Trabajo de investigación

Expresión de Factor Estimulante de Colonias-1 (CSF-1) y Catepsina-K en Lesiones Periapicales

Expression of Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1) and Cathepsin-K in Periapical Lesions

Osorio C[1,4], Hernández M[3,4], Mundi V[1,4], Garrido M[2,4], Franco ME[3], Dezerega A[2,4]

RESUMEN

La lesión periapical (LPA) es una patología inmunoinflamatoria de origen infeccioso, caracterizada por la destrucción del tejido periapical, y está asociada a la expresión de diversos mediadores inflamatorios. El Factor Estimulante de Colonias -1 (CSF-1) promueve la diferenciación de células precursoras de osteoclastos, mientras que Catepsina K, participa en la reabsorción de matriz extracelular ósea; de modo que ambos podrían estar relacionados con la osteólisis característica de las LPAs. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue caracterizar la expresión de estos mediadores en quiste radicular inflamatorio (QRI), granuloma periapical (GP) y ligamento periodontal sano. **Materiales y Métodos:** Se seleccionaron 13 individuos con diagnóstico clínico de Periodontitis apical crónica (PAC) e indicación de extracción. Luego de la exodoncia, las lesiones periapicales (LPAs) fueron biopsiadas y se realizó el diagnóstico anátomo-patológico. Se incluyeron también controles de ligamento periodontal sano de individuos con indicación de extracción de premolares por motivos ortodóncicos (n=7). Posteriormente se realizó tinción inmunohistoquímica para detectar la presencia de los mediadores en estudio, para finalmente examinar los cortes en un microscopio óptico. **Resultados:** La expresión de CSF-1 y Catepsina K se observó en forma similar en QRI y GP, localizándose fundamentalmente en células del infiltrado inflamatorio. También se observó en el revestimiento epitelial quístico y capsula de quistes y células endoteliales vasculares; mientras que no se detectó en ligamento periodontal sano. **Conclusiones:** CSF-1 y Catepsina K se expresan en LPAs y podrían participar en la génesis y/o progresión de la PAC.
Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehábil. Oral Vol. 2(3); 179-181, 2009.

Palabras clave: **Lesiones periapicales, periodontitis apical crónica, osteólisis, CSF-1, catepsina-K.**

ABSTRACT

Periapical Lesions (PLs) represent an immunoinflammatory disease of infectious origin, characterized by periapical tissue destruction. PLs are linked to the expression of various inflammatory mediators: Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1) that stimulates differentiation of osteoclast precursor cells and Cathepsin K, an enzyme associated with bone destruction, could be related to osteolysis during PL. The aim of this study was to characterize the expression of these mediators in inflammatory radicular cyst, periapical granuloma and healthy periodontal tissue. **Materials and Methods:** We selected 13 individuals with clinical diagnosis of Apical Periodontitis (AP) and indication of extraction. Healthy subjects having indication of extraction for orthodontic reasons were also included. After extraction, specimens were biopsied and histological diagnosis was made. Subsequently, immunohistochemical staining was carried out to identify the mediators in study, and finally the samples were examined in a light microscope. **Results:** CSF-1 and Cathepsin K expression was distributed similarly in apical granulomas and radicular cysts. They were mainly immunolocalized to inflammatory infiltrates. Also lining epithelium, cyst capsule, and vascular endothelium were mildly immunopositive. No immunoreactivity was observed in healthy periodontium. **Conclusions:** CSF-1 and Cathepsin K are expressed in PLs and may participate in the pathogenesis of AP.
Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehábil. Oral Vol. 2(3); 179-181, 2009.

Key words: **Periapical lesions, apical periodontitis, osteolysis, CSF-1, cathepsin-K.**

INTRODUCCIÓN

La Periodontitis Apical Crónica (PAC), patología altamente prevalente a nivel mundial, se caracteriza por la destrucción de los tejidos periapicales del diente[1], proceso que se manifiesta radiográficamente como radiolucidez apical[2]. Su consecuencia final puede ser la pérdida del diente[3,4]. Esta patología se inicia como una inflamación del ligamento periodontal apical y del tejido óseo circundante, que progresa cuando la carga bacteriana sobrepasa la capacidad defensiva del huésped[3,5], generándose reabsorción ósea y una respuesta proliferativa en base a tejido de granulación, dando origen a un granuloma periapical (GP). El GP, lesión formada fundamentalmente por tejido de granulación con grados variables de inflamación, puede dar lugar a la formación de una cavidad quística delimitada por epitelio, correspondiente al quiste radicular inflamatorio (QRI)[4,5]. Tanto el GP como QRI presentan un infiltrado inflamatorio perirradicular que contiene linfocitos T, B, plasmocitos, mastocitos, células Natural Killer (NK) y macrófagos, siendo éstos últimos fundamentales en el desarrollo y progresión de las LPAs[6]. La migración de células del linaje monocito-macrófago, del que derivan tanto macrófagos como osteoclastos, está determinada por quimioquinas de la familia CC, previamente descritas en LPAs[4,7].

Se ha asignado a los macrófagos un posible rol en la inmunidad innata y adquirida dentro de las LPAs ya que estas células fagocíticas, podrían reconocer los productos bacterianos por medio de receptores tipo Toll, liberando citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, prostaglandinas, radicales libres y enzimas que estimularían la destrucción de los tejidos apicales[8-10]. Algunos de estos productos están implicados en la destrucción directa de los tejidos conectivos y/o secreción de citoquinas, quimioquinas y factores del crecimiento[11,12]; tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1), que en conjunto con el ligando del receptor activador del factor nuclear NFκB (RANK-L) estimulan la diferenciación de osteoclastos a partir de sus precursores derivados del linaje monocito macrófago[8,9,13]. La síntesis de CSF-1 es estimulada por citoquinas, hormonas esteroidales y productos bacterianos[13] y se ha observado un aumento en su expresión en osteoporosis, así como su expresión a nivel oral se ha correlacionado con la osteoclastogénesis en la erupción dentaria[9,14]. A su vez, los osteoclastos, células encargadas de la remodelación ósea, remueven la matriz inorgánica del hueso exponiendo el componente colágeno que es degradado mediante enzimas como metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)[15,16] y Catepsina K. Esta última corresponde a una proteasa de cisteína expresada en osteoclastos diferenciados que degrada el colágeno tipo I del hueso y gelatina[16-18]

1. Cirujano Dentista, Programa de Magíster en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.
2. Profesor Asistente, Área de Endodoncia, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.
3. Profesor Asistente, Área de Patología, Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.
4. Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.
Este trabajo fue financiado por los proyectos DI I 07/02-2 y FONDECYT 1090461.

Correspondencia autor: *Constanza Osorio Alfaro. 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 / cotian@ug.uchile.cl.* *Trabajo recibido el 03/11/2009 / Aprobado para su publicación el 15/12/2009.*

y actualmente se está estudiando como posible blanco terapéutico en el tratamiento de la osteoartritis, osteoporosis y ateroesclerosis[19,20]. A nivel oral, se ha descrito que durante la osteoclastogénesis, las células estromales y los osteoblastos producen citoquinas como CSF-1 y RANKL[8], generando osteoclastos diferenciados. RANKL al interactuar con su receptor RANK activa una serie de cascadas celulares que estimulan la producción de Catepsina K en osteoclastos diferenciados para iniciar la remoción de matriz extracelular osea[19]. A pesar de su estrecha asociación con los procesos osteolíticos, ni CSF-1 ni Catepsina K se han descrito en LPAs.

Los procesos biológicos relacionados con la PAC no son del todo claros y los tratamientos existentes no se fundamentan en el carácter inmunoinflamatorio de la enfermedad. Debido a lo expuesto anteriormente, el objetivo de este estudio es caracterizar la expresión de CSF-1 y Catepsina K en LPAs de dientes con PAC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de sujetos de estudio: Se incluyeron pacientes asistentes a la clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile durante el año 2008. Se seleccionaron 12 pacientes con diagnóstico clínico de PAC e indicación de extracción del diente afectado y 7 sujetos con indicación de extracción ortodóntica de premolares sanos con formación radicular completa. El diagnóstico se realizó mediante anamnesis, examen clínico y examen radiológico y la información se consignó en una ficha clínica. Los pacientes fueron informados antes de ingresar al estudio, y se solicitó que firmaran un consentimiento informado previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (adscrito al proyecto DI 07/02-2).

El diagnóstico de PAC se efectuó en pacientes que presentaran dientes con caries profundas que no respondieran a los test de diagnóstico pulpar con respuesta normal o levemente aumentada a la percusión, presencia de destrucción ósea apical en relación al diente en cuestión, de diámetro > 5 mm observado en el examen radiográfico. Se excluyeron del estudio pacientes bajo tratamientos de antibioterapia, corticoides o antiinflamatorios en los últimos 3 meses o que presentaran enfermedades sistémicas o tratamientos que tuvieran relación con el proceso de reabsorción ósea.

2. Procesamiento de las muestras: Luego de realizar las exodoncias, las muestras fueron lavadas con suero fisiológico y fijadas en formalina tamponada al 10% a pH 7,4. Las muestras que contenían tejidos duros fueron descalcificadas en EDTA al 12,5%, mientras que los tejidos blandos se incluyeron directamente en parafina.

3. Diagnóstico Histopatológico: Las muestras incluidas en parafina fueron seccionadas y se realizó el diagnóstico anátomo-patológico mediante el uso de técnica de rutina y tinción Hematoxilina-Eosina (H-E). Posteriormente, para efectuar la caracterización de la expresión de los mediadores en estudio, se efectuaron tinciones inmunohistoquímicas.

4. Inmunohistoquímica: Tras la obtención de cortes de 6 µm, los especímenes fueron desparafinados, se bloquearon con peróxido de hidrógeno/metanol al 3% por 10 min., lavaron con tampón fosfato salino (PBS Hemagen® Diagnostics INC., Maryland USA.) y se realizó el desenmascaramiento de antígeno con Proteinasa K, según indicaciones del fabricante (Novocastra, Lab. Novo, Newcastle, UK). Este paso se omitió en las muestras sometidas a proceso de desmineralización. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con suero equino 2,5 % por 10 minutos (Kit ABC Universal, RTU Vectastain® Kit, Burlingame, CA.), se agregó el anticuerpo monoclonal anti-CSF-1 (ABR®, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) en dilución 1:50 y el anticuerpo monoclonal anti Catepsina K (Abcam®, Cambridge, UK), en dilución 1:200 en solución de suero equino al 2,5 %. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS, la reacción se visualizó mediante el kit ABC (Kit ABC Universal, RTU Vectastain® Kit, Burlingame, CA.) según instrucciones del fabricante, se reveló con DAB Kit (Peroxidasa Sustrate Kit DAB SK4100, Zymed Labs INC., San Francisco, USA) y se realizó la contratinción con hematoxilina. Finalmente las muestras se deshidrataron y se montaron con medio de montaje hidrofóbico (Flotex, Lerner Laboratories, Pittsburgh, PA, USA), para ser observadas en un microscopio óptico (Zeiss®, Axiostar Plus). Los controles negativos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento anterior, pero sin agregar el anticuerpo primario.

RESULTADOS

Las características de los sujetos en estudio se presentan en la Tabla 1. De las 20 muestras obtenidas, 7 pertenecían a sujetos controles, que no presentaban sintomatología pulpar o periapical en el diente y acudían por indicación de extracción ortodóncica. El diagnóstico clínico de estas muestras fue confirmado luego del estudio histopatológico. De las muestras de pacientes enfermos, 7 fueron diagnosticadas histopatológicamente como GP, 5 como QRI y una muestra fue excluida tras ser diagnosticada como ligamento periodontal inflamado.

Tabla 1. Cuadro resumen de características de los sujetos del estudio.

Diagnóstico	Edad (promedio +-DS)	Mujeres	n
QRI	52,6 +- 1,5	2	5
GP	48,5 +- 17,1	2	7
Ligamento sano	14,7 +- 3,09	6	7

Al realizar los ensayos inmunohistoquímicos se observó la expresión de CSF-1 tanto en QRI como GP, pero no en ligamento periodontal sano. En QRI, se observó una reacción positiva tenue en el revestimiento epitelial quístico, capsula y células endoteliales vasculares, mientras que el infiltrado inflamatorio y principalmente plasmocitos demostraron una marcada inmunopositividad. CSF-1 presentó una distribución similar en GP, con un marcado predominio en plasmocitos del infiltrado inflamatorio (Figura 1).

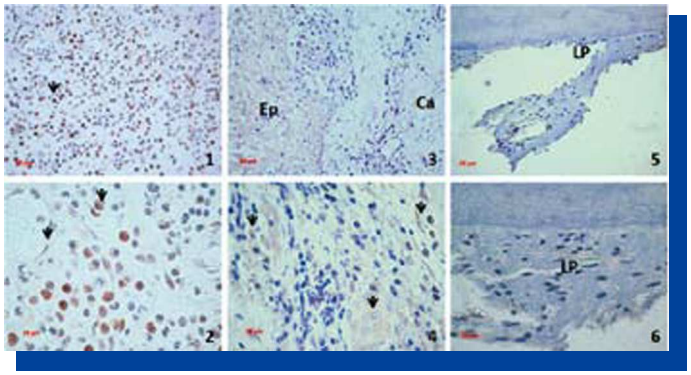

Figura 1. Expresión de CSF-1 en granuloma apical (1-2); quiste radicular (3-4) y ligamento periodontal sano (5-6). Las flechas indican células inmunoreactivas en infiltrado inflamatorio (1-2-3-4), endotelio vascular (2 y 4), revestimiento epitelial de quistes radiculares (3) y capsula (4).

Finalmente, con respecto a la expresión de Catepsina K, se observó inmunopositividad en QRI y GP, mientras que en ligamento periodontal sano no se detectó. En QRI, Catepsina K se localizó en el revestimiento epitelial quístico, células mesenquimales de la cápsula e infiltrado inflamatorio, fundamentalmente en plasmocitos; además, se encontró inmunoreactividad leve en células vasculares endoteliales; mientras que en GP, la expresión de Catepsina K se localizó fundamentalmente en el infiltrado inflamatorio, en forma similar a los QRI (Figura 2).

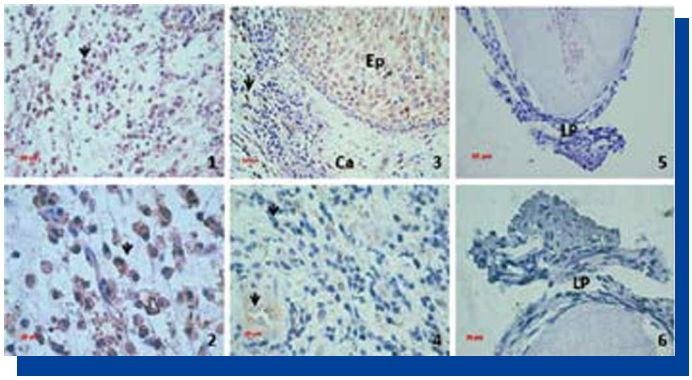

Figura 2. Expresión de Catepsina K en granuloma apical(1-2); quiste radicular (3-4) y ligamento periodontal sano (5-6). Flechas indican células inmunoreactivas en infiltrado inflamatorio (1-2-3-4), revestimiento epitelial de quistes radiculares (3), capsula, (3-4) y endotelio vascular (4).

DISCUSIÓN

La PAC es una patología infecciosa que combina aspectos de la respuesta defensiva, inflamatoria e inmune y que finalmente conduce a la destrucción de los tejidos perirradiculares[3,11,21]. Algunas de las células actualmente consideradas fundamentales en su patogenia son las células inflamatorias y osteoclastos[5,6]. El fenómeno característico de la PAC está representado por la osteólisis periapical donde CSF-1 y Catepsina K podrían coordinar los eventos biológicos asociados. Nuestros resultados describen por primera vez la presencia de estos mediadores en LPAs, sugiriendo que tanto CSF-1 como Catepsina K podrían asociarse con la formación y/o progresión de quistes y granulomas periapicales.

La expresión de CSF-1 se identificó exclusivamente en LPAs, asociada a epitelio, endotelio, células mesenquimales y células inflamatorias, predominantemente plasmocitos. Estos resultados están en línea con estudios previos en patologías como artritis y osteoporosis post menopáusica[22,23]. Esto sugiere que CSF-1 podría estar involucrado en la patogenia de las LPAs. A nivel pulpar, se ha estudiado su rol como regulador de procesos inflamatorios y se ha observado su expresión en reabsorción ósea asociada a la erupción de dientes temporales en humanos[14]. Este hallazgo se relaciona con otros estudios donde observaron que la presencia de CSF-1 aumentaba en conjunto con la actividad osteoclástica en erupción dentaria de roedores[9]. Ya que se ha descrito la presencia de RANKL en LPAs[8], y se ha observado la participación de CSF-1 en otras patologías y procesos que tienen en común la osteólisis, su expresión podría estar relacionada con la diferenciación osteoclástica necesaria para la destrucción asociada al desarrollo y progresión de QRIs y GPs.

Asimismo, observamos la expresión de Catepsina K en QRI y GP, mientras que no se observó su expresión en ligamento periodontal sano. De modo similar a CSF-1, Catepsina K se localizó en el revestimiento epitelial quístico, células mesenquimales de la capsula e infiltrado inflamatorio, fundamentalmente en plasmocitos, presentando una distribución similar en GPs y QRIs. Esto sugiere un posible rol de Catepsina K en la patogenia de las LPAs, presumiblemente en la degradación de la matriz orgánica del tejido óseo periapical. De modo similar, estudios previos han descrito la presencia de Catepsina K en superficies radiculares donde existe reabsorción en dientes de origen bovino[24], fenómeno que también se caracteriza por remodelación ósea. La presencia de Catepsina K se ha estudiado también en fluido crevicular gingival (FCG), en asociación con patologías como periodontitis[25] y periimplantitis[26]. Esta enzima está involucrada en la reabsorción ósea, ya que participa en la degradación de colágeno tipo I del hueso, correspondiente al 90% de la matriz ósea, así como de gelatina y osteopontina, entre otros componentes de la MEC(27,28). Consecuentemente, Catepsina K podría tener un rol fundamental en la expansión de LPAs de origen endodóntico.

En síntesis, la distribución de CSF-1 y Catepsina K fue relativamente similar en GP y QRI. La expresión de CSF-1 y Catepsina K en GPs sugiere que ambos podrían estar involucrados en la génesis de las LPAs; mientras que la expresión de estos mediadores en el epitelio quístico, infiltrado inflamatorio y cápsula de QRIs sugiere que podrían estar involucrados en el crecimiento de estas lesiones, e incluso en la progresión de GP a QRI. Por otro lado, si bien la literatura destaca la presencia de macrófagos como células fundamentales en la patogenia de las LPAs, en este estudio se observó una intensa expresión de los mediadores en estudio en plasmocitos, destacando la posibilidad de que estas células jueguen un rol importante en el proceso osteolítico de la PAC[29]. Por otro lado, la expresión de CSF-1 en el endotelio vascular de las LPAs apoya el posible rol quimiotáctico de éstos mediadores en el reclutamiento de monocitos/macrófagos perpetuando el proceso inflamatorio.

En síntesis, dado que CSF-1 permite el reclutamiento de monocitos y la diferenciación de células precursoras de osteoclastos y Catepsina K degrada la matriz ósea, la detección de estas moléculas en LPAs sugiere que podrían participar activamente en la formación y/o progresión de LPAs y particularmente en osteólisis apical; sin embargo se requiere un mayor estudio para determinar su rol y relevancia en esta patología.

Finalmente, CSF-1 y Catepsina K podrían ser utilizados como marcadores de progresión de LPAs, permitiendo que el estudio de la expresión de estas moléculas sea de ayuda en el diagnóstico de la PAC y en el monitoreo de las LPAs.

CONCLUSIÓN

CSF-1 y Catepsina K se expresan en LPAs y podrían participar en la génesis y/o progresión de la PAC.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Nicolas Dutzan por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jimenez-Pinzon A, Segura-Egea JJ, Poyato-Ferrera M, Velasco-Ortega E, Rios-Santos JV. Prevalence of apical periodontitis and frequency of root-filled teeth in an adult Spanish population. Int Endod J. 2004 Mar;37(3):167-73.
2. Hummonen S. OD. Radiological aspects of apical periodontitis. Endod Topics. 2002;1:3-25.
3. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 2000 Jun;15(3):139-50.
4. Ribeiro Sobrinho AP, de Melo Maltos SM, Farias LM, de Carvalho MA, Nicoli JR, de Uzeda M, et al. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. Oral Microbiol Immunol. 2002 Dec;17(6):344-53.
5. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W, Jr., Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. Oral Microbiol Immunol. 2005 Oct;20(5):310-6.
6. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. Endod Dent Traumatol. 2000 Feb;16(1):1-8.
7. Marton IJ, Rot A, Schwarzinger E, Szakall S, Radics T, Valyi-Nagy I, et al. Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. Oral Microbiol Immunol. 2000 Feb;15(1):63-5.
8. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, Leon R, Chandia S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. Oral Dis. 2006 May;12(3):283-9.
9. Heinrich J, Bsoul S, Barnes J, Woodruff K, Abboud S. CSF-1, RANKL and OPG regulate osteoclastogenesis during murine tooth eruption. Arch Oral Biol. 2005 Oct;50(10):897-908.
10. Ataoglu T, Ungor M, Serpek B, Haliloglu S, Ataoglu H, Ari H. Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. Int Endod J. 2002 Feb;35(2):181-5.
11. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(6):348-81.
12. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. Braz Dent J. 2007;18(4):267-80.
13. Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. Trends Cell Biol. 2004 Nov;14(11):628-38.
14. Yildirim S, Yapar M, Sermet U, Sener K, Kubar A. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 Jan;105(1):113-20.
15. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. J Endod. 2002 Apr;28(4):313-5.
16. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. J Periodontol. 2006 Nov;77(11):1863-70.
17. Strbac GD, Monov G, Cei S, Kandler B, Watzek G, Gruber R. Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: a pilot study. J Clin Periodontol. 2006 Apr;33(4):302-8.
18. Mogi M, Otogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. Arch Oral Biol. 2007 Sep;52(9):894-8.
19. Zhao Q, Jia Y, Xiao Y. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Mar 20;380(4):721-3.
20. Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. FASEB J. 2007 Oct;21(12):3029-41.
21. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. J Dent Res. 2007 Apr;86(4):306-19.
22. Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. Arch Biochem Biophys. 2008 May 15;473(2):132-8.
23. Teitelbaum SL. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. Arthritis Res Ther. 2006;8(1):201.
24. Linsuwanont B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Localization of cathepsin K in bovine odontoclasts during deciduous tooth resorption. Calcif Tissue Int. 2002 Feb;70(2):127-33.
25. Wise GE, Yao S, Odgren PR, Pan F. CSF-1 regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. J Dent Res. 2005 Sep;84(9):837-41.
26. Ohshima M, Yamaguchi Y, Micke P, Abiko Y, Otsuka K. In vitro characterization of the cytokine profile of the epithelial cell rests of Malassez. J Periodontol. 2008 May;79(5):912-9.
27. Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. Mol Immunol. 2002 May;38(12-13):881-5.
28. Callewaere C, Banisadr G, Rostene W, Parsadaniantz SM. Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. J Mol Endocrinol. 2007 Mar;38(3):355-63.
29. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. J Dent Res. 2001 Jun;80(6):1545-9.