **Acta de Aprobación de Proyecto FONDECYT titulado "Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica" Versión 04/2016.**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

<b>Dr. Eduardo Fernández</b> Presidente CEC	<b>Sra. Paulina Navarrete</b> Secretaria CEC	<b>Dr. Marco Cornejo</b> Vice Pdte. CEC
<b>Dr. Mauricio Baeza</b> Miembro permanente CEC	<b>Sr. Roberto La Rosa</b> Miembro permanente CEC	<b>Dra. Weronika Weil</b> Miembro permanente CEC
<b>Dr. Rodrigo Cabello</b> Miembro permanente CEC	<b>Dr. Alfredo Molina</b> Miembro alterno CEC	
3. **Fecha de Aprobación: 29/06/2016**
4. **Título completo del proyecto: "Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica" Versión 04/2016".**
5. **Investigador responsable:** Dra. Marcela Hernández Ríos.
6. **Institución Patrocinante:** Facultad de Odontología – Universidad de Chile
7. **Documentación Revisada:**
  - Consentimiento Informado (CI) (Pacientes) aprobado por el CEC, con timbre y fecha de edición correspondiente, debidamente fechado y firmado por todos los involucrados.
  - Certificado del CIB
  - Carta del Director de Departamento
  - Proyecto de Investigación

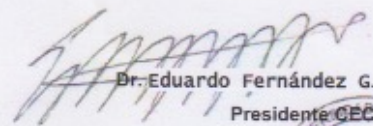
1

#### 8.- Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizarán las modificaciones en relación a los siguientes aspectos:

- Fueron modificados en cuanto a formato y contenido el Consentimiento y Asentimiento Informado.
- Se agregaron beneficios por participar en el estudio (limpieza dental, y examen dental clínico y radiográfico, exámenes de perfil lipídico, CRP y hemoglobina glicosilada sin costo).
- Se incorpora un flujograma explicativo con los tiempos e intervenciones sobre los participantes en el proyecto.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado "Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica"

  
Dr. Eduardo Fernández G.  
Presidente C.E.C.



c/c.: Investigador Principal y Secretaria C.E.C.

## Anexo 2. Consentimiento informado para participar en proyecto de investigación con toma de muestra de sangre (2 páginas).

1



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CON TOMA DE MUESTRA DE SANGRE

Este formulario de consentimiento puede contener algunas palabras que usted probablemente no entienda, si es así puede pedir explicaciones al investigador.

**Patrocinante:** Universidad de Chile, Facultad de Odontología

**Investigador Principal:** Marcela Hernández Ríos. Email: [mhernandezrios@odontologia.uchile.cl](mailto:mhernandezrios@odontologia.uchile.cl). Fono: 229781833. Livingstone 943, Independencia, Santiago.

Investigador asociado Hospital de Urgencia Asistencia Pública (HUAP): Dr. Daniel Reyes Court.

**Título del Proyecto:** PERFILES DE RESPUESTA DE MACRÓFAGOS INDUCIDOS POR PATÓGENOS ENDODÓNTICOS Y SU REGULACIÓN EPIGENÉTICA COMO DETERMINANTES PARA LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LA PERIODONTITIS APICAL CRÓNICA, 2016-2020.

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea cuidadosamente este formulario de consentimiento y discuta cualquier inquietud que usted tenga con el investigador. Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar la decisión.

#### 1.- Solicitud de participación

Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un proyecto de investigación sobre periodontitis apical crónica, bajo la supervisión de la Dra. Marcela Hernández Ríos, de la Universidad de Chile. Esta enfermedad corresponde a una infección de origen dentario que generalmente se produce como consecuencia de caries dental y evoluciona con el tiempo hacia la formación de una lesión de los tejidos que rodean a la raíz del diente (lesión periapical). El tratamiento indicado para estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones de esta patología. El propósito de esta investigación es caracterizar la infección y respuesta inflamatoria local y sistémica en individuos afectados en forma previa y posterior al tratamiento endodóntico. Para esto, obtendremos muestras de lesiones periapicales o ligamento periodontal sano en pacientes atendidos en el HUAP y su participación consistirá exclusivamente en donar muestras que serán tomadas por profesionales expertos con estricta confidencialidad de sus datos.

#### 2.- Si usted participa usted deberá realizar:

- Una entrevista previa a la toma de muestra por uno de nuestros investigadores asociados, con el objetivo de confirmar el diagnóstico. La información suministrada es confidencial.
- En el caso de tener indicación de extracción de dientes con periodontitis apical o dientes sanos por indicación de ortodoncia, se extraerán los tejidos blandos adheridos al diente para análisis de la respuesta inmune local.

#### 3. Criterios de inclusión.

Sujetos sanos hombres y mujeres con o sin lesiones periapicales.

#### 4. Criterios de exclusión.

Individuos en tratamiento antibiótico o antiinflamatorio sostenido en los últimos 3 meses previos a la atención odontológica.

#### 3.- Costos, Riesgo y efectos adversos que pueden estar asociados a la investigación

La participación voluntaria en el estudio no presenta costos adicionales a su atención en el HUAP. La muestra de los tejidos asociados a dientes extraídos no genera riesgos ni molestias propias de este procedimiento

#### 4.- Garantía de confidencialidad en el manejo y difusión de la información

- Los resultados de la investigación son estrictamente con fines científicos y no comerciales. No se entregará información de la investigación a compañías de seguros ni otras personas o instituciones sin su previa autorización.
- Los resultados de la investigación podrán ser usados en presentaciones a congresos científicos o publicados en revistas científicas nacionales o internacionales.
- A su muestra se le asignará un código numérico. Esto prevendrá que la persona que trabaje con su muestra conozca la identidad del donante.

#### 5.- Beneficios para usted/sociedad:

Usted no recibirá ningún beneficio directo, económico ni médico, por la participación en este proyecto. Usted estará haciendo una libre y generosa donación para la investigación que podrá ser beneficiosa para futuras generaciones. La participación es voluntaria y usted puede rehusar a participar y retirarse de investigación cualquier momento sin ninguna penalidad, en este caso sus leucocitos serán eliminados. Los resultados de este estudio contribuirán a comprender los riesgos para la salud general de las personas que implica tener dientes afectados con lesiones apicales en los pacientes y establecer las medidas de prevención pertinentes.

#### 6.- Seguimiento

Para proteger sus derechos, la agencia que suministra los fondos (FONDECYT) para este proyecto podría en algún momento inspeccionar los registros suministrados por usted para este proyecto (no por nombres, sino

Ed. 28/07/17 FECHA DE EDICION



07 AGO 2017

1



2

utilizando solamente códigos numéricos). Esto con el fin de asegurarse de que sus derechos han sido protegidos en este proyecto.

**7.- Aclaraciones**

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o si experimenta cualquier problema, puede llamar al investigador responsable Marcela Hernández Ríos teléfonos 229781833.

Si Ud. desea consultar sobre sus derechos como sujeto de investigación o piensa que estos han sido vulnerados se puede dirigir al representante del Comité Ética SSMC:

- o Nombre Presidente: Dr. Emiliano Soto Romo
- o Teléfono del CEC: 225746958 -225743520
- o Dirección: VICTORIA SUBERCASEAUX # 381 4to piso

**He leído este formulario de aprobación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo que me darán copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación.**

Nombre del Participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma Participante

\_\_\_\_\_  
RUT

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma Investigador

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma Director del Centro o delegado



07 AGO 2017

Anexo 3. Ficha clínica lesiones periapicales (LPs) y ligamento sano (LS) (1 página).

Nombre:		ID:	
Fecha ingreso:		Diente:	
Género: Femenino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/>		Edad:	
Nivel educacional: básica incompleta <input type="checkbox"/> básica completa <input type="checkbox"/> media completa <input type="checkbox"/> superior completa <input type="checkbox"/>			
ANAMNESIS			
Enfermedad sistémica actual	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Especificar:	
Tratamiento médico los últimos 3 meses	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Especificar:	
EXAMEN CLÍNICO			
Periodontitis crónica	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Gingivitis	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Fuma actualmente	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
DIAGNÓSTICO			
Diente:	PAA <input type="checkbox"/>	PAS <input type="checkbox"/> Fístula <input type="checkbox"/> Absceso <input type="checkbox"/>	Sano <input type="checkbox"/>
Diámetro basal de la lesión radiográfica (mm)		Vertical:	Horizontal :
Tests de sensibilidad (frío/calor)	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>	Percusión	Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>

## **PRESENTACIONES DEL TRABAJO REALIZADO**

1. Rodríguez J., Schweitzer C., Flores M., Hernández M. Localization of interleukin-6 receptor in apical lesions of endodontic origin. XXIX Reunión anual de IADR División Chile. 4 y 5 de agosto 2017, Santiago, Chile.
2. Schweitzer C., Rodríguez J., Flores M., Hernández M. Localización del complejo de señalización de IL-6 en lesiones apicales de origen endodóntico. VII Jornada odontológica UDD. 13 y 14 de octubre 2017, Santiago, Chile.
3. Schweitzer C., Fernández A., Flores M., Hernández M. Inmunolocalización del complejo de señalización de interleuquina-6 en lesiones periapicales de origen endodóntico. Congreso XXIV ALAM 2018 – XL SOMICH – II ASOCHIN – IX SLAMTB. 13 al 16 noviembre 2018, Santiago, Chile.