

# Expresión de CCL-7 y CCR-5 en Lesiones Periapicales

## CCL-7 and CCR-5 Expression in Apical Lesions

Dezerega A<sup>1</sup>, Oyarzún A<sup>2</sup>, Dutzan N<sup>1</sup>, Osorio C<sup>1</sup>, Mundi V<sup>1</sup>, Hernández M<sup>1</sup>

### RESUMEN

La quimiotaxis es un fenómeno clave en la patogenia de las Lesiones Periapicales de origen endodóntico (LPAe), ya que a través de ella se produce la migración de células inflamatorias hacia el tejido periapical. CCL-7 es una quimioquina cuya población blanco la comprenden principalmente monocitos-macrófagos, ejerce su acción a través de la unión a distintos receptores, entre ellos CCR-5, y hasta la fecha su expresión en LPAe no ha sido estudiada. **Objetivo:** Observar la presencia de CCL-7 y CCR-5 en biopsias de LPAe y estudiar la expresión de CCL-7 en Periodontitis Apical (PA). **Método:** Muestras de exudado periapical (EP) fueron obtenidas de canales de dientes sometidos a terapia endodóntica. El diagnóstico de estos dientes fue Periodontitis Apical Sintomática (PA) (n=15) y Periodontitis Apical Asintomática (PAa) (n=15). Se realizó "immunowestern blot" para determinar la expresión de CCL-7 en estas muestras. La intensidad de las bandas fue medida a través de análisis densitométrico. Para determinar la expresión de CCL-7 y CCR-5 en LPAe se obtuvieron biopsias de cirugías periapicales, se procesaron con técnicas de rutina y diagnosticaron histopatológicamente como granulomas periapicales N=8 (GP) o quistes radiculares inflamatorios N=2 (QRI), y luego se analizaron con inmunohistoquímica. Las muestras fueron observadas con microscopio óptico. Como control se utilizó ligamento periodontal apical sano obtenido de dientes con indicación de extracción por ortodoncia (N=10). **Resultados:** CCL-7 se expresa en EP de PA y no en sanos. A su vez, tanto CCL-7 como CCR-5, se observa en LPAe. La presencia de CCL-7 y CCR-5 en GP y QRI se localiza mayoritariamente en el infiltrado inflamatorio. La expresión de las moléculas en estudio no fue detectada en controles sanos. **Conclusión:** CCL-7 podría tener un rol en la patogénesis de las LPAe, probablemente estimulando quimiotaxis.

**Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 2(2); 59-62, 2009.**

**Palabras clave:** Quimiotaxis, lesiones periapicales, periodontitis apical, CCL-7, CCR-5.

### ABSTRACT

**Introduction:** One of the key phenomena in Apical Lesions (AL) pathogenesis is chemotaxis. CCL-7 is a very potent chemoattractant for monocytes, and CCR-5 corresponds to one of its receptors. Until now, CCL-7 and CCR-5 expression in AL remains unknown. **Objectives:** To study the expression of CCL7 and CCR-5 in AL. **Methods:** Periapical exudates (PE) samples were collected from root canals during routine endodontic treatments from teeth with diagnosis of symptomatic (n=15) and asymptomatic Apical Periodontitis (AP) (n=15), and "immunowestern blot" was conducted to assess the expression of CCL-7. The intensity of the bands was measured by densitometric analysis. As controls, homogenized tissue from healthy periapical ligaments was obtained during teeth extraction for orthodontic reasons (n=10). To determine the expression of CCL-7 and CCR-5 in AL, biopsies from teeth with clinical diagnosis of chronic AP were obtained during apical surgery procedures, processed by routine technique and histopathologically diagnosed as Apical Granuloma (AG) (n=8) or Radicular Cyst (RC) (n=2) and then, analyzed by immunohistochemistry. The samples were examined with light microscope. As controls, biopsies from healthy periapical ligaments obtained during teeth extraction for orthodontic reasons were used. **Results:** CCL-7 was highly expressed in PE samples, and its expression could not be observed in healthy controls. The presence of CCL-7 and CCR-5 in AG and RC is mainly located to the inflammatory infiltrate. No expression was observed in healthy controls. **Conclusions:** CCL-7 and CCR-5 may play a role in AP pathogenesis, may be by stimulating chemotaxis.

**Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 2(2); 59-62, 2009.**

**Key words:** Chemotaxis, apical lesions, apical periodontitis, CCL-7, CCR-5.

### INTRODUCCIÓN

Las lesiones periapicales de origen endodóntico (LPAe) constituyen un mecanismo de respuesta del organismo frente a la infección bacteriana del sistema de canales radiculares del diente. La necrosis del tejido pulpar es seguida por la destrucción del tejido periapical, que compromete ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar, con la formación de un granuloma periapical (GP) o quiste radicular (QR)<sup>(1,2)</sup>. Respecto a los mecanismos moleculares que median la destrucción tisular característica de estas lesiones, se sabe que citoquinas como IL-1b, TNF- $\alpha$ <sup>(3)</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>(4)</sup>, IL-4<sup>(5)</sup>, IL-6<sup>(6)</sup>, IL-17<sup>(7)</sup> y RANK-L<sup>(2,8)</sup>, quimioquinas como GM-CSF<sup>(6)</sup>, IL-8, Rantes y MCP-1<sup>(9)</sup>, mediadores inflamatorios

como PG-E2<sup>(10)</sup> y óxido nítrico<sup>(11)</sup>, metaloproteinasas de la matriz (MMP) -1, -2, -3<sup>(12)</sup>, -8<sup>(13)</sup> y -13<sup>(14)</sup> están presente durante la génesis de dichas lesiones, pero la interrelación exacta entre ellas y el infiltrado celular que las produce, así como el proceso patológico que se desencadena, aún representan una incógnita.

Los macrófagos corresponden al tipo celular más numeroso presente en LPAe, y se les atribuye un rol central en estas lesiones ya que participan en la inmunidad innata y adaptativa, así como en la regulación de la destrucción tisular<sup>(15)</sup>. La llegada de estas células a un foco inflamatorio obedece a la presencia de gradientes de citoquinas quimiotácticas, las que son producidas debido a estimulación antigénica y proinflamatoria tanto por células residentes como infiltrantes de los

1. Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.  
2. Unidad de Biología Oral, Facultad de Odontología, Universidad Finis Terrae. Chile.

tejidos<sup>(16)</sup>. Dentro de las quimioquinas cuya población blanco está constituida por células del linaje monocito-macrófago están las Proteínas Quimioattractantes para Monocitos (MCP), familia CC compuesta por cinco miembros a la fecha, CCL-2, -8, -7, -13 y -12. De ellas, sólo CCL-2 (MCP-1) ha sido estudiada en LPAe, asociándose su presencia a células endoteliales próximas a focos inflamatorios<sup>(9)</sup>.

CCL-7 (MCP-3) es considerada la más pleiotrópica de las MCPs, ya que dentro de los receptores a los que se une están CCR-1, CCR-2, CCR-3 y CCR-5, diversidad que le otorga actividades en diferentes células blanco<sup>(17)</sup>.

Hasta la fecha se desconoce la presencia de CCL-7 en LPAe.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Selección de Pacientes

Se seleccionaron pacientes con diagnóstico clínico de Periodontitis Apical asintomática (PAa) y sintomática (PAs), en las clínicas de Endodoncia y Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y se obtuvieron muestras de exudado apical (PAa n=14 y PAs n=14) y biopsias de LPAe (n=10) con diagnóstico clínico de PAa. También se seleccionaron sujetos sanos, con indicación ortodóncica de exodoncia de premolares inferiores (n=10). Se excluyeron del presente estudio aquellos pacientes que hubieran recibido medicación de antibióticos, corticoides o de antiinflamatorios en los últimos 3 meses o que presentaran enfermedades sistémicas.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, fue explicado detalladamente a los pacientes, y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de ellos.

### 2. Obtención y Preparación de las Muestras

**2.1. Exudado periapical:** Las muestras de exudado periapical se obtuvieron bajo aislamiento absoluto del campo operatorio, a través del interior del canal radicular. Para tal efecto se realizó la cavidad de acceso, evitando la contaminación con agua o irrigantes, y se introdujo una punta de papel absorbente estéril (Maillefer R, Dentsply) N° 20 por 30 segundos al interior del canal radicular<sup>(18)</sup>. En caso de observarse sangre en las puntas de papel, éstas se descartaron. Las muestras fueron eluidas desde las puntas utilizando amortiguador de elución NaCl 0,9%. Los eluidos se conservaron a -80 °C hasta su utilización. Como controles se obtuvo tejido periapical de dientes sanos, extraídos por indicación ortodóncica, el que se homogenizó en el mismo amortiguador de elución anteriormente descrito.

**2.2. Biopsias de LPAe:** Se obtuvieron muestras de LPAe de dientes con diagnóstico de PAa e indicación de extracción, se fijaron en Formalina Tamponada al 10%, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 6µ para realizar tinción de rutina y confirmar el diagnóstico histopatológico de quiste radicular (QR) o granuloma periapical (GP), para luego realizar estudios inmunohistoquímicos<sup>(14)</sup>. Como controles se obtuvieron biopsias de tejido periapical de dientes sanos, extraídos por indicación ortodóncica, las que se procesaron de igual forma que las LPAe.

**3. Inmunowestern blot:** Para determinar la presencia de CCL-7 en exudado periapical de dientes con PA y homogenizado de ligamento pe-riodontal apical sano se cargaron alícuotas de dichas muestras en SDS-PAGE a 90 volts por 4 horas. Luego, las proteínas así separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad, 0,45 µm). Dicha membrana fue bloqueada por una hora en amortiguador TBS-T con leche descremada al 3% e incubada con un anticuerpo primario antiMCP3 (R&D systems) durante la noche. La visualización de la reacción se realizó utilizando el kit Femto (Pierce Biotechnology, Rockford, USA), según indicaciones del fabricante, consistente en la incubación de la membrana con anticuerpo secundario, aplicación del sustrato quimioluminiscente y exposición a películas radiográficas (G&E). La intensidad de las bandas fue medida por análisis densitométrico.

**4. Inmunohistoquímica:** Para determinar la presencia de CCL-7 y CCR-5 en biopsias de LPAe y controles se obtuvieron cortes de 6 micrones, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena (con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol) y los sitios inespecíficos (con BSA al 3% en PBS). Luego se incubó con anticuerpo primario contra CCL-7 (Abcam) y CCR2 (RnD systems) respectivamente, seguido de un anticuerpo secundario biotinilado y finalmente un conjugado de estreptavidina y peroxidasa. La reacción fue desarrollada con Diaminobenzidina (DAB). Por último, se contratiñó con hematoxilina.

## RESULTADOS

De las 10 biopsias obtenidas, el diagnóstico histopatológico de rutina mostró la presencia de 2 QR y 8 GP. Al realizar el análisis inmunohistoquímico de estas lesiones se observa que CCL-7 está altamente expresada tanto en QR como en GP (Figura 1), asociada principalmente al infiltrado inflamatorio, en células con morfología compatible con macrófagos; también se observó su expresión en células endoteliales y células epiteliales en el caso de los QR. Su presencia fue casi inexistente en controles. Para CCR-5 también se observó detección tanto en GP como QR, asociada principalmente a la presencia de infiltrado inflamatorio.

A su vez, al analizar la expresión de CCL-7 en muestras de exudado periapical, podemos ver que efectivamente esta quimioquina está presente en exudado de pacientes con PA (Figura 2), y que su expresión es ligeramente mayor en PAs que en PAa (Tabla 1), no observándose expresión en controles.

Tabla 1. Bandas de CCL-7 en exudado periapical de dientes con PA.

	PA asintomática		PA sintomática		P
	Casos detectables (n)	Nivel (ua) (Prom±DS)	Casos detectables (n)	Nivel (ua) (Prom±DS)	
CCL-7	14	110247±78471	14	168999±161244	0,45

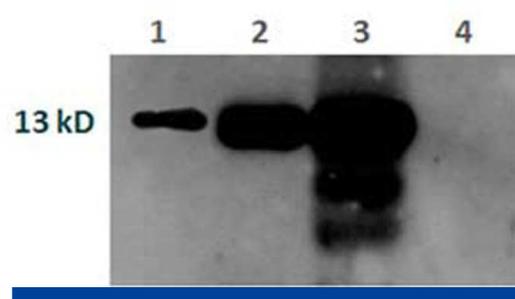
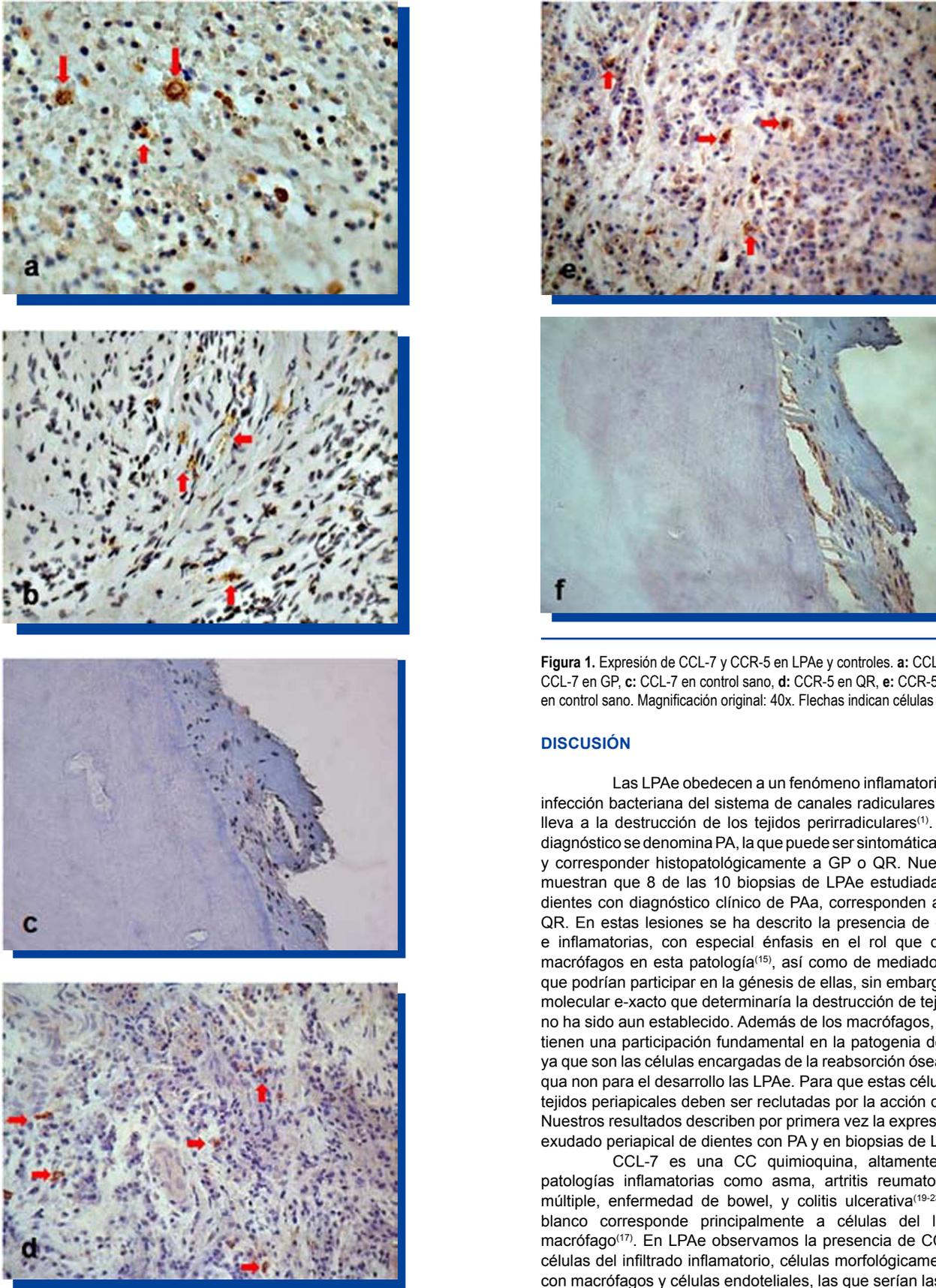


Figura 2. Expresión de CCL-7 en exudado periapical de dientes con PA y controles. 1: CCL-7 control positivo. 2: PAa, 3: PAs, 4: Ligamento periodontal apical sano.



**Figura 1.** Expresión de CCL-7 y CCR-5 en LPAe y controles. **a:** CCL-7 en QR, **b:** CCL-7 en GP, **c:** CCL-7 en control sano, **d:** CCR-5 en QR, **e:** CCR-5 en GP, **f:** CCR-5 en control sano. Magnificación original: 40x. Flechas indican células positivas.

## DISCUSIÓN

Las LPAe obedecen a un fenómeno inflamatorio causado por la infección bacteriana del sistema de canales radiculares cuyo desenlace lleva a la destrucción de los tejidos perirradiculares<sup>(1)</sup>. Clínicamente el diagnóstico se denomina PA, la que puede ser sintomática o asintomática<sup>(6)</sup> y corresponder histopatológicamente a GP o QR. Nuestros resultados muestran que 8 de las 10 biopsias de LPAe estudiadas, obtenidas de dientes con diagnóstico clínico de PAA, corresponden a GP y sólo 2, a QR. En estas lesiones se ha descrito la presencia de células inmunes e inflamatorias, con especial énfasis en el rol que desempeñan los macrófagos en esta patología<sup>(16)</sup>, así como de mediadores moleculares que podrían participar en la génesis de ellas, sin embargo el mecanismo molecular e-xacto que determinaría la destrucción de tejidos a este nivel no ha sido aun establecido. Además de los macrófagos, los osteoclastos tienen una participación fundamental en la patogenia de estas lesiones ya que son las células encargadas de la reabsorción ósea, condición sine qua non para el desarrollo las LPAe. Para que estas células alcancen los tejidos periapicales deben ser reclutadas por la acción de quimioquinas. Nuestros resultados describen por primera vez la expresión de CCL-7 en exudado periapical de dientes con PA y en biopsias de LPAe.

CCL-7 es una CC quimioquina, altamente expresada en patologías inflamatorias como asma, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, enfermedad de bowel, y colitis ulcerativa<sup>(19-23)</sup>. Su población blanco corresponde principalmente a células del linaje monocito-macrófago<sup>(17)</sup>. En LPAe observamos la presencia de CCL-7 asociada a células del infiltrado inflamatorio, células morfológicamente compatibles con macrófagos y células endoteliales, las que serían las encargadas de producir esta quimioquina como respuesta a estimulación antigénica y proinflamatoria<sup>(17)</sup>.

Trabajos similares, donde han estudiado la expresión de quimioquinas en LPAe, han determinado la presencia de RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y MCP-1<sup>(9,24,25)</sup>, también del grupo de CC quimioquinas, y en concordancia con nuestros resultados, la expresión de estas moléculas se observa asociada a infiltrado inflamatorio y células endoteliales<sup>(9,25)</sup>.

Además de los tipos celulares ya mencionados, son fuentes de CCL-7 fibroblastos y células mononucleares, donde la expresión es inducida a través de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , y plaquetas, donde la expresión de CCL-7 es constitutiva<sup>(17)</sup>. De esta forma la expresión de CCL-7 en LP Ae puede deberse a su inducción por acción de mediadores proinflamatorios como son IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , o bien a la presencia de LPS bacteriano<sup>(26)</sup>, moléculas ampliamente descritas en PA<sup>(3)</sup>.

De esta forma, la expresión de CCL-7 presente tanto en QRI como en GP podría explicar en parte la presencia de células derivadas del linaje monocito/macrófago presente en LP Ae.

Para ejercer su acción CCL-7 debe unirse a sus receptores. Nuestros resultados demuestran la presencia de uno de ellos, CCR-5, en biopsias de LP Ae. De modo similar se ha descrito la presencia de CCR-1, -2, -3 y -5 en estas lesiones<sup>(24)</sup>, lo que confirmaría la posible participación de CCL-7 en la patogenia de las LP Ae.

Además de las biopsias de LP Ae el exudado periapical constituye una importante fuente de estudio de componentes moleculares provenientes de los tejidos periapicales<sup>(18)</sup>. Al estudiar el exudado periapical de dientes con PA a través de inmunowestern blot observamos nuevamente que CCL-7 está presente, como una banda única de 13 kDa, la que correspondería a uno de los muchos glicotipos esperables de observar en humanos<sup>(17)</sup>. Nuestros resultados muestran que en el caso de PAs la expresión de CCL-7 es mayor que en PAa, sin embargo la diferencia no es significativa. Esta leve diferencia podría deberse

a que en general la presencia de sintomatología está asociada a una respuesta más exudativa, lo que se traduce en una mayor concentración de proteínas de la muestra, y con ello, mayor cantidad de mediadores presente.

En resumen nuestros resultados demuestran la presencia de CCL-7 en PA independientemente de la muestra estudiada, y a su vez la presencia, observada en biopsias de LP Ae, de CCR-5. Estos hallazgos en conjunto con la presencia, descrita en la literatura, para los demás receptores de CCL-7 implican la posible participación de esta quimioquina en el desarrollo de las LP Ae, posiblemente a través de la estimulación de la quimiotaxis, fenómeno fundamental en el desarrollo de estas lesiones.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a Leslie Henríquez, Técnico del Laboratorio de Biología Periodontal, por su valioso aporte y dedicación al trabajo de laboratorio que hicieron posible el desarrollo de la presente investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15: 348-381.
- Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, y cols. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis*. 2006;12(3):283-9.
- Ataoglu T, Ungör M, Serpek B y cols. Interleukin-1 beta and tumour necrosis factor alpha levels in periapical exudates. *International Endodontic Journal*. 2002. 35: 181 – 185.
- Takeichi O. et al. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon- $\gamma$ -producing cells in human radicular cysts. *Int Endodon J* 1999, 32: 124 – 130.
- de Sá AR, Pimenta FJ, Dutra WO, Gomez RS. Immunolocalization of interleukin 4, interleukin 6, and lymphotoxin  $\beta$  in dental granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 356 – 60.
- Radics T, Kiss C, Tar I, Marton J. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18: 9–13.
- Coli M, Vasilijilj S, Gazivoda D y cols. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci*. 2007; 115: 315-20.
- Sabeti M, Simon J, Kermani V, y cols. Detection of receptor activator of NF-kappa beta ligand in apical periodontitis. *J Endod*. 2005; 31: 17-8.
- Marton J, Rot A, Schwarzwinger E y cols. Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human periapical chronic granuloma. *Oral Microbiology Immunology* 2000; 15: 63 – 65.
- Takayama S, Miki Y, Shimauchi H, Okada H. Relationship between prostaglandin E2 concentrations in periapical exudates from root canals and clinical findings of periapical periodontitis. *J Endod*. 1996; 22: 677-80.
- Shimauchi H, Takayama S, Narikawa-Kiji M y cols. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human dental periapical lesions. *Journal of Endodontics* 2001; 12: 749 – 752.
- Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod*. 2002; 28: 313-5.
- Wahlgren, Salo T, Teronen O, y cols. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulp and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J* 2002; 35:897-904.
- Leonardi R, Caltabiano R, Loreto C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2005; 38: 297-301.
- Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 1–8.
- Zlotnik A, Yoshie O y Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor super-families and their molecular evolution. *Genome Biology*. 2006; 7: 243.
- Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Monocyte chemoattractant protein-3. *European Cytokine Network*. 2001; 12: 554-560.
- Shimauchi H, Miki Y, Takayama S, y cols. Development of a quantitative sampling method for periapical exudates from human root canals. *J Endod*. 1996. 22 (11): 612 – 615.
- Tillie-Leblond I, Hammad H, Desurmont S, y cols. CC chemokines and interleukin-5 in bronchial lavage fluid from patients with status asthmaticus. Potential implications in eosinophil recruitment. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 586-592.
- Kunkel S, Lukacs N, Kasama T, Strieter R. The role of chemokines in inflammatory joint disease. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 6-12.
- McManus C, Berman J, Brett F y cols. MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol*. 1998; 86: 20-9.
- Wedemeyer J, Lorentz A, Göke M y cols. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa. *Gut* 1999; 44: 629-635.
- Uguccioni M, Gionchetti P, Robbiani D, y cols. Increased Expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in Ulcerative Colitis. *American Journal of Pathology*. 1999; 155: 331-336.
- Silva TA, Garlet GP, Lara VS y cols. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20: 310-6.
- Kabashima H, Yoneda M, Nagata K y cols. The presence of chemokine receptor (CCR5, CXCR3, CCR3)-positive cells and chemokine (MCP1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10)-positive cells in human periapical granulomas. *Cytokine*. 2001; 16: 62-6.
- Polentarutti N, Introna M, Sozzani S y cols. Expression of monocyte chemoattractant protein-3 in human monocytes and endothelial cells. *Eur Cytokine Netw*. 1997; 8: 271-4.

## CORRESPONDENCIA AUTOR

**Andrea Dezerega Piwonka.**

**Laboratorio de Biología Periodontal, Departamento de Odontología**

**Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.**

**Sergio Livingstone 943 - Comuna de Independencia**

**Santiago - Chile.**

**Fono: 56 2 978 18 33**

**Fax: 56 2 978 18 39**

**adezerega@gmail.com**

**Trabajo recibido el 21/07/2009.**

**Aprobado para su publicación el 16/08/2009.**