

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

**INCREMENTO EN LOS NIVELES DE INTERLEUQUINA-21 Y SU PAPEL EN LA
PATOGENIA DE LOS GRANULOMAS PERIAPICALES**

Mónica Oriana Navarrete Tricallotis

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTORES ASOCIADOS

Prof. María Eugenia Franco Martínez

Prof. Dra. Andrea Dezerega Piwonka

Prof. Dr. Nicolás Dutzan Muñoz

Financiado por

FONDECYT 11100298

FONDECYT 1090046

FIOUCH 09-8

**Santiago - Chile
2010**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA**

**INCREMENTO EN LOS NIVELES DE INTERLEUQUINA-21 Y SU PAPEL EN LA
PATOGENIA DE LOS GRANULOMAS PERIAPICALES**

Mónica Oriana Navarrete Tricallotis

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTORES ASOCIADOS

Prof. María Eugenia Franco Martínez

Prof. Dra. Andrea Dezerega Piwonka

Prof. Dr. Nicolás Dutzan Muñoz

Financiado por

FONDECYT 11100298

FONDECYT 1090046

FIOUCH 09-8

**Santiago - Chile
2010**

Este trabajo está dedicado a mi familia, a mis papás Mónica y Ricardo, y a mis hermanos Daniela y Ricardo por el cariño y paciencia. También quiero dedicar este trabajo a mis amigas Carolina y Javiera, por su amistad y apoyo incondicional a lo largo de todos estos años.

Mis más sinceros agradecimientos a la Doctora Andrea Dezerega y al Doctor Rolando Vernal por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, a la profesora María Eugenia Franco y al Doctor Nicolás Dutzan por compartir su conocimiento y guiarme a través de ésta investigación y a todos los miembros del laboratorio de biología periodontal por la ayuda entregada y por la asistencia invaluable en esta investigación.

Índice

Resumen	7
Marco Teórico	8
Generalidades de los granulomas periapicales.....	8
Generalidades de la respuesta inmune	9
Linfocitos TCD4 ⁺	9
Linfocitos Th17 y RANKL	12
Interleuquina-21	14
Interleuquina-21 y la diferenciación selectiva de los linfocitos Th17	15
Hipótesis.	18
Objetivo General.	18
Objetivos Específicos.....	18
Materiales y Métodos.....	19
Tipo de estudio.....	19
Selección de sujetos	19
Obtención de las muestras.....	20
Procesamiento de muestras	20
Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	20
Inmunohistoquímica (IHQ).....	21
Resultados.....	24
Discusión	27
Conclusión	31
Referencias Bibliográficas	32
Anexos.....	35
Anexo 1: Formulario de Consentimiento Informado.....	35
Anexo 2: Resúmenes congreso IADR Valdivia 2010 y congreso IAP (Internacional Association of Pathology) 2010.....	36

Resumen

Objetivo: Los granulomas periapicales (GPs) son lesiones de naturaleza infecciosa de origen pulpar caracterizados por la destrucción de los tejidos perirradiculares, en particular del hueso alveolar periapical. El fenotipo linfocitario efector Th17 se ha asociado a los fenómenos osteodestructivos en diversas patologías infecciosas y se ha establecido que la citoquina interleuquina-21 (IL-21) cumple un rol central en la diferenciación selectiva de esta población celular. El objetivo del presente trabajo es analizar la expresión de IL-21 en los GPs y asociar su presencia a la patogenia de la enfermedad.

Método: Se obtuvieron de 15 lesiones con el diagnóstico clínico y radiográfico de GP durante la extracción de dientes con indicación de exodoncia. En 10 lesiones se analizaron los niveles de expresión del ARN mensajero de IL-21 mediante la técnica de PCR y en 5 lesiones se analizó la expresión tisular de IL-21 mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se utilizaron Linfocitos T de la línea celular Jurkat como control de la expresión de ARN mensajero de IL-21 y biopsias de ligamento periapical sano y de amígdala como control negativo y positivo, respectivamente, de la expresión tisular de IL-21.

Resultados: Se detectaron niveles de expresión de IL-21 similares a los detectados en los linfocitos T Jurkat activos en los GPs y estos niveles se asociaron a la actividad de linfocitos, macrófagos y neutrófilos del infiltrado inflamatorio tisular.

Conclusiones: En los GPs, IL-21 participaría en los eventos etiopatogénicos de la enfermedad al ser secretados por los linfocitos, macrófagos y neutrófilos infiltrantes tisulares.

Marco Teórico

Generalidades de los granulomas periapicales

Los granulomas periapicales (GPs) son lesiones perirradiculares de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa que afectan a los tejidos que rodean al ápice dentario: hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal [1]. Los signos patológicos tempranos corresponden a una inflamación aguda del ligamento periodontal apical, que se manifiesta clínicamente con dolor agudo, sensación de elongación dentaria y dolor a la presión en la oclusión y la masticación [2]. Durante la cronicidad, la sintomatología disminuye y generalmente las lesiones son diagnosticadas como hallazgo al examen radiográfico o durante la extracción dentaria [3].

Durante el desarrollo de los GPs, la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero puede inducir la proliferación de los restos epiteliales de Malassez, determinando el desarrollo de un quiste radicular inflamatorio (QRI). En efecto, el 20% de los GPs se asocian a un QRI [4]. Clínicamente, estas lesiones se diagnostican como periodontitis apical crónica (PAC), las que pueden ser sintomáticas si estas se abscedan o asintomáticas. LA PAC se considera en la actualidad como una de las causas más importantes de pérdida dentaria en adultos [5].

La flora bacteriana que coloniza la pulpa dental está constituida principalmente por bacterias anaerobias [6]. Los microorganismos poseen variadas puertas de entrada al territorio pulpar, siendo la caries la vía más común. Durante la infección, los microorganismos invaden los tejidos perirradiculares e inducen una respuesta inmuno-inflamatoria en el hospedero [6]. Esta respuesta implica una serie de eventos celulares y moleculares altamente especializados y coordinados que se despliegan para proteger al hospedero de la infección; sin embargo, determinan finalmente la destrucción tisular característica de la enfermedad [1].

El GP está formado por tejido de granulación circunscrito por una cápsula fibrosa y compuesto por tejido conectivo vascular, células inflamatorias, cristales de colesterol y ocasionalmente cordones de epitelio proliferante derivados de los restos de Malassez [7]; mientras que un QRI corresponde a una cavidad

patológica, delimitada por epitelio plano pluriestratificado no queratinizado y una cápsula conjuntiva inflamada [7]. Estas características se determinan a través del análisis histopatológico.

Generalidades de la respuesta inmune

La respuesta inmune protege al hospedero de las infecciones por microorganismos patógenos, induciendo una respuesta ante sus antígenos que permite controlarlos y eliminarlos [8]. Desde el punto de vista fisiológico, la respuesta inmune puede dividirse en dos mecanismos de acción. En primer lugar se despliega la respuesta inmune innata, durante la cual las bacterias son reconocidas y fagocitadas, se secreta un rango amplio de citoquinas y quimioquinas y se induce el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos al sitio de la infección consolidándose la respuesta inflamatoria [5, 8, 9]. Ante el no control de la infección por parte de la respuesta innata se despliega la respuesta inmune adquirida e involucra la activación de los linfocitos T que definen el curso de la enfermedad [10].

Durante la patogenia de los GPs, se establece inicialmente una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por un predominio de células propias de la respuesta inmune innata, tales como polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos. Durante la cronicidad, se consolida una respuesta inmune adquirida observándose principalmente macrófagos, linfocitos B y T, y en menor cantidad neutrófilos y células plasmáticas [2]. En este contexto, los linfocitos T CD4⁺ desempeñan un rol fundamental mediando la respuesta inmune innata y adquirida y, en asociación con los macrófagos, secretando citoquinas, mediadores pro-inflamatorios y factores osteoactivos que producen la destrucción de los tejidos periapicales [1].

Linfocitos TCD4+

La activación de los linfocitos T CD4⁺ efectores se inicia durante la presentación antigénica, la que es mediada por las células presentadoras de antígeno (CPA) y está determinada por: (1) la estimulación del receptor de célula T (TCR, del inglés: *T-cell receptor*) por el antígeno presentado, (2) la señalización inducida por moléculas co-estimuladoras y (3) el patrón de citoquinas predominante en el territorio anatómico donde se produce esta interacción celular[11]. Una vez activados, los linfocitos T proliferan y adquieren la

potencialidad de diferenciarse en distintos fenotipos efectores, cada uno caracterizado por la síntesis de un patrón de citoquinas fenotipo-específico, denominados: linfocito T colaborador tipo-1 (Th1, del inglés: *helper-1*), Th2, Th17 y T regulador (Treg) (Figura 1) [12, 13].

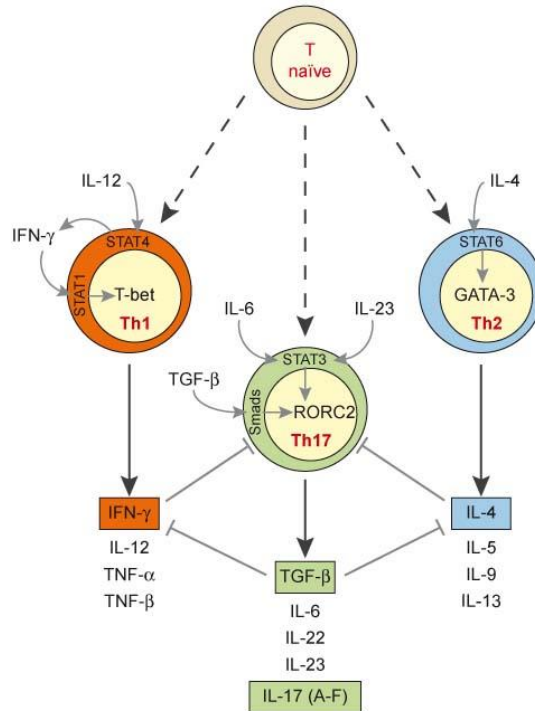


Figura 1. Diferenciación y función de los linfocitos Th1, Th2 y Th17. Una vez activado el TCR, los linfocitos T naíve se pueden diferenciar a células Th1 en presencia de IL-12 o Th2 en presencia de IL-4. IL-12 induce la secreción de IFN- γ mediada por STAT4 (del inglés: *signal transducers and activators of transcription*) e IFN- γ estimula la vía STAT1 y la expresión de T-bet determinando el fenotipo Th1. Por otro lado, IL-4 activa STAT6 e induce la expresión de GATA3 que determina la diferenciación hacia el fenotipo Th2. El fenotipo Th17 se desarrolla en respuesta a IL-6, TGF- β e IL-23 a través de la activación de STAT3 y Smads y la expresión de RORC2. Adicionalmente, IFN- γ e IL-4 inhiben la diferenciación del fenotipo Th17, así como, TGF- β inhibe la diferenciación de los fenotipos Th1 y Th2.

Los linfocitos Th1 se diferencian en respuesta a IL-12 [9] y producto de la activación del factor de transcripción T-bet, gen regulador central de este fenotipo linfocitario [8]. Los linfocitos Th1 secretan IL-2, IL-12, Interferón- γ (INF- γ), TNF- α (del inglés: *Tumoral Necrosis Factor – α*) y TNF- β y participan en el control y eliminación de patógenos intracelulares [8, 9].

La diferenciación al fenotipo Th2 está determinada por IL-4, que media la activación del factor de transcripción regulador central GATA3. Los linfocitos Th2 se caracterizan por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 [9], las que activan a los linfocitos B e inducen una respuesta mediada por anticuerpos que permite erradicar patógenos extracelulares e infecciones provocadas por parásitos [6, 9].

La diferenciación de los linfocitos del fenotipo Th17 está controlada por el factor de transcripción RORC2 (del inglés: *transcription factor regulator of orphan nuclear receptor C2*) [14] y está determinada por la señalización por TGF- β 1 (del inglés: *Transforming Growth Factor beta 1*) e IL-6 en una fase inicial de diferenciación e IL-23 en una fase tardía de proliferación celular [13, 15]. TGF- β es una citoquina que induce también la diferenciación de los linfocitos Treg, mediante la activación del factor de transcripción Foxp3 [13]. De esta forma, los linfocitos Th17 y Treg son inducidos por TGF- β , aunque lo hacen en forma mutuamente excluyente, dado que en presencia de IL-6 se induce el fenotipo Th17 y en ausencia de IL-6 el fenotipo Treg [9] (Figura 2). En efecto, ratones *knot out* para el gen de IL-6 no desarrollan linfocitos Th17, sino que un incremento en la población de linfocitos Treg [9]. Los linfocitos Treg juegan un rol central en la mantención de la autotolerancia (al reconocer antígenos propios y evitar la autoinmunidad) y en la regulación de la respuesta inmune [13].

La funcionalidad de los linfocitos Th17 involucra la síntesis IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, TNF- α , GM-CSF (del inglés: *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) y el factor osteo-destructivo denominado ligando del receptor activador del Factor Nuclear κ B (RANKL, del inglés: *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*), este último directamente asociado a los fenómenos de diferenciación y activación de los osteoclastos y a la reabsorción ósea patológica [1].

Se ha postulado que la patogenia de los granulomas periapicales involucra una respuesta predominante de linfocitos Th1 determinante del proceso inflamatorio [3, 16] y de linfocitos Th17 responsables de los eventos inflamatorios y osteodestructivos mediados por RANKL [1].

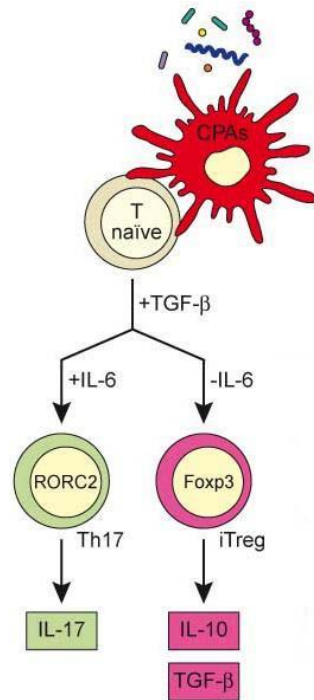


Figura 2. Diferenciación y función de los linfocitos Th17 y T reguladores (Treg). Durante la presentación antigénica la inducción del factor de transcripción Foxp3 en los linfocitos T activados define la diferenciación de las células Treg y la inducción de RORC2 define la diferenciación de las células Th17. TGF- β es esencial para la inducción de la expresión de ambos factores de transcripción. Se han descrito vías de diferenciación recíprocas para Th17 y Treg, en las cuales IL-6 presente en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria juega un rol esencial. Se ha postulado que la presencia IL-21 cumpliría un papel similar a IL-6, definiendo la diferenciación selectiva de un fenotipo linfocitario efector tipo Th17 en vez de uno Treg.

Linfocitos Th17 y RANKL

La homeostasia del hueso está definida por el balance dinámico entre la actividad de los osteoblastos, responsables de la formación de hueso, y de los osteoclastos, responsables de la reabsorción de hueso [1]. Este acoplamiento celular está controlado por varios mecanismos, tal como el sistema endocrino y el metabolismo del calcio y el fósforo, y está influenciado por el sistema inmune, a través de las citoquinas osteoactivas [17]. Numerosas citoquinas tienen la potencialidad de estimular la reabsorción de hueso (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-15, IL-17 y TNF- α), mientras que otras la inhiben (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-18) [8]. Las citoquinas pro-reabsortivas inducen la actividad de los osteoclastos mediante la inducción de los mediadores clave determinantes de la reabsorción de hueso, tanto en forma fisiológica como patológica, denominados: receptor RANK, su ligando RANKL y el receptor-bloqueador osteoprotegerina (OPG) [1]. Cuando RANKL se une a su receptor específico RANK (expresado en los precursores osteoclasticos y/o en los osteoclastos maduros) se induce la diferenciación, maduración, activación e inhibición de la apoptosis de los osteoclastos y la concomitante reabsorción de hueso (Figura 3) [1].

IL-1 β , IL-6 y TNF- α ejercen su función osteoclastogénica al inducir la actividad de los linfocitos Th17 [1]. Mientras los linfocitos Th2 inhiben la osteoclastogénesis, las células Th1 inducen la actividad de Th17 y estas promueven la formación y actividad de los osteoclastos a través de la producción de IL-17 y RANKL [8]. De esta forma, los linfocitos Th17 inducen la reabsorción ósea mediante 2 vías: (1) una vía indirecta mediante la síntesis de IL-17, que estimula la inflamación local y la síntesis de otras las citoquinas pro-inflamatorias que inducen la expresión de RANKL [11], y (2) una vía directa mediante la secreción de RANKL (Figura 3) [1]. En granulomas periapicales se ha demostrado un incremento en la síntesis de RANKL, sugiriendo su asociación a la pérdida de hueso en las lesiones periapicales [1]. Existe evidencia que IL-21 estaría involucrado en forma indirecta la regulación osteoclástica, al ser un factor regulador del fenotipo Th17 [1].

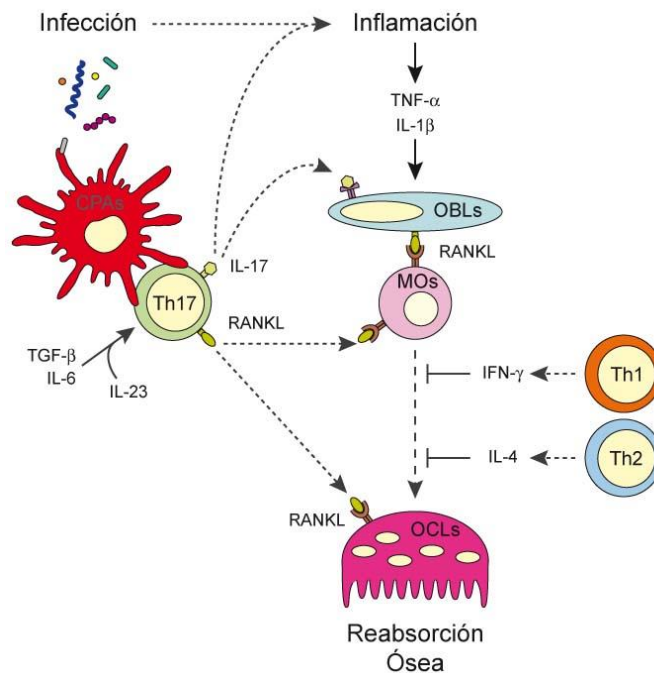


Figura 3. Rol de las células Th17 en la inducción de la osteoclastogénesis durante el desarrollo de enfermedades infecciosas. Durante las primeras etapas del proceso infeccioso, se establece una respuesta inflamatoria que se caracteriza por la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 β y TNF- α . Si la infección no es resuelta y el proceso inflamatorio se mantiene, se desarrolla la respuesta inmune adaptativa en la que bajo condiciones específicas se activan las células Th17, contribuyendo a la destrucción de hueso al secretar IL-6, IL-17 y RANKL. IL-6 e IL-17 amplifican la respuesta inflamatoria e inducen la expresión de RANKL en los osteoblastos. De esta forma, los linfocitos Th17 inducen en forma indirecta la diferenciación y activación de los osteoclastos. Por otro lado, las células Th17 contribuyen también directamente a la destrucción de hueso a través de la síntesis y secreción directa de RANKL.

Interleuquina-21

IL-21 es una citoquina de la familia de citoquinas tipo I que está conformadas por 4 hélices tipo α , su peso molecular es de 15,3 kD [9, 18] y está codificada en el cromosoma 4 posición q26-q27 [19].

IL-21 es secretada por linfocitos efectores Th1, Th2 [9] y Th17 [20, 21], células NK [22, 23] y linfocitos T foliculares [19, 24]. Se ha establecido que el fenotipo Th17 produce significativamente mayores niveles de ARN mensajero para IL-21 en comparación con los fenotipos Th1 y Th2 y estos pueden ser inducidos *in vitro* por IL-6 [13].

Las funciones biológicas de IL-21 involucran la estimulación de su receptor específico denominado IL-21R, cuyo gen se localiza en el cromosoma 16 [25]. IL-21R es una proteína heterodimérica compuesta por una cadena específica α y una cadena γ c (CD132), común con otras ILs e indispensable en el señalamiento intracelular [26]. IL-21R α se ha identificado en los linfocitos T y B, células NK, células dendríticas, y macrófagos [9, 23] También se ha detectado en células no inmune, tales como fibroblastos, células epiteliales y endoteliales [22].

En forma similar a las otras citoquinas del tipo I, IL-21 señala a través de la vía Jak (del inglés: *Janus kinase*) [9] (figura 4). En particular, IL-21 activa específicamente las vías Jak 1 y Jak3 [9], Jak1 en unión a IL-21R α y Jak3 en unión a IL-21R γ c [19]. La señalización vía Jak induce la activación de las vías STAT1 (del inglés: *Signal Transducers and Activators of Transcription-1*), STAT3 y en menor grado y en forma transitoria de STAT4, STAT5 y STAT6 [9, 19].

Animales de experimentación que sobre-expresan IL-21 desarrollan infiltrado inflamatorio localizado en diferentes tejidos, compuesto principalmente de macrófagos y neutrófilos [26]. Se ha postulado que IL-21 no tendría efectos directos en la función de los neutrófilos ya que estos no expresan IL-21R α ; sin embargo, activaría a macrófagos derivados de monocitos a secretar CXCL8, potente factor quimiotáctico de neutrófilos [9, 26]. En contraste, se ha establecido que IL-21 actúa *in vivo* tanto en neutrófilos como macrófagos, sugiriendo que ambos tipos celulares son el blanco efector de la citoquina [26]. Las funciones más importantes de IL-21 en la regulación de algunas poblaciones celulares se ilustra en la Figura 5.

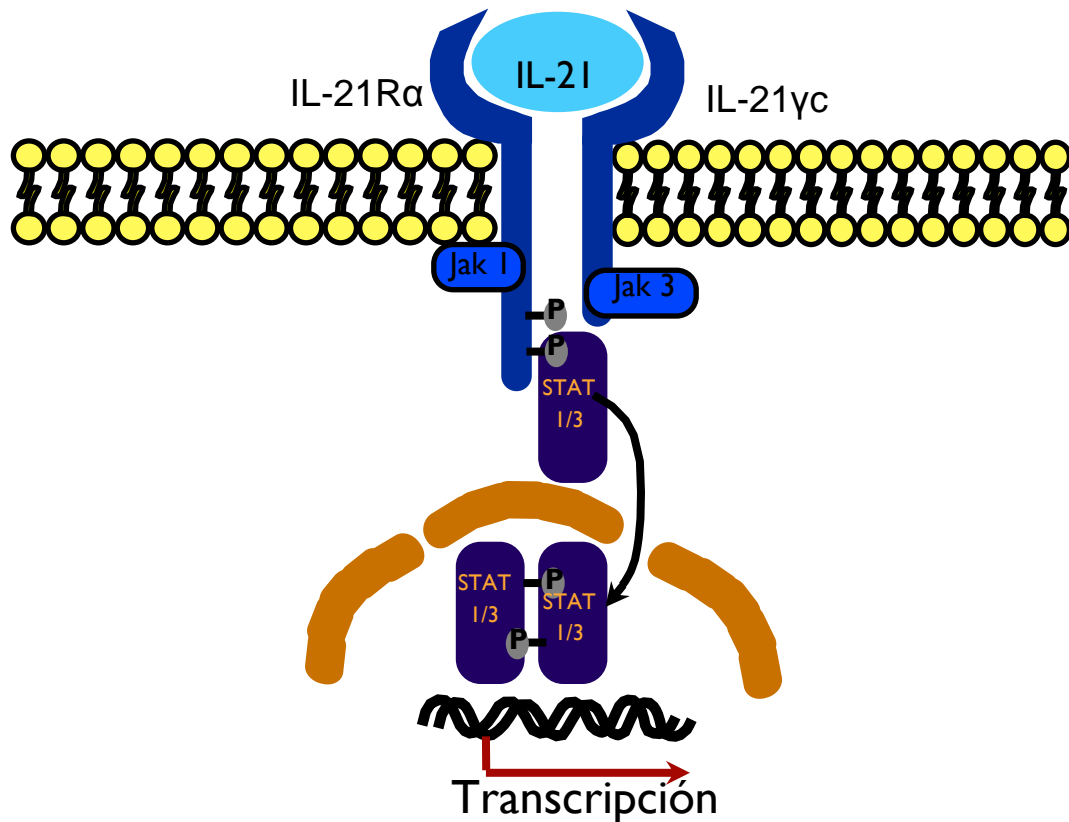


Figura 4. Señalización intracelular de IL-21/IL-21R. IL-21R forma parte de una familia de receptores que no posee actividad kinasa. Las 2 cadenas polipeptídicas transmembrana que lo conforman están unidas en su dominio intracelular a las proteínas kinasas Jak. Cuando IL-21 se une a su receptor se produce un cambio conformacional que permite que ambas proteínas Jak se aproximen y se autofosforilen. La fosforilación de ambas Jak desencadena la transducción de la señal intracelular a través de la fosforilación y activación del factor de transcripción STAT1 y 3. STAT 1 y 3 fosforiladas se disocian del receptor, forma dímeros y se translocan al núcleo, promoviendo la transcripción de genes.

Interleuquina-21 y la diferenciación selectiva de los linfocitos Th17

IL-21 induce la expresión de IL-23R en los linfocitos Th17 [9], favoreciendo la diferenciación y expansión clonal del fenotipo Th17 mediada por IL-23 [9, 17]. IL-21 e IL-23 estimulan la expresión del factor de transcripción RORγt [20], induciendo un feedback positivo para IL-21 y amplificando la respuesta diferenciadora Th17 [9, 20].

Linfocitos T CD4⁺ purificados de ratones *knock out* para IL-21 e IL-21R y estimulados *in vitro* con IL-6 y TGF-β1 secretaron bajos niveles de IL-17 y no evidenciaron inducción de IL-23R, indicando las funciones clave de IL-21 tanto en la inducción temprana del fenotipo Th17 como en la expresión tardía de IL-23R [9].

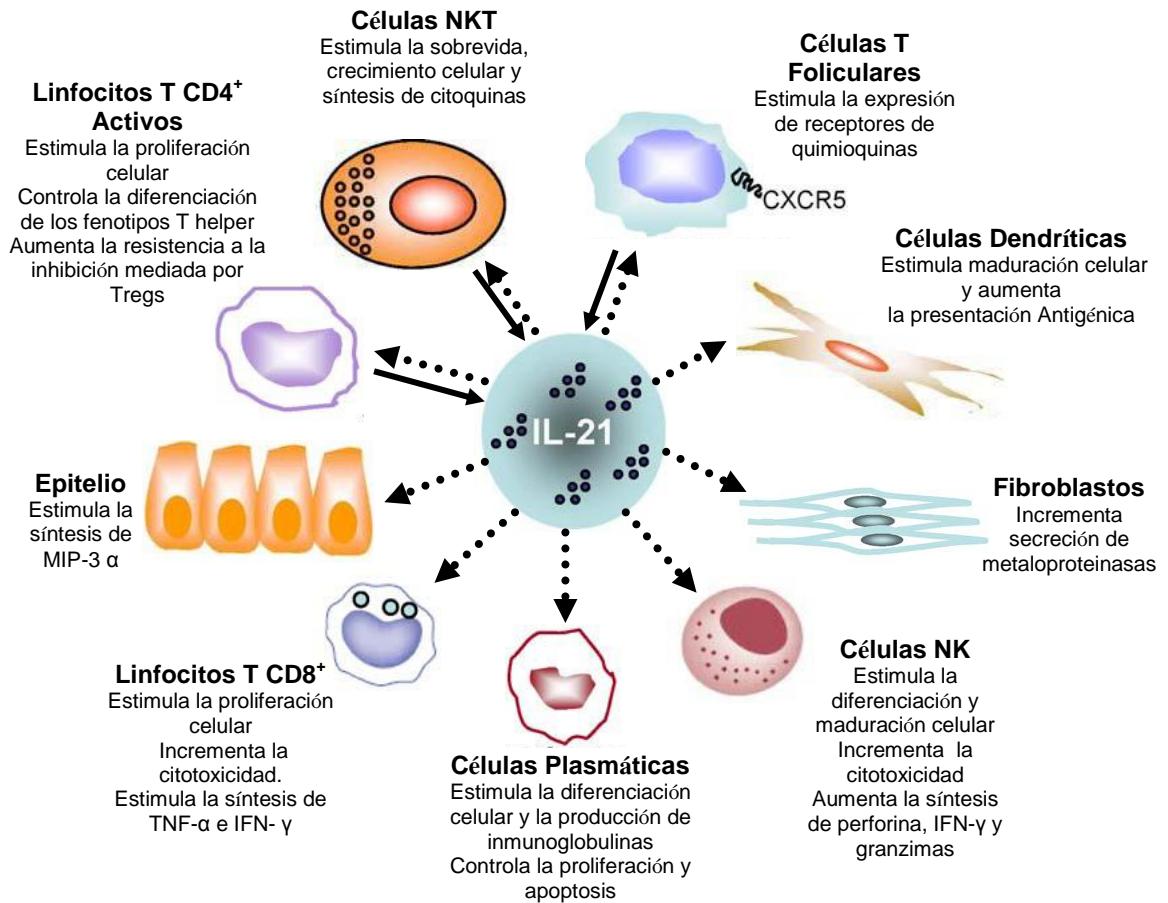


Figura 5: Función de IL-21 en células inmunes y no inmunes. La figura ilustra algunos de los efectos más relevantes de IL-21 sobre distintas poblaciones celulares.

IL-21 también podría tener un efecto mediador en el reclutamiento de los linfocitos Th17 hacia el sitio de la infección [13]. En las células epiteliales intestinales, IL-21 induce la secreción de MIP-3α (del inglés: *Macrophage Inflammatory Protein-3α*), quimioquina involucrada en la migración de estos linfocitos hacia piel, articulación y mucosas [20].

El antagonismo funcional que posee IL-21 sobre células Treg podría amplificar las respuestas efectoras, al contrarrestar la actividad de estas células. Se ha demostrado que IL-21 induce resistencia a la supresión inducida por Treg en linfocitos T estimulados *in vitro* [20].

Existe abundante evidencia científica que avala el papel de los linfocitos Th1 en la inducción del daño tisular, incluso en enfermedades asociadas a elevados niveles de linfocitos Th17 [13]. IL-21 regularía positivamente la actividad y expansión de los linfocitos Th1, induciendo y perpetuando la inflamación [20].

Estudios que han utilizado modelos de inmunización e infección en ratones *knock out* para IL-21R demostraron que existe un desarrollo normal de linfocitos T CD4⁺ tímicos y periféricos y ante la inducción hacia Th1 o Th2 *in vitro* no se detectaron diferencias en comparación a linfocitos obtenidos de ratones sanos, sugiriendo que IL-21 no es esencial para la diferenciación de estos fenotipos efectores [9]. Usando ratones KO para IL-21R infectados por *Schistosoma mansoni* (parásito que induce a la formación de granulomas), se midieron los niveles de IL-21 asociado a respuestas con perfil Th1 y Th2. Se observó que en ambos tipos de respuestas había producción de IL-21, lo que indicaría que esta citoquina no es propia de estos fenotipos celulares [13].

IL-21 induce una potente respuesta inmune innata y adquirida,[27]. El daño a tejidos dirigido por IL-21 ha sido demostrado en varios órganos, como intestino, páncreas y cerebro [23]; sin embargo, su papel en la patogenia de los granulomas periapicales no ha sido completamente dilucidado. Si IL-21 cumple un rol central en la diferenciación selectiva del fenotipo linfocitario efector Th17 y los linfocitos Th17 son responsables de la síntesis de RANKL determinante de la reabsorción ósea marginal durante la periodontitis marginal y periradicular en las lesiones periapicales, es plausible especular que elevados niveles de IL-21 se encuentran asociados a la patogenia de los granulomas periapicales.

Hipótesis.

En los granulomas periapicales se detecta la expresión de interleuquina-21 comparado con el tejido periodontal periapical sano y estos mayores niveles se asocian a linfocitos.

Objetivo General.

Analizar los niveles de interleuquina-21 en granulomas periapicales e identificar la o las células responsables de su síntesis.

Objetivos Específicos.

- Determinar la expresión de los ARN mensajeros de interleuquina-21 en granulomas apicales mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Evaluar la síntesis de interleuquina-21 en granulomas periapicales mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

Materiales y Métodos

Tipo de estudio

El presente estudio es de carácter descriptivo. Cuenta con la aprobación del comité de ética y el comité de bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Selección de sujetos

Se seleccionaron sujetos que consultaron para ser atendidos en el servicio de Urgencia Dental del Hospital Barros Luco Trudeau (Servicio de Salud Metropolitano Occidente) durante los meses de abril y mayo del año 2010 y que cumplieron los siguientes criterios de inclusión: Pacientes mayores de 35 años, no fumadores, sin afecciones sistémicas que requieran profilaxis antibiótica o que afecten la condición periapical, sin antecedentes de terapia de antibióticos, antiinflamatorios esteroidales o no esteroidales durante los 3 meses previos a la consulta dental y, en caso de ser mujer, no estar embarazada o en tratamiento anticonceptivo.

En 15 pacientes, a quienes se realizó un examen clínico completo y se determinó el diagnóstico clínico y radiográfico de GP, se procedió a la toma de la muestra biológica durante la extracción del diente afectado. Los dientes no respondieron a las pruebas de vitalidad pulpar, evidenciaron una respuesta normal o aumentada a la percusión y no mostraron destrucción ósea periapical mayor a 1 cm² al examen radiográfico.

Para la obtención de las muestras biológicas utilizadas como control negativo en la técnica de inmunohistoquímica, se seleccionaron 3 sujetos que consultaron en la Clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile para la extracción de terceros molares o premolares por indicación de ortodoncia y durante el procedimiento quirúrgico correspondiente se obtuvieron biopsias de ligamento periodontal sano. Para el control positivo de inmunohistoquímica se utilizó una biopsia de amígdala facilitada por el departamento de anatomía patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Todos los sujetos fueron informados en detalle de los procedimientos clínicos a realizar y firmaron en forma voluntaria un consentimiento

informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (anexo 1).

Obtención de las muestras

Luego de realizadas las exodoncias, las muestras biológicas se separaron del diente con una cureta periodontal (Hu-Friedy, USA). De un total de 15 muestras obtenidas, 10 de ellas se almacenaron en solución preservante de RNA (RNA-Safer[®], Omega, IL, USA) y se conservaron a -80°C para su posterior análisis. Las 5 muestras restantes fueron lavadas con suero fisiológico y fijadas en solución de formalina buffer al 10% a 4°C durante un tiempo máximo de 24 horas. Las biopsias que contenían tejidos mineralizados (control negativo de ligamento periodontal sano) fueron descalcificadas inmediatamente después de la fijación, utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 5% (Merck, Alemania) durante al menos 30 días y hasta la desmineralización total.

Procesamiento de muestras

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las biopsias almacenadas en RNA-Safer[®] fueron descongeladas y procesadas para la obtención del ARN mensajero citoplasmático total (ARNm) utilizando el método guanidinio isotiacianato de acuerdo a las instrucciones del fabricante (TRIzol[®] Reagent, Molecular Research Center, Inc, USA). A partir de 1 µg/µL de ARN total se procedió a la síntesis de la primera cadena de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa, utilizando el kit Transcriptor First Strand cDNA synthesis de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Los niveles de expresión de ARNm de IL-21 fueron analizados mediante la técnica PCR en un termociclador de 96 pocillos (Fisher Bistec, Australia), a partir de 50 ng/µL de cDNA, utilizando partidores específicos (Tabla1) y siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto y 74° durante 5 minutos y una incubación final a 74°C durante 1 minuto. La amplificación fue evaluada a mediante electroforesis en gel agarosa 1,5% revelado con GelRed™ (Biotium, CA, USA). Como control de amplificación se analizaron los niveles de expresión de la subunidad ribosomal ARNr 18S.

Como control positivo y negativo de la expresión ARNm de IL-21 se utilizaron Linfocitos T de la línea celular Jurkat activados y no activados (VI-Cel XR™, Beckam Coulter, CA, USA) respectivamente.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de IL-21 y RNAr 18S mediante PCR.

	Forward Primer	Reverse Primer
IL-21	5`-aggaaaccaccttccacaaa-3`	5`-gaatcacatgaagggcatgtt-3`
18S RNA	5`-ctcaacacgggaaacctcac -3`	5`-cgctccaccaactaagaacg-3`

Inmunohistoquímica (IHQ)

Las biopsias fijadas en solución de formalina fueron sometidas a procesamiento histológico convencional mediante deshidratación con una gradiente ascendente de alcoholes y xilol (Merck) e inclusión en parafina histológica (Jung-Histowax®, Reichert-Jung Lab., Alemania). Con un micrótopo manual (E. Leitz, Wetzler, Alemania) se obtuvieron cortes de 4µm de espesor, los que fueron montados en placas de microscopía silanizadas, en un número de 2 por placa (muestra experimental y control negativo de técnica). Previa desparafinación en xilol y rehidratación con una gradiente descendentes alcoholes (Merck), se procedió a bloquear la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (Merck) al 3% en metanol por 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior al desecado de las muestras y demarcación del área de incubación usando un lápiz de hidrofobicidad (Dako Pen, Dako, Dinamarca), los cortes se rehidrataron mediante 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS) (Hemagen Diagnostics INC®, Maryland, USA) durante 5 minutos y se bloquearon con suero equino (bloqueo de la unión inespecífica del anticuerpo secundario) durante 20 minutos a temperatura ambiente (Vectastain ABC kit, Vector Lab., CA, USA).

Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-IL-21 humano (Biolegend, CA, USA) a una concentración de 50 µg/µL en cámara húmeda a 4°C. Los controles negativos fueron incubados con suero equino como se ha descrito previamente.

Luego de al menos 12 horas de incubación y previo lavado en PBS 3 veces durante 5 minutos, la inmunorreacción fue revelada utilizando un kit específico

ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate (Vector Lab.), el cual consiste un anticuerpo monoclonal secundario anti-ratón conjugado con biotina y estreptavidina conjugada con peroxidasa, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción enzimática se reveló utilizando el kit Vectastain ABC (Vector Lab.) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS, se contratiñeron con hematoxilina de Mayer modificada por Lillie (ScyTek Lab. UTAH, USA) y se montaron con medio hidrofóbico (Flotex®, Lerner Laboratories, Pittsburg, PA, USA). Finalmente, los cortes fueron examinados con un microscopio óptico (Zeiss, Axiostar Plus®, Alemania) y se fotografiaron las áreas más representativas utilizando una cámara digital (Canon Powershot A640, Japón).

Resultados

Mediante PCR, en todas las biopsias de GP se detectó expresión de ARNm de IL-21, la que no se observó en el control negativo de la técnica (Figura 6). En los GPs, los niveles de expresión de IL-21 fueron similares a los detectados en los linfocitos T de línea celular Jurkat activados en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD25, la que fue mayor a la observada en células Jurkat no estimuladas (Figura 6).



Figura 6. Expresión de IL-21 en los granulomas periapicales (GPs) y en linfocitos Jurkat activos e inactivos utilizados como control. (A) Expresión de IL-21 ARNm en 6 GPs (G1-G6) y en (B) linfocitos Jurkat inactivos, utilizandos como control de la síntesis en células no estimuladas, y Jurkat activadas con anti-CD3 y -CD25, utilizadas como control de la síntesis en células estimuladas. G1-G6, biopsias de granulomas. H₂O, control negativo de técnica; J⁻ Células T Jurkat no activadas; J⁺, Células T Jurkat activadas.

El diagnóstico clínico y radiográfico de GP fue confirmado mediante el análisis histopatológico. Las lesiones evidenciaron abundante tejido de granulación y vasos de neoformación con un denso infiltrado inflamatorio constituido principalmente de polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y linfocitos. No se detectaron restos epiteliales en ninguno de los GPs estudiados, descartándose el diagnóstico de QR.

Inmumoreacción positiva para IL-21 fue detectada en forma difusa en el infiltrado inflamatorio en todos los GPs. No se detectó secreción de IL-21 en los controles de ligamento periodontal sano (Figura 7). La inmumoreacción positiva se asoció principalmente a linfocitos, macrófagos y neutrófilos (Figura 7).

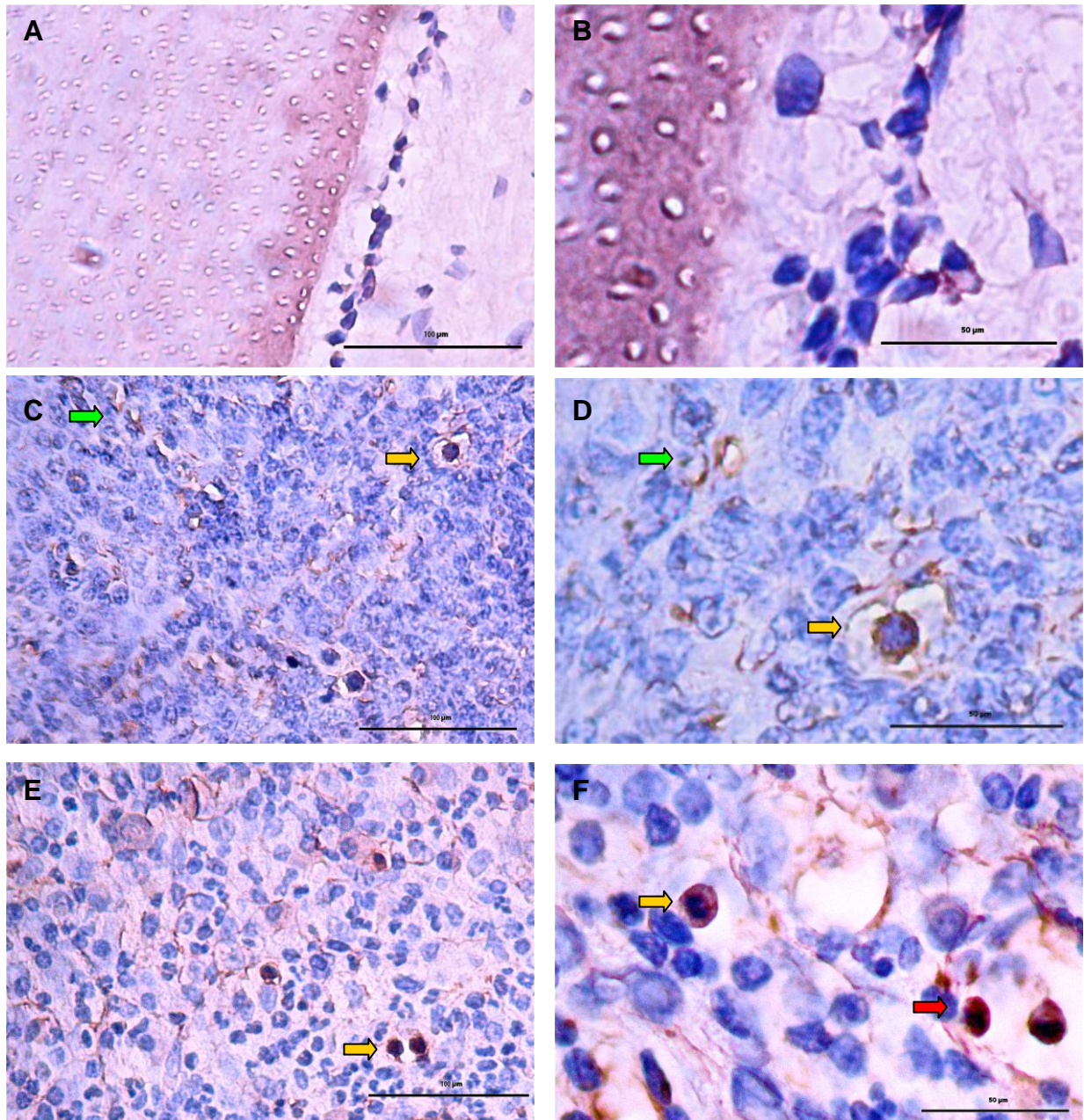


Figura 7. Síntesis de IL-21 en granulomas periapicales (GPs) evaluada mediante IHQ. (A) Ligamento periodontal periapical sano en longitud de barra 100 µm y (B) 50 µm. No se observa inmunoreacción para IL-21. (C) Secreción de de IL-21 en cortes de amígdala, longitud de la barra 100 µm y (D) 50 µm. (E) Expresión de IL-21 GPs, longitud de la barra 100 µm y (F) 50 µm. Se observa inmunoreacción positiva asociada a linfocitos (flecha amarilla), macrófagos (flecha roja), y en el infiltrado inflamatorio (flecha verde).

Discusión

La PAC es una enfermedad infecciosa de naturaleza inflamatoria desarrollada ante la agresión bacteriana localizada en la pulpa de los dientes y que se caracteriza por la destrucción de los tejidos perirradiculares. El diagnóstico clínico de PAC puede corresponder histopatológicamente tanto a GP como a QRI. En este estudio todas las biopsias analizadas mostraron una histología compatible con GP.

Las células inmuno-inflamatorias cumplen un rol esencial en la patogenia de los GPs; entre ellas los macrófagos y los linfocitos T son los más abundantes en el infiltrado celular [6]. Estas células y los mediadores proinflamatorios que secretan son los principales responsables de la destrucción de los tejidos perirradiculares [6]. En efecto, mediadores moleculares tales como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , RANKL, GM-CSF, INF- γ , Óxido Nítrico, prostaglandinas y metaloproteinasas de matriz (MMPs) han sido asociados a la patogenia de estas lesiones [1]. Una de las principales características de la PAC es la osteolisis que ocurre en la zona periapical del diente, donde RANKL producida por los linfocitos Th17 cumple un rol fundamental [1].

En el presente estudio se evidencia la expresión y secreción de IL-21 en los GPs, datos que nos permite especular que IL-21 participa en la patogenia de las lesiones. Estudios previos han demostrado el rol de IL-21 en la patogenia de diversas lesiones de naturaleza inflamatoria, tanto aguda como crónica [23, 26, 27], y han establecido que IL-21 es producida principalmente por los linfocitos T CD4⁺ y NK y su secreción es dependiente del medio ambiente tanto fisiológico como patológico en que las células se encuentran [9, 24]. Nuestros datos en GPs demuestran inmunoreacción positiva de IL-21 asociada a polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y linfocitos T. En este contexto, nosotros especulamos que IL-21 es un factor patogénico relevante para el desarrollo de los GPs, en una fase inicial aguda secretada por los macrófagos y neutrófilos y en una fase crónica más tardía secretada por los linfocitos T.

Los niveles de expresión de IL-21 en los GPs son similares a los expresados en linfocitos T Jurkat activados utilizados como control. Así, la presencia de IL-21 en estas lesiones podría asociarse a los estados activos de la

enfermedad, en que los macrófagos, neutrófilos y/o linfocitos T se encuentran activamente secretando esta y otras citoquinas, definiendo la respuesta inflamatoria constituida y determinando la destrucción tisular característica de la enfermedad.

IL-21 es un mediador fundamental en enfermedades inflamatorias crónicas que involucran linfocitos T, entre ellas la enfermedad de Crohn (EC), el lupus eritematoso sistémico (LES) y la psoriasis (PS). En estas lesiones, se ha demostrado que las células que sintetizan IL-21 expresan también INF- γ , sugiriendo que corresponden a linfocitos Th1. En efecto, la estimulación con IL-21 de linfocitos T de la mucosa intestinal obtenidas de pacientes afectados con EC provoca un aumento en la expresión de T-bet, indicando un rol paracrino de esta citoquina que amplifica una respuesta inflamatoria de tipo Th1 [23]. Un polimorfismo en dos regiones del gen de IL-21 se ha detectado en pacientes afectados de LES, los que evidencian niveles séricos incrementados de IL-21 que se correlacionan con la severidad de la enfermedad [23]. En la PS, mayores niveles de expresión de IL-21 fueron detectados en la piel afectada en comparación con piel sana [23] y al inyectar en forma intradérmica IL-21 recombinante en animales de experimentación se observó la inducción de signos característicos de la PS, con un infiltrado inflamatorio caracterizado por el predominio en linfocitos Th1 y Th17.

La activación y diferenciación de los distintos fenotipos efectores de linfocitos T, especialmente de los fenotipos Treg y Th17 que poseen en eventos tempranos una vía de diferenciación común, involucra *feedbacks* positivos mediados por citoquinas, las que a su vez provocan una inhibición cruzada [8]. Los niveles de TGF- β 1 y la presencia o ausencia de citoquinas proinflamatorias, tal como IL-6, determinan el balance de la expresión de Foxp3 o ROR γ t/RORC2 y por lo tanto la diferenciación selectiva y mutuamente excluyente de un fenotipo Treg o un fenotipo Th17 [13]. Datos recientes han demostrado que IL-21 es capaz de inhibir la expresión de TGF- β 1 y por tanto la expresión del factor de transcripción Foxp3, gen master-switch responsable de diferenciación de los linfocitos Treg [14]. Adicionalmente, se ha demostrado que IL-21 incrementa la secreción de IL-17 en linfocitos T activados [13], citoquina que inhibe la expresión de Foxp3 y la concomitante diferenciación de los linfocitos Treg y activa la expresión de

ROR γ t/RORC2, gen master-switch responsable de diferenciación de los linfocitos Th17 y estos de la producción de citoquinas proinflamatorias y factores osteodestructivos que llevan a la destrucción tisular patológica. En efecto, Yang y cols. recientemente demostraron la activación y diferenciación *in vivo* de linfocitos Th17 en presencia de TGF- β e IL-21 y ausencia de IL-6 [14]. Así, en los GPs, aún en ausencia de IL-6, la presencia de IL-21 en el sitio de inflamación estimularía la diferenciación de linfocitos Th17 capaces de secretar RANKL e inducir la osteodestrucción periapical.

Los linfocitos Th17 cumplen un rol fundamental en la defensa contra bacterias y hongos [8]. Estos linfocitos constituyen un mecanismo de defensa temprano del organismo que media la inmunidad innata y la adaptativa a través de la síntesis de IL-17 y la estimulación de la migración de neutrófilos [8]. Un incremento en los niveles de IL-17 en el fluido gingival crevicular y en biopsias de lesiones periodontales fue detectado en pacientes con periodontitis crónica y estos mayores niveles se asociaron a linfocitos T CD4⁺ [28]. Además, elevados niveles de RANKL eran sintetizados en lesiones periodontales caracterizadas por un incremento en la síntesis de IL-17 por linfocitos T gingivales [28] y sobreexpresión de RORC2 [8, 29]. Tal como se muestra en la Figura 3, existiría una asociación directa e indirecta entre el fenotipo Th17 y la destrucción ósea alveolar que caracteriza a las periodontitis. Sobre la base de este modelo, la destrucción ósea periapical que ocurre en los GPs tendría los mismos patrones celulares y moleculares que desencadenan la destrucción ósea durante la periodontitis marginal. De esta forma, IL-21 sería una citoquina proreabsortiva y al igual que IL-6 e IL-1 β participaría de los eventos osteodestructivos al inducir el fenotipo Th17 y su actividad osteoclastogénica.

El conocimiento de la patogenia de los GPs podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de prevención de estas lesiones y así de la pérdida de los dientes. En este contexto, para controlar el proceso reparativo de una lesión crónica es necesario identificar los mediadores moleculares involucrados. Nuestros datos nos permiten especular que IL-21 cumple un rol crucial en el desarrollo de lesiones periapicales al identificarse en los eventos tempranos de la respuesta inflamatoria y participar en los eventos tardíos de su patogenia, favoreciendo la osteolisis periapical mediada por los linfocitos Th17. IL-21 estaría

involucrada directamente en la destrucción de tejidos del periápice al regular las células responsables de secretar mediadores osteodestructivos, por ejemplo RANKL. La asociación de IL-21 a la patogenia de los GPs contribuye a una mejor comprensión eventos inmunopatológicos que implican su desarrollo y permiten proyectar una potencial inmunointervención de la enfermedad.

Conclusión

En los GPs, los linfocitos T, macrófagos y neutrófilos producen elevados niveles de expresión y secreción de IL-21, los que podrían asociarse a los eventos osteodestructivos mediados por los linfocitos Th17.

Referencias Bibliográficas

1. Vernal, R., et al., *RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction*. Oral Dis, 2006. **12**(3): p. 283-9.
2. Nair, P.N., *Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures*. Crit Rev Oral Biol Med, 2004. **15**(6): p. 348-81.
3. Colic, M., et al., *Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines*. Arch Oral Biol, 2006. **51**(12): p. 1120-30.
4. Liapatas, S., M. Nakou, and D. Rontogianni, *Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study*. Int Endod J, 2003. **36**(7): p. 464-71.
5. Takahashi, K., *Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease*. Int Endod J, 1998. **31**(5): p. 311-25.
6. Kopitar, A.N., N. Ihan Hren, and A. Ihan, *Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation*. Oral Microbiol Immunol, 2006. **21**(1): p. 1-5.
7. Marton, I.J. and C. Kiss, *Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 2000. **15**(3): p. 139-50.
8. Vernal, R. and J.A. Garcia-Sanz, *Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection*. Infect Disord Drug Targets, 2008. **8**(4): p. 207-20.
9. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 57-79.
10. Gaffen, S.L. and G. Hajishengallis, *A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17*. J Dent Res, 2008. **87**(9): p. 817-28.
11. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.

12. Killar, L., et al., *Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4(IL 4)/B cell stimulatory factor 1(BSF-1) fail to help antigen-specific B cells.* J Immunol, 1987. **138**(6): p. 1674-9.
13. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
14. Yang, L., et al., *IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells.* Nature, 2008. **454**(7202): p. 350-2.
15. Diaz-Guerra, E., et al., *Translation controlled mRNAs: new drug targets in infectious diseases?* Infect Disord Drug Targets, 2008. **8**(4): p. 252-61.
16. Fukada, S.Y., et al., *Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases.* Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(1): p. 25-31.
17. Korn, T., et al., *Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties.* Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 362-71.
18. Fouser, L.A., et al., *Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity.* Immunol Rev, 2008. **226**: p. 87-102.
19. Fina, D., et al., *Role of interleukin-21 in inflammation and allergy.* Inflamm Allergy Drug Targets, 2007. **6**(1): p. 63-8.
20. Monteleone, G., F. Pallone, and T.T. MacDonald, *Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses.* Trends Immunol, 2008. **29**(6): p. 290-4.
21. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
22. Ettinger, R., S. Kuchen, and P.E. Lipsky, *The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease.* Immunol Rev, 2008. **223**: p. 60-86.
23. Monteleone, G., F. Pallone, and T.T. Macdonald, *Interleukin-21 (IL-21)-mediated pathways in T cell-mediated disease.* Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 185-91.
24. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Cytokine mediators of Th17 function.* Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 658-61.
25. Parrish-Novak, J., et al., *Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function.* Nature, 2000. **408**(6808): p. 57-63.

26. Pelletier, M., A. Bouchard, and D. Girard, *In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7521-30.
27. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-7.
28. Vernal, R., et al., *Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis*. J Clin Periodontol, 2005. **32**(4): p. 383-9.
29. Dutzan, N., et al., *Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis*. J Periodontol, 2009. **80**(2): p. 290-6.
30. Brandt, K., et al., *Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 223-32.

Anexos

Anexo 1: Formulario de Consentimiento Informado.

Trabajo de Investigación: **INCREMENTO EN LOS NIVELES DE INTERLEUQUINA-21 Y SU PAPEL EN LA PATOGENIA DE LOS GRANULOMAS PERIAPICALES**

Objetivos: El objetivo del presente trabajo es analizar la expresión de IL-21 en los granulomas periapicales y asociar su presencia a la patogenia de la enfermedad.

Investigador responsable: Rolando Vernal Astudillo; Depto. De Odontología Conservadora, Área de Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Fono: 9781815. email: rvernal@uchile.cl.

Presidente del Comité ético científico: Prof. Dr. Juan Cortés. Fono: 9781701.

Antecedentes Generales

Las lesiones periapicales (periodontitis apical crónica) se producen generalmente como consecuencia de caries dentales. 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 del presente estudio es caracterizar posibles mediadores de destrucción tisular asociados a estas lesiones, en estados de enfermedad y salud. Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura.

Procedimiento

Se incluirán sujetos mayores de 18 años, que en el examen clínico y radiográfico presenten diagnóstico de Periodontitis Apical Crónica. En los pacientes que presenten indicación de extracción dentaria, las lesiones asociadas serán biopsiadas y/o se extirpará el tejido a partir del diente extraído y se realizarán en forma gratuita para el paciente. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos ni costos adicionales para el paciente y una vez analizadas serán descartadas.

El total de muestras y datos obtenidos serán almacenadas por el investigador responsable para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, sólo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

Ventajas

Como ventajas de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les obsequiarán elementos de higiene dental. Además, el diagnóstico de biopsia y radiografías con fines de este estudio no tendrán costo económico.

Declaro

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación.

Identificación Paciente:

Nombre.....
RUT.....
Teléfono.....
Firma.....

Identificación Dentista:

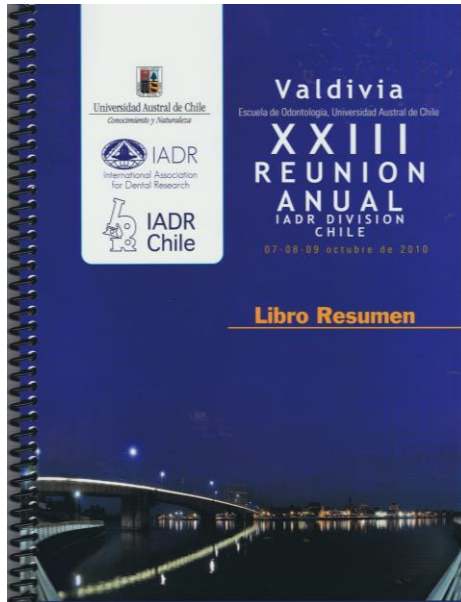
Nombre.....
RUT.....
Firma.....

Identificación Jefe de Clínica

Nombre.....
RUT.....
Firma.....

Anexo 2: Resúmenes congreso IADR Valdivia 2010 y congreso IAP (Internacional Association of Pathology) 2010.

Se adjuntan resúmenes de ambos congresos en los cuales se presentó este trabajo durante el mes de octubre de 2010.



Abstract N° 200 - **Microbiology / Immunology and Infection Control**
Day: Viernes 8 de octubre 2010 Session: 9

EXPRESSION OF INTERLEUKIN-21 AND ITS ASSOCIATION WITH PERIAPICAL GRANULOMA PATHOGENESIS

Navarrete, Mónica*; Dezerega, Andrea; Gamonal, Jorge; Franco, María Eugenia; Díaz, Jaime; Vernal, Rolando

Corresponding author: Mónica Navarrete Tricallotis - monatrica@gmail.com

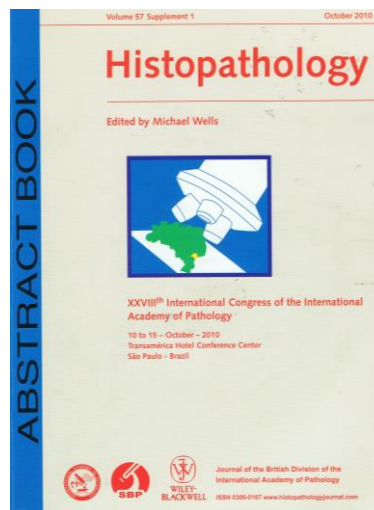
Affiliation: U. DE CHILE Santiago

Aim: Periapical granulomas (PG) are destructive inflammatory pathologies characterized mainly by periapical bone destruction as a consequence of dental pulp infection. T-helper 17 (Th17) lymphocytes associate with an osteodestructive pattern of host immune response and interleukin 21 (IL-21) plays a central role inducing the differentiation and function of Th17 lineage during pathogenesis of several infectious pathologies. The aim of the present study is to analyze the presence and role of IL-21 in periapical granulomas.

Materials and methods: PG samples were collected from teeth affected with asymptomatic lesions as a consequence of caries during tooth extractions. To characterize the expression pattern of IL-21, fifth samples were fixated in 10% formalin and analyzed by immunohistochemistry and ten samples were transported in RNA-safer for PCR analysis and quantification. Healthy periodontal ligament and gingiva samples were used as negative control and a lymph node as positive control.

Results: Higher levels of IL-21 and its receptor IL-21R were detected in PG lesions compared with healthy samples. In addition, IL-21 immunoreactivity was localized mainly in lymphocytes and macrophages.

Conclusion: These data allow us to suggest that IL-21 might be involved in PG pathogenesis. Supported by FONDECYT 1090046 y FIOUCH 09-8.



402

Levels of interleukin-21 in apical periodontitis and their association with disease pathogenesis and clinical symptomatology

C Rivera, M Navarrete, ME Franco, J Gamonal, J García-Sesnich, M Hernández, R Vernal, A Dezerega

Periodontal Biology Laboratory, Conservative Department, Dentistry School, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Introduction: Apical lesions (AL) are destructive inflammatory pathologies that affect the periapical periodontium as a consequence of dental pulp infection. Clinically, they are referred as apical periodontitis (AP). Th17 cells associate with an osteodestructive pattern of immune response and play a pivotal role in periodontal tissue destruction. IL-21 promotes Th17-cell differentiation and

function in affected tissues; however, in spite of the increasing knowledge regarding AL pathogenesis, the precise bone-resorptive cytokines associated with tissue destruction remain unknown. The aim of this study is to analyze the role of IL-21 in AP pathogenesis and clinical symptomatology.

Material and Methods: Periapical exudate samples were collected from root canals during endodontic treatment from teeth affected with symptomatic and asymptomatic AP. AL and tissue from healthy periapical ligaments were also sampled. Eluates and homogenates of these samples were analyzed by ELISA and immunowestern blot to determine IL-21 levels and molecular forms. To characterize the expression pattern of IL-21, samples with diagnosis of AP were obtained, histopathologically diagnosed as apical granuloma (AG) or radicular cyst (RC) and then analyzed by immunohistochemistry.

Results: Higher levels of IL-21 were detected in tissue samples from AL compared with healthy controls and in periapical exudates from symptomatic compared with asymptomatic AP. In addition, IL-21 immunoreactivity was localized mainly in neutrophils and lymphocytes from both, AG and RC lesions.

Conclusions: These data indicate that neutrophils and lymphocytes either synthesize or represent the main targets of IL-21 in AL and suggest that higher IL-21 levels are involved in disease pathogenesis and associate with clinical symptomatology.

