



Expresiones del CD44 en tejidos periapicales inflamados

Martha Siragusa
Mabel D' Arrigo
Gustavo Dietrich
Gabriela Pisterna

✉: msiragus@arnet.com.ar

Recibido: Noviembre 2011– Aceptado: Febrero 2012

Facultad de Odontología
Universidad Nacional de Rosario

Introducción

La periodontitis apical, es un proceso inflamatorio de los tejidos periapicales, originados por causa bacteriana. Estos temas han sido muy bien estudiados por Fair⁽¹⁾⁽²⁾. Concluye que esos procesos son consecuencia de la muerte pulpar bacteriana ocasionada por caries. Como consecuencia de esa invasión hacia la zona periapical, se reducen las posibilidades antigénicas de erradicar los antígenos, formándose retejidos de granulación abscesos o quistes.⁽³⁾

El granuloma periapical es una reacción inflamatoria crónica causada por una infección polimicrobiana. Se ha tipificado la magnitud del daño que involucra a los tejidos de soporte incluyendo al hueso alveolar, con zonas de reabsorciones. Ese tejido granulomatoso por numerosas células de defensa que incluyen a macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y leucocitos polimorfonucleares⁽⁴⁾ La migración de las células inflamatorias, expresadas por la presencia de citoquinas⁽⁵⁾⁽⁶⁾ y factores de crecimientos, aumentan la respuesta inflamatoria y juegan un rol importante en el desarrollo de la lesión periapical. Principalmente activando la convocatoria de macrófagos y linfocitos que se cree son los responsables de iniciar la inflamación y la posterior pérdida ósea⁽⁷⁾.

La circulación de los linfocitos y su localización en la zona dañada, es el resultado de la interacción en las paredes vasculares entre las células endoteliales y las moléculas de adhesión. Recientemente una novedosa y nueva interacción entre los linfocitos y el CD44 y su principal ligando del Acido hialurónico, ha sido descripta. Ha sido pensado que esta interacción es responsable de la extravasación linfocitaria hacia la zona de respuesta. El CD44 es un ligando hialuronato carbohidrato que haría rodar a los linfocitos hacia las células endoteliales. Esta adhesión patológica es utilizada para activar la extravasación de las células T desde el torrente sanguíneo hacia el sitio de la inflamación. El Hialuronato es (AH) es un glucosaminoglucano encontrado en la matrix extracelular y se involucra en numerosos procesos biológicos. El AH expresa sus funciones en la señalización sobre la superficie de las células y su receptor CD44.

A pesar de que este mecanismo todavía no está bien analizado, el mecanismo de señalización AH –CD44, el AH ha modulado los mecanismos de adhesión celular, la movilidad, la proliferación y diferenciación celular que pueden ocurrir en etapas de salud, formación tumoral y metástasis, inflamación y en remodelación tisular.⁽⁸⁾

Estudio previos han demostrado niveles de CD44 en tejido pulpar sano e inflamado, comparándolo tejido sano con procesos inflamatorios cerrados y abiertos.⁽⁹⁾

El objetivo de este trabajo fue comparar los niveles de CD44 en tejidos periapicales inflamados comparados con tejidos pulpares sano y enfermos.

Materiales y Métodos

La obtención de muestras de tejidos granulomatosos periapicales fueron recolectados del Servicio de Cirugía de la Facultad de Odontología de Rosario, previo consentimiento firmado. La edad de los pacientes osciló entre 18 y 45 años, no se tuvo en cuenta el sexo. Se seleccionaron piezas dentarias con ápices completamente desarrollados. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con enfermedades sistémicas que pudiesen interferir en el proceso de reparación. El tejido granulomatoso fueron removidos con un bisturí Nº 16. Todas las muestras fueron almacenadas en solución fisiológica colocadas en un tubo Eppendorf y frías a -32 °C hasta el momento de su uso y fueron empleadas para investigar los niveles de solubilidad del receptor hialuronato CD44.

En las reacciones de aglutinación, la estimación de especificidad y de título anticuerpo se realizó en base a la competencia entre antígeno particulados y solubles por los sitio de combinación. Se combina primero el ligando con el receptor soluble, inhibiendo luego la adhesión (aglutinación) indirecta de células indicadoras.

Se usaron como reactivos Bromelina (Sigma.B22.52; Sigma, St Louis, MO), buffer fosfato salino (PBS), hialuronato (Sigma-Aldrich H 1876; ácido hialurónico como sales de sodio provenientes del cordón umbilical, y anti-D (laboratorios Wiener). El tejido periapical fue lisado. En una primera etapa el material liado en diluciones geométrica de (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, y 1:512) y fueron incubados durante 12hs a 4 °C. Posteriormente se midió la actividad del hialuronato no neutralizado a través de su acción adherente sobre el sistema revelador

Indicadores celulares.

Para prevenir interferencias en la lectura, se trabajó con eritrocitos del mismo grupo sanguíneo (ABO)- compatible con el mismo factor Rh de cada paciente. Las muestras usadas fueron bromelizadas con un volumen y medio de bromelia a una concentración de 5mg/ml a un volumen de glóbulos rojos incubados durante 15 minutos a 37 °C. Luego los glóbulos rojos fueron lavados 3 veces en PBS y se suspendieron al 2% del mismo medio e incubados en un refrigerador durante 24hs.

Después de 24 h, los resultados leídos fueron recolectados en Tabla 1.

Los resultados fueron registrados según la siguiente escala: ⁽¹⁰⁾

Score 10	+++	1 a 3 aglutinados grandes
Score 8	++	3 a 10 aglutinados
Score 5	+	más de 10 aglutinados
Score 2	±	trazas
Score 0	-	sin aglutinación

Los datos se procesaron estadísticamente con el test de contrastes múltiple de Kruskall-Wallis.

Discusión

Como respuesta a la irritación bacteriana proveniente del sistema de conductos radiculares, los tejidos periapicales desarrollan un tejido de granulación. Estudios recientes han indicado que los macrófagos podrían tener un rol importante en el desarrollo de la lesión. Los macrófagos asociados a expresiones de células anógenas comprenden las células inmunes prevalentes. ^{(11) (12) (13) (14)}

El Hialuronato es el mayor glucosaminoglicano en el ligamento periodontal, comprende repetidas cadenas de D- ácido glucorónico y N- acetyl -D-glucosamina. Juega un rol importante en la migración, diferenciación y adhesión celular mediante varios ligandos del hialuronato y proteínas receptoras de la superficie celular como el CD44. ^{(15) (16)}

Varias funciones de partículas de hialuronato de bajo peso molecular se encontraron asociadas a la inflamación ha sido demostrado. ⁽¹⁷⁾ Sin embargo estas moléculas también inducen a la síntesis del óxido nítrico de macrófagos en murinos que están asociados a la destrucción del tejido conectivo. ⁽¹⁸⁾

28 muestras biológicas de tejido de granulación periapical producido por la muerte pulpar de dientes extraídos fueron analizadas y se establecieron los niveles de CD44.

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante el test estadístico y se encontraron diferencias significativas entre los grupo periapicales comparados con el grupo de pulpas inflamadas. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Tasman, ⁽¹⁹⁾ quien observó altos niveles de expresión de CD44 tanto en las paredes de los vasos sanguíneos como en el tejido conectivo, participando especialmente en la convocatoria de los elementos mononucleares y de los linfocitos. A pesar de haberse observado los grados de sensibilidad del CD44 y su participación en los procesos inflamatorios, mayores investigaciones deben realizarse.

Resultados

Muestras de tejido periapical fueron analizadas para determinar la presencia de CD44. Usado como marcador específico. Los resultados fueron expresados como un parámetro de sensibilidad (α) ⁽¹¹⁾. Rodamiento fue registrado según el score (E), quien mide el grado de adhesión de las células rojas, combinados con la dilución del suero (D), determinantes de la sensibilidad del parámetro y definidas por una expresión matemática:

$$\alpha = \frac{\sum E_i}{D_i} \times 10^{-3}$$

Estos valores fueron independientemente calculados por cada período de incubación, con dos parámetros constantes: título y score.

La utilización del parámetro de sensibilidad, posibilitó cuantificar con mayor precisión el aumento de sensibilidad de una técnica con relación a otra técnica menos perfeccionada. Los valores del parámetro de sensibilidad de cada grupo fueron recolectados en Tabla 1.

N°	Identificación		Dilución Geométrica									Parámetros de Sensibilidad α s
	Procesos	Grupo Sanguíneo	P	2	4	8	16	32	64	128	256	
115	Apical	O+	-	±	±	+	+	-	±	±	±	0,0024921
112	Apical	O+	++	+	±	±	+	+	+	±	±	0,0118203
116	Apical	O+	+++	++	+	+	++	+	±	±	±	0,0165859
111	Apical	A+	++	++	±	+	±	±	-	-	-	0,0133125
120	Apical	O+	+++	+++	±	±	+	±	±	±	-	0,0161718
B	Apical	A+	-	++	±	-	±	-	-	-	-	0,04625
C	Apical	O+	-	++	+	+	+	±	±	±	±	0,0063046
A	Apical	O+	++	+	±	±	±	-	-	-	-	0,011375
121	Apical	O+	+++	++	±	±	±	-	±	±	-	0,0149218
151	Apical	O+	-	+++	+++	+++	+++	++	+	+	±	0,00975
152	Apical	O+	+++	++	++	+	+	±	±	±	±	0,0170546
M	Apical	A+	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++	0,0196562
160	Apical	A+	+++	++	++	+	+	+	±	±	±	0,0171484
161	Apical	O+	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	++	0,0190937
162	Apical	A-	+++	+++	+++	+++	++	+	+	±	±	0,0195078
163	Apical	O+	+++	+++	++	+	++	+	±	±	±	0,0183359
F	Apical	A+	++	++	+	+	+	+	±	±	±	0,0144609
D	Apical	A+	+++	++	+++	++	+	+	+	±	±	0,0180703
156	Apical	O+	++	+++	++	+	-	±	-	++	+	0,015832
157	Apical	O+	+	++	±	±	+	+	-	-	-	0,0102187
154	Apical	O+	+	++	±	±	±	-	±	+	-	0,0099453

Tabla 1

Se consideró el grupo de procesos periapicales (n=21) y se los comparó con: pulpas sanas(n=10); con procesos pulpares inflamatorios abiertos asintomáticos (n=36); procesos pulpares inflamatorios cerrados sintomáticos(n=28) realizados previamente.

Procesos	Apical	Sano	Sintomático Cerrado	Asintomático Abierto
Promedio	0,0136516	0,0037093	0,0125013	0,0196367
Mediano	0,0149218	0,00275	0,008	0,00935935
Desvío estándar	0,00498304	0,00197565	0,0212762	0,0346873
Rango intercuartil	0,0069297	0,004	0,0067852	0,0078515

Tabla 2

Después de la aplicación del test estadístico Kruskal-Wallis, las conclusiones indicaron diferencias significativas entre los grupos ($p=0,001$)

Los valores del parámetro de sensibilidad para cada uno de los grupos se muestran en la tabla Nº 2 y se observan las principales medidas descriptivas del conjunto de datos.

Debido a la falta de cumplimiento de los supuestos de normalidad e igualdad de variancias, la comparación fue efectuada mediante la técnica de Kruskal-Wallis. Se concluyen que existen diferencias significativas entre los valores del parámetro de sensibilidad de los grupos considerados ($p<0,0001$). Luego de aplicada la técnica de comparaciones múltiples del Kruskal-Wallis se concluye:

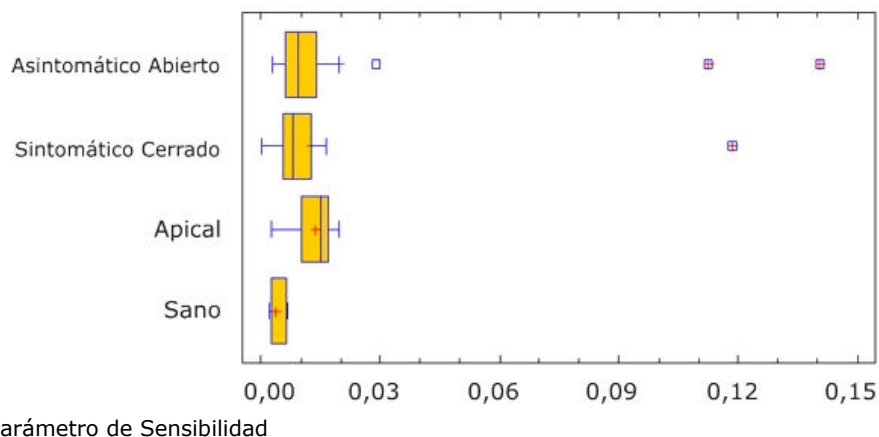
Procesos	N =	Promedio	Distribución homogénea
Apical	21	66,90	*
Sano	10	15,10	*
Sintomático Cerrado	28	43,68	*
Asintomático Abierto	36	49,47	* *

Tabla 3

Donde la mediana del parámetro de sensibilidad del grupo procesos periapicales es significativamente mayor que la correspondiente a los sanos y al grupo de procesos cerrados sintomáticos y esta a su vez es significativamente mayor que el grupo sano.

El grupo de los procesos abiertos asintomáticos ocupa una posición ambigua entre el cerrado y el periapical ($p=0,005$)

Los valores del parámetro de sensibilidad para cada uno de los grupos se muestran en el siguiente gráfico:



Referencias

1. Nair PNR (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the cause of endodontic failures. *Critical Review of Oral Biology and Medicine* 15, 348–81.
2. Nair PNR (2006) On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International Endodontic Journal* 39,249–81.
3. Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE (1997) Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 81, 93–10.
4. Simon JHS (1994) Periapical pathology. In: Cohen S, Burns RC, eds. *Pathways of the Pulp*, 6th edn. Baltimore, USA: Mosby, pp. 337–62-
5. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P (1995) Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiology and Immunology* 10, 213–9.
6. Takeichi O, Saito I, Okamoto Y, Tsurumachi T, Saito T (1998) Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology* 93, 275–80.
7. Nair PNR (2004). Pathogenesis of apical periodontitis and the cause of endodontic failures. *Critical Review of Oral Biology and Medicine* 15, 348–81.
8. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J* 1992;6: 2397–404.
9. Pisterna GV, Siragusa M. CD44 Presence in Inflamed Pulp Tissue. *J Endodon.* Volume 33, Number 10, 1203:1207. October 2007.
10. Goudemand, M ; Marsalet, I.D. *Elements d'immuno-hématologie*, Ed. Med. Flammarion, 1967 ;1a ed. París-
11. Akamine, A., Hashiguchi, I., Toriya, Y., Maeda, K., 1994. Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Endodon. Dental Traumatol.* 10, 121–128.
12. Okiji, T., Kawashima, N., Kosaka, T., Kobayashi, C., Suda, H., 1994. Distribution of Ia antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. *J. Endodon.* 20, 27–31.
13. Kawashima, N., Okiji, T., Kosaka, T., Suda, H., 1996. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J. Endodon.*22, 311–316.
14. Suzuki, N., Okiji, T., Suda, H., 1999. Enhanced expression of activation-associated molecules on macrophages of heterogeneous populations in expanding periapical lesions in rat molars. *Arch. Oral Biol.* 44, 67–79.
15. Kimata, K., Honma, Y., Okayama, M., Oguri, K., Hozumi, M., Suzuki, S., 1983. Increased synthesis of hyaluronic acid by mouse mammary carcinoma cell variants with high metastatic potential. *Cancer Res.* 43, 1347–1354. -
16. Knudson, C.B., Knudson, W., 1993. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.* 7, 1233–1241.
17. Oertli, B., Beck-Schimmer, B., Fan, X., Wuthrich, R.P., 1998. Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1. *J. Immun.* 161, 3431–3437.
18. McKee, C.M., Lowenstein, C.J., Horton, M.R., et al., 1997. Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 272, 8013–8018.
19. Tasman F, et al. Endothelial Cell and Stromal Antigens in Human Periapical Granulation Tissue. *J Endodon* 2000. Vol 26, N°2, .81-84