



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA Y
PATOLOGÍA
ÁREA DE ENDODONCIA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

PROTEÍNA C REACTIVA EN LESIONES APICALES DE ORIGEN ENDODÓNTICO

María José Bordagaray San Martín

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Mauricio Garrido Flores

TUTOR EXPERTO

Jocelyn García Sesnich

Financiado por:
FONDECYT 1120138
Santiago – Chile
2013

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Julio y Soledad, por inculcar en mí el espíritu de superación y por enseñarme a ser cada día mejor. A mi hermana Constanza, por ser mi soporte y cable a tierra. A Oscar, por tratarme como una hija, por su enorme apoyo y consejos. A mis abuelos Julio, Carmen y Raquel, por tener siempre una palabra de sabiduría. A todo su esfuerzo para verme finalmente convertida en una profesional.

A Iván, por acompañarme siempre y hacerme inmensamente feliz.

A mis amigos Fran, Rodri, Jose, Marlys, Nacho, Jo, Consu, Fabi, Andre, Isa, Loli, Álvaro por todos los momentos que compartimos y que seguiremos compartiendo.

A Dra. Marcela Hernández, Jocelyn, Pablo y, especialmente, a Dr. Garrido por haber siempre sido una fuente de enseñanzas para la vida y la profesión.

A todos los docentes, funcionarios y compañeros que compartieron conmigo durante mi carrera.

A todos ellos muchas gracias.

ÍNDICE

Contenido	Página
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	I
LISTA DE ABREVIACIONES.....	II
RESUMEN.....	III
MARCO TEÓRICO	
- Patología Periapical.....	1
- Periodontitis Apical Asintomática	2
- Respuesta inmuno-inflamatoria.....	5
- Proteína C Reactiva	6
- Proteína C Reactiva en Lesiones Endodónticas.....	8
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ANEXOS	
- Anexo 1: Consentimiento informado 18 años o más.....	30
- Anexo 2: Consentimiento informado menores de 18 años.....	33
- Ficha clínica	39

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características demográficas de población en estudio según estado.....	Página 15
Figura 1: CPT en muestras de LS y LPA.....	Página 16
Figura 2: Niveles de PCR en muestras de LS y LPA.....	Página 17
Figura 3: Niveles de PCR estandarizadas por mg de proteínas totales en muestras de LS y LPA.	Página 18

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado
AAA	Absceso Apical Agudo
AAC	Absceso Apical Crónico
BCA	Ácido bisciconínico
BSA	Albúmina sérica de bovino
C1q	Factor C1q del complemento
CPT	Concentración de proteínas totales
FGC	Fluido Gingival Crevicular
GP	Granuloma Periapical
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
LB	Linfocito B
LPA	Lesión Periapical
LS	Ligamento Periodontal Sano
LT	Linfocito T
mgPCR	Concentración de PCR estandarizada por milígramo de CPT
Mø	Macrófago
NK	Células Natural Killer
OC	Osteitis Condensante
PA	Periodontitis Apical
PAA	Periodontitis Apical Asintomática
PAS	Periodontitis Apical Sintomática
PCR	Proteína C Reactiva
PMNs	Polimorfonuclear Neutrófilo
QRI	Quiste Radicular Inflamatorio
SCR	Sistema de Canales Radiculares
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α

RESUMEN

Introducción: La Periodontitis Apical Asintomática (PAA) se define como la inflamación y destrucción del periodonto apical de origen pulpar. Durante la patogénesis de la PAA son liberadas citoquinas, éstas a su vez podrían inducir la secreción de Proteína C Reactiva (PCR). PCR se ha asociado a eventos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios que serían capaces de participar en la patogénesis de la PAA y en potenciales respuestas sistémicas. Sin embargo, a la fecha, no se ha determinado la presencia de PCR en lesiones apicales (LPA) de dientes con PAA.

Objetivo: Comparar los niveles de PCR en LPA de dientes con PAA y en ligamento periodontal sano (LS).

Materiales y Métodos: Se incluyeron muestras de LS a partir de premolares con indicación de extracción por ortodoncia (n=39) y de LPA en dientes con diagnóstico clínico de PAA (n=43). Las muestras se homogeneizaron para determinar la concentración de proteínas totales (CPT) mediante método de ácido bisciconínico (BCA) y los niveles de PCR mediante plataforma MAGPIX®. Para la determinación de normalidad de la distribución de los datos se utilizó el test Shapiro Wilk. El análisis estadístico se realizó mediante test de Mann-Whitney con el programa Stata V.11.

Resultados: La CPT en homogeneizados de dientes con diagnóstico de PAA fue significativamente mayor que en muestras de LS. PCR se encontró presente en muestras de PAA y LS. Los niveles de PCR fueron significativamente mayores en homogeneizados de LPA de dientes con diagnóstico de PAA comparado con homogeneizados de LS.

Conclusiones: Los niveles de PCR se encuentran significativamente elevados en homogeneizados de LPA en asociación con la respuesta inflamatoria local, mientras que niveles basales se asociarían con la homeostasis del

periodonto apical. Esta proteína podría participar en el desarrollo de la LPA y dadas sus propiedades, podría inducir una potencial respuesta inflamatoria sistémica.

MARCO TEÓRICO

Patología Periapical

El tejido periapical normal es aquel que posee hueso alveolar intacto rodeando la raíz, espacio periodontal uniforme y respuesta normal a la percusión del diente (AAE, 2009). Este tejido sano puede sufrir alteraciones producto de agentes bacterianos que alcanzan la cámara pulpar y canales radiculares a través de cavidades en los tejidos duros (Aranda, 2012, Ren and Malmstrom, 2007, Skucaite et al., 2009).

Las bacterias son capaces de invadir el espacio pulpar con su sistema de canales radiculares (SCR) sólo cuando ocurre la necrosis séptica del tejido pulpar (Siqueira, 2002). A su vez, la enfermedad perirradicular ocurrirá luego de que los microorganismos, o sus productos metabólicos, tomen contacto con los tejidos que rodean al ápice (Siqueira, 2002). Cuando los agentes bacterianos y sus productos alcanzan el periápice se desarrolla un fenómeno inmuno-inflamatorio como mecanismo de defensa por parte del hospedero. La reacción que se produce adyacente al foramen apical mayor lleva el nombre de periodontitis apical (PA) (Peciuliene et al., 2008).

PA corresponde a un conjunto de enfermedades inflamatorias que comprometen a los tejidos perirradiculares; el ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar (Nair, 1997). Se subdivide según la Asociación Americana de Endodoncia en cinco entidades diferentes: periodontitis apical sintomática (PAS), periodontitis apical asintomática (PAA), absceso apical agudo (AAA), absceso apical crónico (AAC) y osteítis condensante (OC) (AAE, 2009).

La PAS corresponde a la inflamación del periodonto apical, asociada a un cuadro de sintomatología aguda que incluye una respuesta dolorosa a la percusión y palpación del diente (AAE, 2009). El parámetro de mayor asociación con el diagnóstico es el dolor en el momento en que los dientes antagonistas

contactan (Gutmann et al., 2009). En relación a la imagenología se ha determinado que esta entidad patológica puede o no estar asociada a un área radiolúcida periapical (AAE, 2009).

La PAA se define como la inflamación y destrucción del periodonto apical de origen pulpar (AAE, 2009). Se asocia clínicamente a un diente asintomático con pulpa necrótica y radiográficamente con la presencia de un área radiolúcida periapical de tamaño variable (Gutmann et al., 2009).

El AAA es una reacción inflamatoria a la infección pulpar y necrosis que se caracteriza por la aparición rápida de dolor espontáneo y a la presión del diente, y formación de pus en los tejidos periapicales (AAE, 2009). Se ha asociado también a un aumento de volumen localizado en el área mucogingival, el cual puede involucrar planos y espacios faciales (Gutmann et al., 2009).

El AAC corresponde a una reacción inflamatoria frente a la pulpa infectada y necrótica, que se caracteriza por un inicio gradual, con pocas o bien en ausencia de molestias y con descargas intermitentes de pus a través de un trayecto fistular (AAE, 2009). En este tipo de patología es frecuente la presencia de una radiolucidez peri o pararradicular (Gutmann et al., 2009).

La OC es una lesión radiopaca difusa que se localiza en el ápice de la raíz del diente (AAE, 2009). Corresponde a una respuesta proliferativa del hueso frente a un irritante crónico (Gutmann et al., 2009). En estos casos los dientes pueden o no ser sensibles a la percusión y/o palpación (Gutmann et al., 2009).

Periodontitis Apical Asintomática

La PAA se inicia con la necrosis pulpar y la infección del tejido periapical por microorganismos orales autógenos (Nair, 1997). Estos se desarrollan en el medioambiente endodóntico, el cual provee un hábitat selectivo donde predominan las bacterias anaerobias gram negativas (Nair, 1997). A medida que el proceso

infeccioso se desarrolla, las bacterias se organizan en forma de biofilms, comunidades embebidas en una matriz de exopolisacáridos que se adhieren a una superficie húmeda, en este caso el SCR de la raíz dentaria (Nair, 2006).

Las especies que se encuentran presentes a nivel apical del SCR pertenecen a los géneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptoestreptococci*, *Campylobacter*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Eubacterium* principalmente (Figdor and Sundqvist, 2007, Gomes et al., 2004, Nair, 2004, Siqueira, 2002). En dientes con PAA no tratada es posible encontrar generalmente una flora bacteriana mixta, con más de tres especies por canal (Gomes et al., 2004). La supervivencia y patogenicidad de los microorganismos a nivel periapical dependerá de una serie de factores como la liberación de lipopolisacáridos y otras modulinas bacterianas, la interacción entre especies, la habilidad para evadir la respuesta inmune y la síntesis enzimática (Nair, 2004, Somma et al., 2011).

Una vez establecidos en el periápice, las bacterias toman contacto con el ligamento periodontal a través del foramen principal y foraminas, lo que activa un fenómeno inmuno-inflamatorio (Garrido Flores et al., 2011), e induce daño a los tejidos periapicales de forma directa y/o indirecta (Siqueira Jr and Rôças, 2007). El daño directo del periodonto apical se genera mediante productos de origen bacteriano como enzimas, exotoxinas y metabolitos. Mientras que el daño indirecto se produce mediante la estimulación de células inflamatorias y no inflamatorias presentes en el periápice (Siqueira, 2002, Siqueira Jr and Rôças, 2007).

La participación de moléculas efectoras, anticuerpos, mediadores intercelulares y distintos tipos de células durante la respuesta inmuno-inflamatoria da como resultado la destrucción de los tejidos periapicales y la formación de una lesión periapical (LPA) (Marton and Kiss, 2000, Siqueira Jr and Rôças, 2007). Este mecanismo actúa como defensa local, pero al mismo tiempo perpetúa la inflamación en el periápice (Ingle et al., 2008).

Desde el punto de vista anatómico patológico existen distintos tipos de LPA, lo cual está determinado por el balance entre los agentes microbianos y los mecanismos de defensa del hospedero (Carrillo García et al., 2007). Estas lesiones, observadas radiográficamente como un área radiolúcida alrededor del ápice, pueden corresponder a un granuloma periapical (GP) o a un quiste radicular inflamatorio (QRI). La determinación del diagnóstico definitivo se lleva a cabo mediante histopatología (Carrillo García et al., 2007, de Paula-Silva et al., 2009)

El GP corresponde a un tejido de granulación compuesto por elementos celulares de inflamación aguda como lo son los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) (Marton and Kiss, 2000, Nair, 1997), y de inflamación crónica donde es posible identificar macrófagos (Mø), linfocitos T (LT) y B (LB), así como también células plasmáticas (Carrillo García et al., 2007). Además es común encontrar nidos de epitelio provenientes de los restos de Malassez, con capacidad latente de multiplicación (Carrillo García et al., 2007). Un GP puede o no progresar a QRI (Huunonen and Ørstavik, 2002).

El QRI se produce como resultado directo del proceso inmuno-inflamatorio, mediante el cual los restos epiteliales de Malassez son estimulados, produciendo la proliferación y formación de una cavidad patológica delimitada por epitelio. El QRI es una lesión crónica, con una cavidad cerrada rodeada completamente por epitelio escamoso estratificado no queratinizado (Carrillo García et al., 2007, Marton and Kiss, 2000). La cápsula de tejido conectivo fibroso subyacente presenta distintos grados de infiltración celular. Este infiltrado está constituido principalmente por células mononucleares (Carrillo García et al., 2007, Huunonen and Ørstavik, 2002)

La mantención de un balance entre los mecanismos de defensa y los agentes exógenos, genera un proceso simultáneo de destrucción-reparación. De esta forma la LPA puede mantenerse libre de sintomatología de forma indefinida (Ingle et al., 2008, Marton and Kiss, 2000).

Respuesta inmuno-inflamatoria

El sistema inmune representa un complejo conjunto de órganos, tejidos, células y mediadores moleculares que actúan sincrónicamente para asegurar la mantención de la salud y defender en contra de enfermedades (Ingle et al., 2008). Los componentes de este sistema involucran elementos de la respuesta innata y adquirida (Graunaite et al., 2011).

La respuesta innata comprende los mecanismos inespecíficos compuestos por barreras mecánicas, físicas, químicas y biológicas (Barbieri Petrelli et al., 2005). Son partícipes de ésta elementos celulares, como los PMNs, Mø y células Natural Killer (NK), así como elementos moleculares (Barbieri Petrelli et al., 2005). Este tipo de respuesta actúa de forma inmediata, no requiere exposición previa al antígeno, ni se modifica con la exposición a éste (Palomo et al., 2009).

Por su parte, la respuesta inmune adquirida constituye un mecanismo de mayor complejidad que se desarrolla ante la exposición del organismo a un antígeno. Está compuesta principalmente por LT, LB y por anticuerpos, productos de este último tipo celular (Barbieri Petrelli et al., 2005).

La respuesta inmuno-inflamatoria a nivel periapical se inicia con una fase aguda de dilatación vascular, lo que produce la migración de elementos celulares al foco inflamatorio (Mø, PMNs y células plasmáticas principalmente), y la extravasación de plasma (Carrillo García et al., 2007).

En contacto con los agentes bacterianos las células presentes alrededor del periápice se activan, desencadenando la liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas, leucotrienos y factores de crecimiento (Nair, 2004). Entre estos es posible encontrar interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), prostaglandinas y leucotrienos (Buttke et al., 2005, Marton and Kiss, 2000). Estos mediadores por un lado, producen la reabsorción del tejido óseo alrededor de la raíz (Radics et al., 2003), la cual se hace evidente en los

exámenes radiográficos de pacientes con PAA (Ingle et al., 2008), y son capaces de viajar a zonas remotas a través del flujo sanguíneo y desencadenar una respuesta de fase aguda (Buttke et al., 2005).

La respuesta de fase aguda es un mecanismo mediante el cual se busca la restauración de la homeostasis (Moshage, 1997). Comprende una serie de características sistémicas como fiebre, neutrofilia, cambios en el metabolismo lipídico, activación del complemento, cambios hormonales e inducción de proteínas de fase aguda ante procesos infecciosos, inflamatorios o neoplásicos (Marton and Kiss, 2000, Moshage, 1997). Algunas de estas proteínas de fase aguda han sido detectadas de forma elevada en los niveles séricos en pacientes con LPA (Marton and Kiss, 2000).

De esta forma el sistema inmune del hospedero mantiene una defensa activa a nivel local y sistémico en contra de los microorganismos que actúan como una fuente persistente de agresión a los tejidos periapicales (Buttke et al., 2005, Siqueira Jr and Rôças, 2007). Sin embargo, en PAA el organismo es incapaz de erradicar completamente los patógenos debido a la inaccesibilidad del sistema de defensa del huésped al SCR (Siqueira Jr and Rôças, 2007), lo que deriva en una segunda fase crónica que transcurre con la proliferación local y/o activación de nuevas poblaciones celulares, vasos y componentes de la matriz extracelular en un esfuerzo por lograr reparación de la lesión (Gutmann et al., 2009).

Proteína C Reactiva

La Proteína C Reactiva (PCR) corresponde a una proteína de fase aguda dependiente de calcio perteneciente a la familia de las pentraxinas (Amezcu-Guerra L, 2007, Pepys and Hirschfield, 2003). Es una molécula compuesta por 206 aminoácidos, dispuestos en cinco unidades globulares idénticas unidas no covalentemente. Cada una de las subunidades tiene un peso aproximado de 23 kD, y se ubica espacialmente formando un ciclo pentamérico simétrico (Eisenhardt et al., 2009).

La PCR es sintetizada en los hepatocitos bajo el control transcripcional principal de IL-6, y secundariamente de IL-1 y TNF- α (Pepys and Hirschfield, 2003). También se ha reportado su síntesis extra hepática en células vasculares (Pepys and Hirschfield, 2003). La inducción de su producción dependerá de la concentración de estos mediadores que llegan al hígado, por lo tanto valores normales séricos de PCR no significan necesariamente ausencia de procesos inflamatorios (Amezcu-Guerra L, 2007).

La PCR es producida inicialmente en forma de monómero. Su ensamblaje pentamérico ocurre en el retículo endoplasmático de hepatocitos (Du Clos and Mold, 2004). La regulación de su secreción está determinada por dos estados. En el estado de reposo PCR se encuentra retenida en el retículo endoplásmico de los hepatocitos unido a carboxiesterasas. En el estado de estimulación la unión del complejo PCR-carboxiesterasa disminuye, lo que aumenta el tránsito de PCR (Du Clos and Mold, 2004).

Al ser liberada desde la célula de origen, PCR es depositada en sitios de inflamación aguda donde expresa su rol biológico (Du Clos and Mold, 2004). La función primaria de la PCR humana es la unión de alta afinidad a ligandos macromoleculares, principalmente a fosfocolina (Du Clos and Mold, 2004, Marnell et al., 2005). Esta unión es reconocida por el factor C1q del complemento (C1q), lo que provoca la activación de la vía clásica (Pepys and Hirschfield, 2003). Además es capaz de proveer sitios de unión secundarios para unión del Factor H activando la vía alterna (Pepys and Hirschfield, 2003). A pesar de esta activación por ambas vías, PCR evita la formación del componente terminal de la vía del complemento, limitando la lisis celular (Amezcu-Guerra L, 2007). Otras funciones de la PCR son favorecer la adhesión a células endoteliales aumentando la expresión de moléculas como I-CAM y V-CAM y aumentar la capacidad fagocítica de M ϕ , elementos celulares protagonistas en LPA (Domínguez-Amorocho and Patiño-Cuervo, 2008, Metzger, 2000). También se le han asociado funciones antiinflamatorias como la inhibición de la síntesis de radicales libres por los neutrófilos (Premoli et al., 2013).

Por sus características, PCR es actualmente utilizada como marcador asociado a estado nutricional, morbi-mortalidad de pacientes con enfermedad renal crónica, artritis reumatoide, preeclampsia, efectos adversos durante el embarazo y enfermedad cardiovascular, entre otras (Ardila CM, 2010). Del mismo modo se ha determinado un impacto en el incremento de los niveles séricos de PCR en pacientes con enfermedades propias de la cavidad oral (Ardila CM, 2010, Ren and Malmstrom, 2007) y un aumento local de PCR en los tejidos asociados a éstas (Proctor et al., 1991).

Proteína C Reactiva en lesiones endodónticas

Se ha detectado PCR en biopsias de tejido periodontal en individuos con periodontitis marginal (Lu and Jin, 2010), por lo que se ha postulado que esta molécula podría jugar un rol importante en la homeostasis de este tejido. También se ha encontrado esta proteína sobreexpresada en dientes con pulpitis en comparación a dientes con pulpas sanas (Proctor et al., 1991).

En LPA se ha determinado la sobreexpresión de IL-6, IL-1 y TNF- α (Buttke et al., 2005), inductores transcripcionales de PCR. Estas citoquinas ubicadas en el periápice podrían estimular la producción de PCR a nivel local o hepático. De este modo, la síntesis y liberación de PCR desde los hepatocitos se podría diseminar a través de los vasos sanguíneos y depositarse en sitios de inflamación aguda, donde expresaría su rol biológico (Du Clos and Mold, 2004).

Dada las propiedades de PCR, un aumento en su concentración perirradicular podría tener como consecuencia el desarrollo de una potencial respuesta inflamatoria sistémica. De acuerdo a lo anterior, se ha documentado en la literatura un aumento en la concentración plasmática de PCR en pacientes con enfermedades orales como periodontitis marginal (Ardila CM, 2010, Premoli et al., 2013) y en pacientes con LPA (Buttke et al., 2005).

Por lo tanto, niveles aumentados de PCR en LPA, como el GP y el QRI, podrían estar relacionados con la patogénesis y progresión de la PAA y además, por las características propias de la proteína, su presencia en niveles localmente elevados podría tener consecuencias sistémicas. Es por esto que el objetivo del presente trabajo es determinar los niveles de PCR en LPA en dientes con diagnóstico de PAA y en controles de LS.

HIPÓTESIS

Existen mayores niveles de Proteína C Reactiva en lesiones periapicales de dientes con Periodontitis Apical Asintomática respecto del ligamento periodontal sano.

OBJETIVO GENERAL

Comparar niveles de Proteína C Reactiva en lesiones periapicales de dientes con Periodontitis Apical Asintomática y en ligamento periodontal sano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración de proteínas totales (CPT) en homogeneizados de LPA en dientes con PAA y en LS.
2. Determinar los niveles de PCR en homogeneizados de LPA en dientes con PAA y en LS.
3. Comparar la CPT en homogeneizados de LPA en dientes con PAA y en LS.
4. Comparar los niveles de PCR en homogeneizados de LPA en dientes con PAA y en LS.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio de casos y controles, se realizó en base a la selección de 39 pacientes con diagnóstico de tejido periapical normal en premolares y 43 con diagnóstico de PAA como consecuencia de necrosis pulpar séptica. Las muestras se obtuvieron de dientes con indicación de exodoncia, procedimiento que se efectuó en la Clínica de Cirugía Cuarto Año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Antes de tomar las muestras, se dio a conocer el procedimiento a los pacientes y se pidió su autorización mediante un consentimiento informado (Anexo 1). En el caso de menores de edad, se requirió el consentimiento de apoderados y el asentimiento de pacientes (Anexo 2). Ambos documentos, como parte de un proyecto financiado por FONDECYT, cuentan con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

El diagnóstico fue determinado mediante anamnesis, examen clínico y radiográfico. Luego de ser establecido, fue registrado en una ficha elaborada para tal fin, en conjunto con los antecedentes del paciente (Anexo 3).

Los criterios de inclusión para el diagnóstico de PAA fueron: diente con respuesta negativa a las pruebas de sensibilidad pulpar (prueba de calor con transpoliisopreno y prueba de frío con Endolce[®] [Coltène/Whaledent Inc, Mahwah, NJ]) y presencia de LPA \geq 3 mm al examen radiográfico (Gutmann, 2009). La medición de la lesión fue determinada con el promedio entre su diámetro vertical y horizontal (Dezerega et al., 2012).

Para los pacientes con diagnóstico de tejido periapical normal, se incluyeron en el estudio aquellos que requirieron exodoncia de premolares sanos por indicación de ortodoncia (Dezerega et al., 2012, Mundi, 2011). Dientes asintomáticos al examen clínico sin alteraciones en el grosor del espacio correspondiente al ligamento periodontal (AAE, 2009).

Se excluyeron del estudio pacientes que recibieron medicación de antiinflamatorios, corticoides o antibióticos en los últimos 3 meses y pacientes con enfermedades sistémicas (Belmar et al., 2008, Palys et al., 1998, Ren and Malmstrom, 2007).

Obtención de las muestras

En pacientes con diagnóstico de PAA, con una cureta estéril (Hu-Friedy®), se extrajo la LPA unida a la raíz del diente posterior a la exodoncia (Radics et al., 2003). Tras su separación se realizó lavado con 3 ml de NaCl 0,9%, el cual se repitió tres veces. Las muestras se almacenaron en microtubos con su debido rótulo, y se trasladaron al laboratorio de Biología Periodontal manteniendo cadena de frío para ser almacenadas a -80°C hasta su procesamiento (Belmar et al., 2008).

En pacientes con diagnóstico de tejido periapical sano, luego de la extracción dentaria se procedió a lavar el diente tres veces con 3 ml de NaCl 0,9%. Mediante sonda periodontal Carolina del Norte (Hu-Friedy®), se determinó zona de curetaje a partir de dos milímetros hacia apical del límite de la unión de la encía con el diente. El tejido obtenido se almacenó en microtubos y se trasladó al mismo laboratorio manteniendo cadena de frío, para almacenarse a -80°C y ser procesados en una etapa posterior (Belmar et al., 2008).

Procesamiento de las muestras

Las muestras de LPA y LS fueron homogeneizadas. Para comenzar el procesamiento cada una de las muestras se lavó 3 veces con 1 ml de NaCl 0,9 M, luego fue secada con papel filtro y pesada (ADAM ADA-120LC 120GX0,1MG, Clarkson Laboratory and Supply Inc®, USA).

Se aplicó a cada microtubo tampón de lisis Tris- HCl pH 7,5 (0,5 M), NaCl (2 M), CaCl₂ (250mM), Tritón x-100 (25%) con inhibidor de proteasa libre de EDTA (complete Mini, EDTA-free, REF11836170001, LOT12910200, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). El tampón se agregó según el peso de la muestra en proporción 10 µL de buffer por gramo de tejido. La muestra con el tampón se homogeneizó en homogeneizador manual de vidrio esmerilado.

Tras la homogeneización se procedió a centrifugar (HERMLE Z 233 MK-2, HERMLE LABORTECHNIK ®, Germany) cada una de las muestras en sus respectivos tubos; primero por 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C y posteriormente por 10 minutos a 1.000 rpm a 4°C. En cada uno de los ciclos de centrifugación se eliminó el debris celular en el caso de que hubiese. Luego los homogeneizados se almacenaron nuevamente en el congelador a -80°C.

Cuantificación de Proteínas Totales

Cada una de las muestras fue sometida a cuantificación de proteínas totales (ng/ml) mediante el método del ácido bicinonínico (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Pierce®, Rockford, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método interpreta la cantidad de proteínas presentes mediante la intensidad del color en el espectrofotómetro. Para esto, la concentración se ajustó en una curva con albúmina sérica de bovino (BSA).

Determinación de niveles de PCR

La determinación de niveles de PCR se llevó a cabo utilizando un inmunoensayo múltiple fluorescente basado en microesferas (MILLIPLEX® MAP #SPR236), en la plataforma MAGPIX® (Luminex, X-Map Technology, Austin, TX, USA).

Para llevar a cabo el ensayo, 25 µl de alícuotas de homogeneizado obtenido de cada muestra fueron incubadas en una placa negra de 96 pocillos

junto a las microesferas magnéticas acopladas al anticuerpo específico contra la PCR humana. Tras la incubación, se realizaron tres lavados con 200 μ l de tampón cada vez. A fin de retener las esferas en el proceso de lavado, la placa se posicionó sobre un magneto por 60 segundos. Posteriormente fue añadido el anticuerpo de detección y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora en agitación a 600 rpm. Luego se agregó estreptavidina-ficoeritina y la placa fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos adicionales. El ensayo fue realizado en condición de oscuridad, pues las esferas poseen fotosensibilidad, es por esto que la placa va cubierta en todo momento con papel aluminio. Posteriormente, la placa fue sometida a un nuevo proceso de tres lavados con 200 μ l de tampón. Las esferas fueron resuspendidas en un tampón provisto por el fabricante y agitadas por 5 minutos a 600 rpm antes de su lectura. Finalmente, la placa fue leída en el equipo MAGPIX® utilizando el software xPONENT. Los niveles de PCR fueron obtenidos mediante análisis de los datos por software MILLIPLEX® Analyst (Vigenetech, Carlisle, Massachusetts, USA).

Análisis estadístico

El análisis se realizó mediante paquete de estadística Stata v.11. Para la determinación de significancia estadística entre género de los grupos de estudio se utilizó el test Chi².

Para la determinación de normalidad de la distribución de los datos se utilizó el test Shapiro Wilk. Tanto la concentración de proteínas totales (CPT) como la concentración de PCR y de PCR estandarizado por mg de proteínas totales presentaron distribución no normal. Por lo tanto para las comparaciones entre los grupos se utilizó Test de Mann-Whitney.

Para la evaluación de correlación entre la concentración de PCR y edad en ambos grupos de estudio se utilizó el test Spearman.

Se consideró significancia estadística si $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Determinantes demográficos

Para llevar a cabo el presente estudio, se seleccionaron 82 pacientes de los cuales se tomaron muestras de LPA y LS. Las características demográficas se presentan en la **Tabla 1**. Se obtuvieron 39 muestras de LS y 43 muestras de LPA de dientes con diagnóstico clínico y radiográfico de PAA. Treinta de estos pacientes eran mujeres y cincuenta y dos hombres, correspondiendo al 36,6% y 63,4% de la muestra respectivamente. Las edades para LS fueron de $15,5 \pm 5,0$ y para PAA $50,2 \pm 16,6$.

La distribución de los parámetros mencionados entre PAA y control no presentó variación estadísticamente significativa entre los grupos, con excepción de la edad, que fue significativamente mayor en PAA ($p < 0,05$).

Tabla 1. Características demográficas de población en estudio según estado.

	LS (n=39)	LPA (n=42)	p
Edad ($\bar{x} \pm DS$)	$15,5 \pm 5,0$	$50,2 \pm 16,6$	< 0,05
Género (n° de mujeres)	17	13	0,210

LS: Ligamento periodontal sano. LPA: Lesión periapical.

2. Concentración de Proteínas Totales

Con respecto a la CPT (**Figura 1**), ésta fue significativamente mayor en LPA en comparación con las muestras de LS. Los valores (mediana [recorrido intercuartílico]) para LPA fueron 7,295 (6,21) ng/ml, mientras que los de LS fueron 2,15 (1,89) ng/ml.

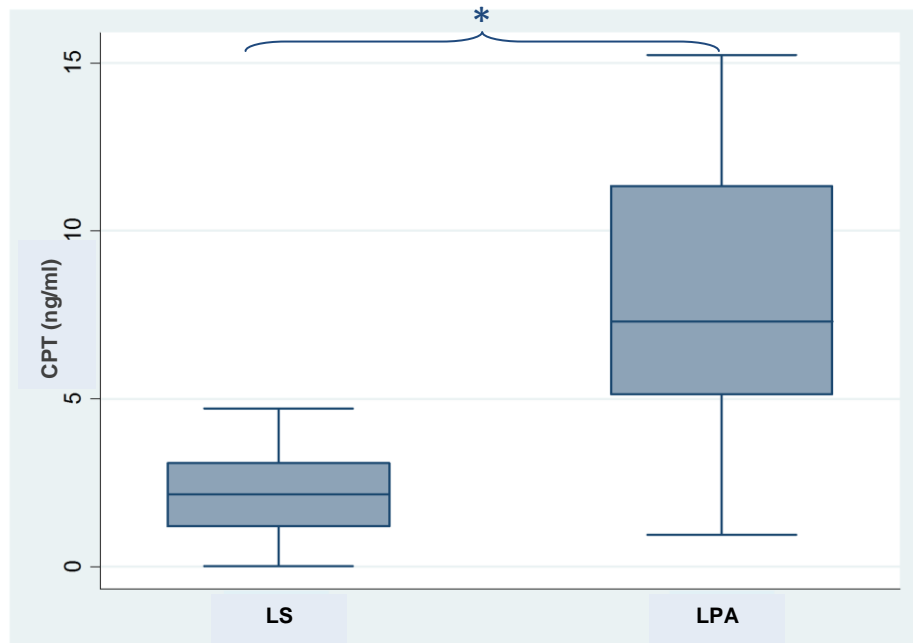


Figura 1. CPT en muestras de LS y LPA.

CPT: Concentración de proteínas totales expresadas en ng/ml. LS: Ligamento periodontal sano. LPA: Lesión periapical. * $p < 0,0001$

3. Niveles de PCR

Los niveles de PCR estandarizados por ml de homogeneizado (**Figura 2**) fueron significativamente mayores en las muestras de LPA, con valores (mediana [recorrido intercuartílico]) de 26,3 (15,48) ng/ml, en comparación con los valores de LS que fueron 1,06 (2,055) ng/ml.

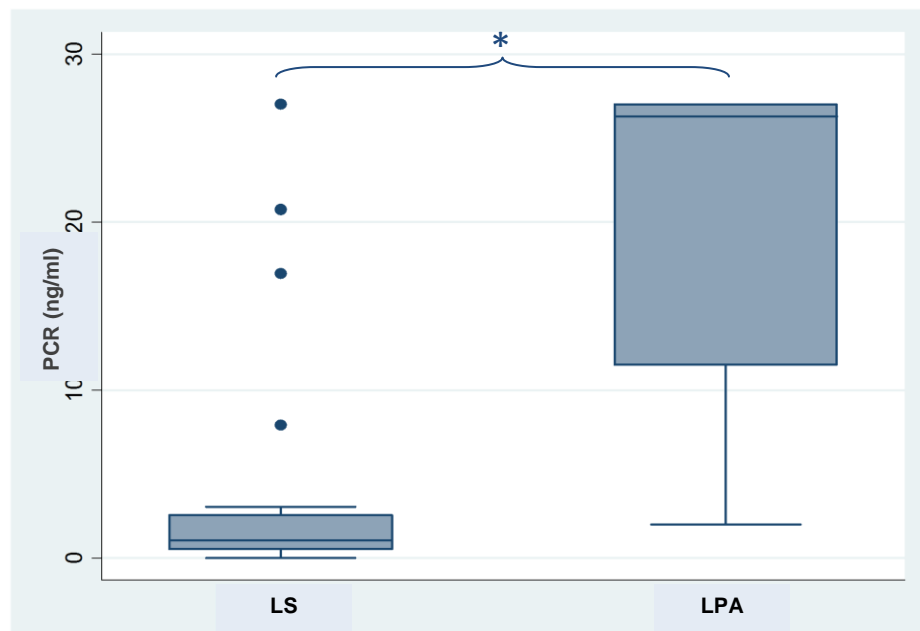


Figura 2. Niveles de PCR en muestras de LS y LPA.

PCR: Concentración de Proteína C Reactiva expresada en ng/ml. LS: Ligamento periodontal sano. LPA: Lesión periapical. * $p < 0,0001$.

4. Niveles de PCR estandarizados por mg de proteínas totales.

Los niveles de PCR estandarizado por mg de proteínas totales (**Figura 3**) fueron significativamente mayores en las muestras de LPA con valores (mediana [recorrido intercuartílico]) de 2,37 (1,86) ng/mg versus LS 0,53 (1,18) ng/mg.

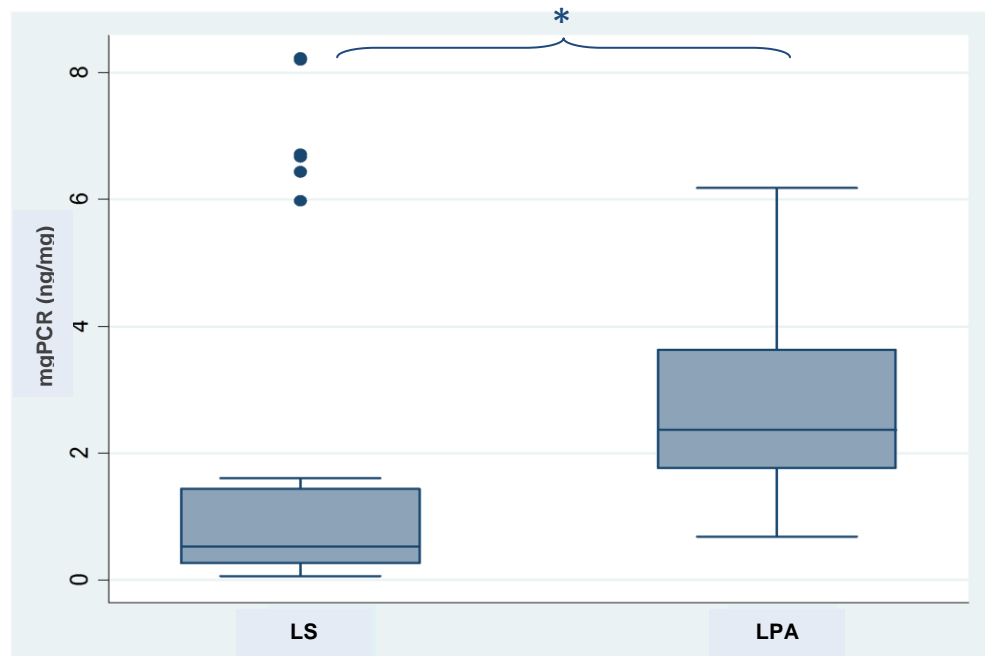


Figura 3. Niveles de PCR estandarizadas por mg de proteínas totales en muestras de LS y LPA.

mgPCR: Concentración de PCR estandarizada por milígramo de proteínas totales expresada en ng/mg. LS: Ligamento periodontal sano. LPA: Lesión periapical.

* $p < 0,0001$.

DISCUSIÓN

La PAA corresponde a una enfermedad en que se desarrolla una respuesta inflamatoria ante un estímulo bacteriano que implica la destrucción del tejido que rodea el ápice dentario, con la consecuente formación de una LPA (Gazivoda et al., 2009, Nair, 2004). Mediante el presente trabajo de investigación, se demostró por primera vez que los niveles de PCR se encuentran elevados en LPA de dientes con diagnóstico de PAA en comparación con LS, apoyando un posible rol de PCR en la patogénesis de PAA.

Los niveles de PCR en homogeneizados fueron significativamente mayores en el tejido enfermo en comparación con el tejido sano, en relación con la ocurrencia de un proceso inflamatorio asociado a LPA. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores en que se ha demostrado la sobreexpresión de PCR en dientes con pulpas inflamadas (Proctor et al., 1991) y la sobreexpresión de inductores transcripcionales de PCR (IL-6, IL-1 y TNF α) en GP y en exudados periapicales de dientes con PAA (Ataoğlu et al., 2002, Rosa de Sá et al., 2003).

Niveles aumentados de PCR en LPA podrían ser determinantes en la comprensión de la formación y desarrollo de la PAA, ya que dadas sus propiedades, la PCR podría favorecer la activación del complemento (Pepys and Hirschfield, 2003), aumentar la adhesión endotelial de leucocitos y la capacidad fagocítica de M ϕ , los cuales constituyen el grupo celular de mayor protagonismo en esta patología (Domínguez-Amorocho and Patiño-Cuervo, 2008, Metzger, 2000).

En LS también se detectaron niveles de PCR, aunque estos fueron significativamente menores que en LPA. La presencia de PCR en el ligamento de dientes sanos, podría deberse a los movimientos fisiológicos y a los mecanismos básicos de homeostasis periapical.

La importancia en la presencia de PCR en PAA también radica en las potenciales respuestas sistémicas que podría generar esta proteína. Ya en investigaciones anteriores se ha determinado la presencia de marcadores inflamatorios a nivel del suero en pacientes con LPA (Boucher et al., 1967, Marton and Kiss, 1992, Torabinejad et al., 1983), como también la disminución de estos marcadores tras la resolución de la lesión endodóntica a través del acto quirúrgico conservador/endodoncia, o tratamiento quirúrgico no conservador/exodoncia o apicectomía (Buttke et al., 2005). Las proyecciones de estos estudios pueden determinar que un aumento de PCR en el periápice, se disemine a través de la circulación, haciéndose detectable a nivel sistémico. La presencia de PCR en el suero puede causar activación de plaquetas (Eisenhardt et al., 2009) y aumentar el riesgo cardíaco del paciente participando activamente en la aterogénesis (Verma et al., 2005). Por lo que un aumento sérico de PCR, no implica tan solo la presencia de un estado inflamatorio, sino que también un incremento en el riesgo metabólico del individuo.

Una de las interrogantes que quedan abiertas tras esta investigación es la identificación de la fuente de origen de PCR. La síntesis de esta proteína se lleva a cabo como respuesta a un proceso inflamatorio principalmente en los hepatocitos (Pepys and Hirschfield, 2003). Sin embargo, también se ha determinado su síntesis en tejidos extrahepáticos, como las células endoteliales (Amezcu-Guerra L, 2007). En los tejidos propios de la cavidad oral, se ha descubierto que el epitelio gingival posee la capacidad de sintetizar IL-6 y PCR (Lu and Jin, 2010). Por lo tanto, se requiere el desarrollo de nuevos estudios para establecer si la PCR identificada en los tejidos perirradiculares se genera localmente o bien en forma sistémica a partir de su extravasación del suero.

A pesar de no encontrar una correlación entre los niveles de PCR y la edad de los sujetos en estudio, se observó una diferencia significativa en el promedio de cada grupo, que correspondió a $50,2 \pm 16,6$ años en el grupo de PAA y $15,5 \pm 3,8$ años en el grupo control. Esto se debe a que la mayor parte de las indicaciones de extracción por ortodoncia se realizan en la adolescencia. No existen estudios

acerca de las variaciones de PCR u otros mediadores en relación con la edad en ligamento periodontal. Sin embargo, la falta de asociación entre los niveles de PCR y la edad de los sujetos en el presente estudio, avalan que las diferencias encontradas se deberían a la PAA, minimizando la potencial influencia de la edad sobre los niveles de PCR.

El presente estudio también determinó un incremento en la CPT de las muestras, siendo esta significativamente mayor en LPA que en LS en concordancia con la literatura (Dezerega et al., 2012). Este aumento de CPT podría tener varios orígenes, podría deberse a la formación de un exudado inflamatorio producto de la extravasación vascular de proteínas consecuente al aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos (García Cabrera et al., 2011, Nekoofar et al., 2009). También podría explicarse por el aumento de hemoglobina en las LPA, debido a su alta vascularización (Carrillo García et al., 2007, Gutmann et al., 2009, Huuonen and Ørstavik, 2002), o simplemente, a un aumento local de mediadores proinflamatorios como consecuencia de la activación de la respuesta inmune (Nair, 1997).

En la actualidad, las herramientas diagnósticas y pronósticas de la PAA se basan fundamentalmente en la evaluación clínica-radiográfica (Katebzadeh et al., 2000). Sin embargo, esta técnica posee ciertos inconvenientes, la obtención de imágenes bidimensionales de una estructura tridimensional y la superposición, interfieren con la observación de la lesión radiolúcida (Burgener et al., 2010, Jorge et al., 2008). Además el tiempo en que se detectan cambios en la densidad ósea a través de la radiografía es muy variable (McCauley and Nohutcu, 2002). En general, los análisis radiográficos otorgan información limitada con respecto a la progresión de la LPA o a la reparación de ésta (Orstavik, 1991). Para contrarrestar estas limitaciones se han implementado nuevos métodos como la ecotomografía, la tomografía computada y el estudio del exudado periapical durante el tratamiento endodóntico (Cotti and Campisi, 2004, Shimauchi et al., 1996). Sin embargo, el método diagnóstico definitivo sigue siendo el estudio anátomo patológico (de Paula-Silva et al., 2009). Debido a que corresponde a un procedimiento invasivo,

no se indica en el diagnóstico de rutina, sino más bien al estudio de lesiones persistentes.

El estudio de PCR podría contribuir a la aplicación de herramientas menos invasivas y de mayor sensibilidad para monitorear la presencia y evolución de LPA antes, durante y después del tratamiento endodóntico. La medición de PCR en el fluido gingival crevicular (FGC) podría ser uno de estos métodos, ya que representa una herramienta simple, que ha demostrado ser útil para el monitoreo de la inflamación y la respuesta al tratamiento de la enfermedad periodontal marginal (Golub et al., 2008). Otros mediadores ha sido estudiados en FGC de dientes con PA, pero aún son necesarios mayores estudios para confirmar si este método refleja la inflamación apical, su resolución y cicatrización post tratamiento (Belmar et al., 2008, Dezerega et al., 2012). Además el acabado entendimiento de PCR, mediante la identificación de sus funciones y mecanismo de acción, podría otorgar mayor información con respecto a su potencial en las respuestas locales y en sus consecuencias sistémicas.

En resumen, en el presente estudio se observó un aumento significativo de PCR en LPA en relación a los controles de LS, sugiriendo que PCR podría jugar un rol importante en la patogénesis de PAA. La continua investigación y realización de nuevos estudios permitirá un mayor conocimiento sobre el papel de PCR en el desarrollo y la perpetuación de PAA y los mecanismos que se encuentran involucrados en el proceso. La detección y evaluación de los niveles de PCR y de otros mediadores moleculares en PAA amplían el horizonte para el diagnóstico, pronóstico y control de esta patología.

CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo de investigación se puede concluir:

1. La CPT en homogeneizados de LPA es significativamente mayor que en muestras de LS. Por lo tanto, podría representar un método adecuado para la estandarización.
2. Es posible detectar la presencia de PCR tanto en LS como en LPA.
3. La concentración de PCR es significativamente mayor en LPA versus LS, en asociación con la respuesta inflamatoria local. Niveles basales de PCR se asociarían con la homeostasis del periodonto apical.
4. La PCR podría participar en el desarrollo de la PAA y dadas sus propiedades, podría inducir una potencial respuesta inflamatoria sistémica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAE 2009. Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology. *Journal of Endodontics*, 35, 1634.
- AMEZCUA-GUERRA L, S. R., BOJALIL R 2007. Proteína C Reactiva: aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda. *Archivos de Cardiología de México*, 77, 58-66.
- ARANDA, V. 2012. *Niveles de Mieloperoxidasa (MPO) en fluido gingival crevicular (FGC) de dientes con periodontitis apical asintomática (PAa)*. [Trabajo de investigación para optar al título de Cirujano-Dentista], Universidad de Chile.
- ARDILA CM, L. G. 2010. Asociación entre porphyromona gingivales y proteína C reactiva en enfermedades sistémicas inflamatorias. *Av Periodon Implantol*, 22, 15-53.
- ATAOĞLU, T., ÜNGÖR, M., SERPEK, B., HALILOĞLU, S., ATAOĞLU, H. & ARI, H. 2002. Interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α levels in periapical exudates. *International endodontic journal*, 35, 181-185.
- BARBIERI PETRELLI, G., FLORES GUILLÉN, J. & VIGNOLETTI, F. 2005. El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 17, 11-16.
- BELMAR, M. J., PABST, C., MARTÍNEZ, B. & HERNÁNDEZ, M. 2008. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 105, 801-806.
- BOUCHER, N. E., HANRAHAN, J. J. & KIHARA, F. Y. 1967. Occurrence of C-reactive protein in oral disease. *Journal of dental research*, 46, 624-624.
- BURGENER, B., FORD, A. R., SITU, H., FAYAD, M. I., HAO, J. J., WENCKUS, C. S., JOHNSON, B. R., BEGOLE, E. A. & GEORGE, A. 2010. Biologic markers for odontogenic periradicular periodontitis. *Journal of endodontics*, 36, 1307-1310.

- BUTTKE, T. M., SHIPPER, G., DELANO, E. O. & TROPE, M. 2005. C-reactive protein and serum amyloid a in a canine model of chronic apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 31, 728-732.
- CARRILLO GARCÍA, C., VERA SEMPERE, F., PEÑARROCHA DIAGO, M. & MARTÍ BOWEN, E. 2007. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 12, 585-590.
- COTTI, E. & CAMPISI, G. 2004. Advanced radiographic techniques for the detection of lesions in bone. *Endodontic Topics*, 7, 52-72.
- DE PAULA-SILVA, F. W. G., D'SILVA, N. J., DA SILVA, L. A. B. & KAPILA, Y. L. 2009. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *Journal of endodontics*, 35, 1234-1242.
- DEZEREGA, A., MADRID, S., MUNDI, V., VALENZUELA, M. A., GARRIDO, M., PAREDES, R., GARCÍA-SESNICH, J., ORTEGA, A. V., GAMONAL, J. & HERNÁNDEZ, M. 2012. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *Journal of Inflammation*, 9, 8.
- DOMÍNGUEZ-AMOROCHO, O. & PATIÑO-CUERVO, D. 2008. Proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) como marcador de riesgo de enfermedad cardiovascular. *Medicina & Laboratorio*, 14, 457-478.
- DU CLOS, T. & MOLD, C. 2004. C-Reactive Protein An Activator of Innate Immunity and a Modulator of Adaptive Immunity. *Immunologic Research*, 30, 261-277.
- EISENHARDT, S. U., HABERSBERGER, J. & PETER, K. 2009. Monomeric C-reactive protein generation on activated platelets: the missing link between inflammation and atherothrombotic risk. *Trends in cardiovascular medicine*, 19, 232-237.
- FIGDOR, D. & SUNDQVIST, G. 2007. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Australian dental journal*, 52, S38.

- GARCÍA CABRERA, L., RODRÍGUEZ REYES, O. & CALZADO DE SILVA, M. 2011. Bases morfofisiopatológicas de la respuesta inflamatoria aguda pulpar. *Medisan*, 15, 1647-1655.
- GARRIDO FLORES, M., ORDENES VITALI, T., SEGÚ CABRERA, C., BAEZA PAREDES, M., GARCÍA-SESNICH, J. & HERNÁNDEZ RÍOS, M. 2011. Asociación entre niveles de TNF- α en fluido crevicular gingival de dientes con periodontitis apical asintomática. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 4, 130-133.
- GAZIVODA, D., DZOPALIC, T., BOZIC, B., TATOMIROVIC, Z., BRKIC, Z. & COLIC, M. 2009. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *Journal of oral pathology & medicine*, 38, 605-611.
- GOMES, B., PINHEIRO, E., GADÊ-NETO, C., SOUSA, E., FERRAZ, C., ZAIA, A., TEIXEIRA, F. & SOUZA-FILHO, F. 2004. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral microbiology and immunology*, 19, 71-76.
- GRAUNAITE, I., LODIENE, G. & MACIULSKIENE, V. 2011. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 2.
- GUTMANN, J., BAUMGARTNER J, GLUSKIN A, HARTWELL G, WALTON R. 2009. Identify and define all diagnostic terms for periapical/ periradicular health and disease states. *J.Endod*, 35, 1658-1674.
- GUTMANN, J. L., BAUMGARTNER, J. C., GLUSKIN, A. H., HARTWELL, G. R. & WALTON, R. E. 2009. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *Journal of Endodontics*, 35, 1658-1674.
- HUUMONEN, S. & ØRSTAVIK, D. 2002. Radiological aspects of apical periodontitis. *Endodontic Topics*, 1, 3-25.
- INGLE, BLACKLAND, L. & BAUMGARTNER, J. 2008. *Endodontics*.
- JORGE, E. G., TANOMARU-FILHO, M., GONÇALVES, M. & TANOMARU, J. M. 2008. Detection of periapical lesion development by conventional radiography or computed tomography. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 106, e56-e61.

- KATEBZADEH, N., SIGURDSSON, A. & TROPE, M. 2000. Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study. *International endodontic journal*, 33, 60-65.
- LU, Q. & JIN, L. 2010. Human gingiva is another site of C-reactive protein formation. *Journal of Clinical Periodontology*, 37, 789-796.
- MARNELL, L., MOLD, C. & DU CLOS, T. W. 2005. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical immunology*, 117, 104-111.
- MARTON, I. & KISS, C. 1992. Influence of surgical treatment of periapical lesions on serum and blood levels of inflammatory mediators. *International endodontic journal*, 25, 229-233.
- MARTON, I. & KISS, C. 2000. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral microbiology and immunology*, 15, 139-150.
- MCCAULEY, L. K. & NOHUTCU, R. M. 2002. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *Journal of periodontology*, 73, 1377-1391.
- METZGER, Z. 2000. Macrophages in periapical lesions. *Dental Traumatology*, 16, 1-8.
- MOSHAGE, H. 1997. Cytokines and the hepatic acute phase response. *The Journal of pathology*, 181, 257-266.
- MUNDI, V. 2011. *Niveles y Actividad de Metaloproteinasas de Matriz Extracelular - 2, -9, -13 y α 2-macroglobulina en dientes con Periodontitis Apical Crónica*. [Trabajo de investigación para optar a Magister de Ciencias Odontológicas Mención Periodoncia]. , Universidad de Chile
- NAIR, P. 1997. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology 2000*, 13, 121-148.
- NAIR, P. 2004. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15, 348-381.
- NAIR, P. 2006. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International Endodontic Journal*, 39, 249-281.
- NEKOO FAR, M., NAMAZIKHAH, M., SHEYKHREZAE, M., MOHAMMADI, M., KAZEMI, A., ASEELEY, Z. & DUMMER, P. 2009. pH of pus collected from periapical abscesses. *International endodontic journal*, 42, 534-538.

- ORSTAVIK, D. 1991. Radiographic evaluation of apical periodontitis and endodontic treatment results: a computer approach. *International dental journal*, 41, 89.
- PALOMO, I., FERREIRA, A., SEPÚLVEDA, C., ROSEMBLANTT, M. & VERGARA, U. 2009. Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica 2002. *Editorial Universidad de Talca, Capítulo, 26, 437-457.*
- PALYS, M. D., HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S. & GIANNOBILE, W. V. 1998. Relationship between C-telopeptide pyridinoline cross-links (ICTP) and putative periodontal pathogens in periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 25, 865-871.
- PECIULIENE, V., MANELIENE, R., BALCIKONYTE, E., DRUKTEINIS, S. & RUTKUNAS, V. 2008. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija*, 10, 4-9.
- PEPYS, M. B. & HIRSCHFIELD, G. M. 2003. C-reactive protein: a critical update. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1805-1812.
- PREMOLI, G., VILLARREAL A, J. & GONZÁLEZ B, A. 2013. Proteína c reactiva y su relacion con la enfermedad periodontal y aterosclerosis. *Acta Odontológica Venezolana*, 46.
- PROCTOR, M. E., TURNER, D. W., KAMINSKI, E. J., OSETEK, E. M. & HEUER, M. A. 1991. Determination and relationship of C-reactive protein in human dental pulps and in serum. *Journal of Endodontics*, 17, 265-270.
- RADICS, T., KISS, C., TAR, I. & MÁRTON, I. 2003. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral microbiology and immunology*, 18, 9-13.
- REN, Y.-F. & MALMSTROM, H. S. 2007. Rapid quantitative determination of C-reactive protein at chair side in dental emergency patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 104, 49-55.
- ROSA DE SÁ, A., GARCIA SANTOS PIMENTA, F. J., ORNELAS DUTRA, W. & SANTIAGO GOMEZ, R. 2003. Immunolocalization of interleukin 4,

- interleukin 6, and lymphotoxin α in dental granulomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 96, 356-360.
- SHIMAUCHI, H., MIKI, Y., TAKAYAMA, S.-I., IMAI, T. & OKADA, H. 1996. Development of a quantitative sampling method for periapical exudates from human root canals. *Journal of endodontics*, 22, 612-615.
- SIQUEIRA, J. F. 2002. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 94, 281-293.
- SIQUEIRA JR, J. F. & RÔÇAS, I. N. 2007. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*, 18, 267-280.
- SKUCAITE, N., PECIULIENE, V. & MACIULSKIENE, V. 2009. Microbial infection and its control in cases of symptomatic apical periodontitis: a review. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 45, 343.
- SOMMA, F., CASTAGNOLA, R., BOLLINO, D. & MARIGO, L. 2011. Oral inflammatory process and general health. Part 2: How does the periapical inflammatory process compromise general health? *European review for medical and pharmacological sciences*, 15, 35-51.
- TORABINEJAD, M., THEOFILOPOULOS, A. N., KETERING, J. D. & BAKLAND, L. K. 1983. Quantitation of circulating immune complexes, immunoglobulins G and M, and C3 complement component in patients with large periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 55, 186-190.
- VERMA, S., SZMITKO, P. E. & RIDKER, P. M. 2005. C-reactive protein comes of age. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2, 29-36.

ANEXOS

Anexo 1: FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO – PACIENTES 18 AÑOS O MÁS

Ed. 30/07/2011

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

PROYECTO PATROCINADO POR FONDECYT 2011: "ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA LOCAL DEL HOSPEDERO FRENTE A LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA E INFLAMACIÓN SISTÉMICA DE BAJO GRADO EN PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA. ESTUDIO LONGITUDINAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO ENDODÓNTICO CONSERVADOR"

Versión 1, pacientes 18 años o más

Antecedentes generales: Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio titulado "Asociación entre la respuesta local del hospedero frente a la infección endodóntica e inflamación sistémica de bajo grado en Periodontitis Apical Asintomática. Estudio longitudinal para evaluar los efectos del tratamiento endodóntico conservador". Esta enfermedad corresponde a una infección de origen dental que generalmente se produce por caries no tratadas y genera una lesión destructiva en los tejidos que rodean la raíz del diente. El tratamiento de estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico (instrumentación y desinfección del conducto de la raíz dentaria), ambos con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas a esta enfermedad. En términos generales, el objetivo del presente estudio es caracterizar la presencia de inflamación local, en los tejidos que rodean el diente, (a partir de dientes extraídos y fluido de la encía) y sistémica, es decir en tejidos u órganos distantes al diente mediante análisis de la sangre en este último caso, como consecuencia de esta enfermedad y las bacterias que la provocan. Esto permitirá determinar si la presencia de estas lesiones podría implicar un riesgo en la producción de otras enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares y el efecto del tratamiento endodóntico sobre este potencial riesgo. Con este fin, se incluirán pacientes con periodontitis apical asintomática (enfermedad en estudio) y se excluirán aquellos pacientes que presenten enfermedades generales y periodontitis crónica, dado que estas podrían influir sobre los resultados. Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio cuando lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

Procedimiento: Se incluirán pacientes con diagnóstico de diente con Periodontitis Apical Asintomática y controles sin el problema dental, ninguno con enfermedades generales. **Cuando esté indicado,** el especialista en endodoncia le realizará el tratamiento de

23/04/2012
COMITE ASESOR
DE BIOÉTICA
FONDECYT

Ed. 30/07/2011

conducto, durante el cual se les tomarán primero muestras de fluido del surco entre encía y diente usando una tira de papel absorbente y segundo, un auxiliar paramédico calificado adscrito al proyecto tomara muestras de su sangre por punción venosa del brazo. Las muestras se tomaran antes y una semana, 3, 6 y 12 meses despues del tratamiento. La duración del estudio será por tanto de un año en pacientes que se realicen tratamiento endodóntico, y sólo la sesión de toma de muestra y/o extracción dentaria en el caso del resto de los participantes. ***El financiamiento del tratamiento será responsabilidad del paciente***, mientras que los análisis de muestras serán financiados por el proyecto, así como el estudio radiográfico requerido para éste.

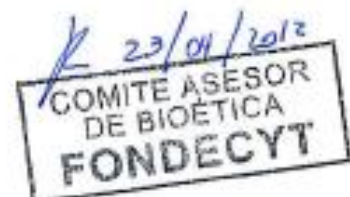
En los pacientes que presenten indicación de extracción dentaria, las lesiones asociadas serán extirpadas y analizadas. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos ni costos adicionales para el paciente y una vez analizadas serán descartadas.

El total de muestras y datos obtenidos serán registrados e identificados por el investigador responsable mediante códigos para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales y los códigos servirán para mantener oculta la identidad de los participantes. 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, las personas podrán acceder a tratamiento endodóntico de costo reducido, estudio radiográfico asociado y análisis de perfil lipídico (riesgo cardiovascular) y hemoglobina glicosilada (riesgo de diabetes) gratuitos y se informará a aquellos que tengan niveles alterados.

Investigador Responsable:

Dra. Marcela Hernández Ríos. RUT: 12.517.528-7
Deplo. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
Fono: 9781833
e-mail: mhermandezrios@gmail.com



Ed. 30/07/2011

FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES ADULTOS

Investigador responsable: Dra. Marcela Hernández Ríos: Marcela Hernández Ríos;
Depto. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Fono: 9781808;
email: mhernandezrios@gmail.com.

Yo..... estoy dispuesto a participar en el proyecto de investigación. He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto:

Firma

Ante cualquier duda puedo preguntar al Comité de Etica de la Facultad de Odontología cuyo presidente es el Dr. Juan Cortés; teléfono: 9781702 y su dirección es Facultad de Odontología de la U. de Chile, Edificio Administrativo, Oficina Vicedecanato, 4º piso , Sergio Livingston P. 943, Independencia.

Al sujeto de investigación he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto sujeto de investigación. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna.

He sido testigo que el sujeto firmó el documento:

Nombre del Investigador:.....

Firma del Investigador: Fecha:

R 23/04/2012
COMITE ASESOR
DE BIOÉTICA
FONDECYT



**Anexo 2: FORMULARIO CONSENTIMIENTO Y ASENTIMIENTO INFORMADO –
PACIENTES MENORES DE 18 AÑOS.**

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

PROYECTO PATROCINADO POR FONDECYT 2011 "ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA LOCAL DEL HOSPEDERO FRENTE A LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA E INFLAMACIÓN SISTÉMICA DE BAJO GRADO EN PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA. ESTUDIO LONGITUDINAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO ENDODÓNTICO CONSERVADOR"

Consentimiento Informado para pacientes menores de 18 años, donantes de tejidos peridentarios sanos

Antecedentes generales

Te hemos invitado a participar voluntariamente en un estudio que esta realizando la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile financiado por el Gobierno de Chile, que pretende ver como reaccionan los tejidos que sostienen al diente y el cuerpo en general, frente a una infección dentro de los dientes y que puede salir por la raíz del diente al hueso. También queremos saber como reaccionan esos tejidos y el organismo en general cuando los dientes son desinfectados con un tratamiento de conducto.

Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura los cuales podran hacer todas las preguntas que quieran.

La enfermedad de infección de la raíz del diente se llama Periodontitis Apical y es generalmente producida por caries no tratadas y genera una corrosión o destrucción del hueso y de los tejidos que rodean la raíz del diente. Esta destrucción es producida no sólo por la infección sino también por las mismas defensas de las personas que reaccionan con inflamación ante las bacterias. A veces el daño es tan grande que no se puede hacer tratamiento de conducto y hay que sacar el diente, en tal caso vamos a estudiar ese diente y los tejidos adheridos a él en las personas enfermas. Pero siempre se necesita conocer como se presentan los tejidos de dientes sanos que no tienen infección, para comparar aquello que no es normal.

Es la razón por la que te hemos solicitado la donación voluntaria del diente sano que deberán sacarte por el tratamiento de ortodoncia que estas recibiendo y que no tiene que ver con la enfermedad que queremos estudiar por lo que pertenecerías al llamado "grupo control".

R. 23/04/2012
COMITE ASESOR
DE BIOÉTICA
FONDECYT

Procedimiento:

Con este objetivo, los dientes que te serán extraídos por indicación del ortodoncista los lavaremos cuidadosamente, los rasparemos en sus raíces con curetas especiales, guardaremos las células y tejidos raspados y los llevaremos a nuestro laboratorio donde serán analizados para caracterizar algunas de las moléculas que causan la inflamación. Si deseas te devolveremos tu diente intacto.

Tu identidad será celosamente guardada en secreto, y los tejidos de tus dientes serán usados solo con fines para esta investigación, no se realizarán análisis genéticos en ellos. Para resguardar tu identidad secreta, los tejidos de los dientes recibirán un código especial. La realización de este análisis no requerirá intervenciones ni tiempo extra, como tampoco implicará riesgo alguno para ti.

Ventajas:

Como beneficios, se te entregarán en forma gratuita algunos cepillos de dientes, pasta y seda dental para higiene oral.

Cualquier información obtenida a partir de los participantes del estudio será estrictamente confidencial y bajo ninguna circunstancia se revelarán datos personales. Los resultados del estudio serán publicados en revistas científicas con el objetivo de contribuir al conocimiento de esta enfermedad, sus posibles consecuencias de no ser tratada y mejorar su tratamiento en el futuro.

Investigador Responsable:

Dra. Marcela Hernández Ríos

RUT: 12.517.528-7

Deppto. De Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile,

Fono: 9781833

e-mail: mhernandezrios@gmail.com



30/07/2011

CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES MENORES DE 18 AÑOS

Identificación del paciente:

Investigador responsable: Dra. Marcela Hernández Ríos.
 Depto. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
 Fono: 9781808 email: mherandezrios@gmail.com.

FIRMA IP: _____

Ante cualquier duda puedo preguntar al Comité de Ética de la Facultad de Odontología cuyo presidente es el Dr. Juan Cortés; teléfono: 9781702 y su dirección es Facultad de Odontología de la U. de Chile, Edificio Administrativo, Oficina Vicodocanato, 4º piso, Sergio Livingston P. 943, Independencia.

Marcar con cruz

1. Confirmando que he leído y comprendido la información referente a la participación en el estudio y he tenido la oportunidad de preguntar y aclarar cualquier duda al respecto.
2. Confirmando que he tenido el tiempo suficiente para decidir mi participación en el presente estudio.
3. Entiendo que mi participación es voluntaria y puedo retirarme en cualquier momento que decida, sin que esto afecte mi tratamiento dental.
4. Entiendo que mis padres serán informados y doy mi asentimiento para que se les notifique.
5. Acepto participar en este estudio

Nombre paciente	Fecha	Firma
Padre, madre o adulto responsable	Fecha	Firma
Nombre de la persona que toma el consentimiento	Fecha	Firma

23/04/2012
 COMITE ASESOR
 DE BIOETICA
 FONDECYT



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA PADRES O TUTORES

"ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA LOCAL DEL HOSPEDERO FRENTE A LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA E INFLAMACIÓN SISTÉMICA DE BAJO GRADO EN PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA. ESTUDIO LONGITUDINAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO ENDODÓNTICO CONSERVADOR"

Versión 3, padres o tutores pacientes menores de 18 años

Antecedentes generales

Su hijo o pupilo ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio titulado "Asociación entre la respuesta local del hospedero frente a la infección endodóntica e inflamación sistémica de bajo grado en Periodontitis Apical Asintomática. Estudio longitudinal para evaluar los efectos del tratamiento endodóntico conservador". Esta enfermedad corresponde a una infección de origen dental que generalmente se produce por caries no tratadas y genera una lesión destructiva en los tejidos que rodean la raíz del diente. El tratamiento de estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico (instrumentación y desinfección del conducto de la raíz dentaria), ambos con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas a esta enfermedad. En términos generales, el objetivo del presente estudio es caracterizar la presencia de inflamación local, en los tejidos que rodean el diente en respuesta a esta enfermedad. Con este fin, se incluirán pacientes con periodontitis apical asintomática (enfermedad en estudio) y dientes sanos con indicación de extracción por ortodoncia (controles), cuyas muestras permitirán realizar el análisis de los mediadores de inflamación local (de los tejidos circundantes al diente). Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

R. 23/04/2012.
COMITE ASESOR
DE BIOÉTICA
FONDECYT

Procedimiento:

Con este objetivo, los dientes extraídos por indicación del ortodoncista serán analizados para caracterizar mediadores inflamatorios en éstos mediante el uso de códigos para mantener la confidencialidad de la identidad de los participantes. La realización de este análisis no requerirá intervenciones ni tiempo extra, como tampoco implica riesgo alguno para el participante.

Ventajas:

Como beneficios, se le entregarán en forma gratuita instrumentos de higiene oral. Cualquier información obtenida a partir de los participantes del estudio será estrictamente confidencial y bajo ninguna circunstancia se revelarán datos personales. Los resultados del estudio serán publicados en revistas científicas con el objetivo de contribuir al conocimiento de esta enfermedad, sus posibles consecuencias de no ser tratada y mejorar su tratamiento en el futuro.

Investigador Responsable:

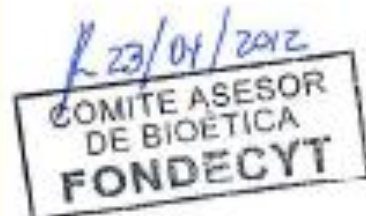
Dra. Marcela Hernández Ríos

RUT: 12.517.528-7

Depto. De Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Fono: 9781833

e-mail: mhernandezrios@gmail.com



CONSENTIMIENTO INFORMADO PADRES O TUTORES

Identificación del paciente:

Investigador responsable: Dra. Marcela Hernández Ríos. Depto. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Fono: 9781808 email: mhemandezrios@gmail.com.

FIRMA IP:

Ante cualquier duda puedo preguntar al Comité de Ética de la Facultad de Odontología cuyo presidente es el Dr. Juan Cortés; teléfono: 9781702 y su dirección es Facultad de Odontología de la U. de Chile, Edificio Administrativo, Oficina Vicedecanato, 4° piso, Sergio Livingston P. 943, Independencia.

Marcar con

CRUZ

1. Confirmando que he leído y comprendido la información referente a la participación en el estudio y he tenido la oportunidad de preguntar y aclarar cualquier duda al respecto.
2. Confirmando que he tenido el tiempo suficiente para decidir si deseo o no que mi hijo o pupilo participe en el presente estudio.
3. Entiendo que la participación de mi hijo o pupilo es voluntaria y se puede retirar en cualquier momento que decida, sin que esto afecte su tratamiento dental.
4. Entiendo que mi hijo o pupilo será informado sobre mi notificación y doy mi asentimiento para que se me notifique.
5. Acepto que mi hijo o pupilo participe en este estudio

Nombre paciente	Fecha	Firma
Padre, madre o adulto responsable	Fecha	Firma
Nombre de la persona que toma el consentimiento	Fecha	Firma

23/04/2012
COMITE ASESOR
DE BIOÉTICA
FONDECYT



Anexo 3: FICHA CLÍNICA:

Nombre	_____	Fecha	_____	Nº de Identificación	_____
Género	Femenino	<input type="checkbox"/>	Masculino	<input type="checkbox"/>	
Edad	<input type="text"/>				
Nivel educacional	Básica	<input type="checkbox"/>	Media	<input type="checkbox"/>	Superior
	Incompleta	<input type="checkbox"/>	Completa	<input type="checkbox"/>	Completa
	(<8ª)	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Enfermedades Sistémicas	Actual	<input type="checkbox"/>	Pasada	<input type="checkbox"/>	Especificar _____
Tratamiento médico en últimos 6 meses	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Periodontitis	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	Gingivitis Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Fumador	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Colesterol no HDL (mg/dL)	<input type="text"/>				
Colesterol HDL (mg/dL)	<input type="text"/>				
Presión Arterial (mm/Hg)	<input type="text"/>				
Obesidad (IMC) (Kg/m ²)	<input type="text"/>				
Hiperglicemia (glucohemoglobina %)	<input type="text"/>				
Nº de dientes con PAA	<input type="text"/>	Nº de dientes con caries dentinaria	<input type="text"/>		
Total de dientes	<input type="text"/>	Tamaño radiográfico de la lesión (mm)	Vert.	<input type="text"/>	Horiz. <input type="text"/>
Vitalometría	Positivo	<input type="checkbox"/>	Negativo	<input type="checkbox"/>	Percusión Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Control después de tratamiento (1 semana)					Fecha <input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Rx control obturación	Adecuado	<input type="checkbox"/>	Inadecuado	<input type="checkbox"/>	
Control después de tratamiento (1 mes)					Fecha <input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Control después de tratamiento (3 meses)					Fecha <input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Tamaño de la lesión (mm)	Vertical	<input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>	
Control después de tratamiento (6 meses)					Fecha <input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Tamaño de la lesión (mm)	Vertical	<input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>	
Control después de tratamiento (12 meses)					Fecha <input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Tamaño de la lesión (mm)	Vertical	<input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>	