



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

**NIVELES DE MIELOPEROXIDASA (MPO) EN LESIONES
PERIAPICALES DE ORIGEN ENDODÓNTICO**

Marcela Bolbarán Gómez.

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
2014

DEDICATORIA

Me gusta creer que aún todo lo sabes, mamá. Esto es para ti...

AGRADECIMIENTOS

A mi abuela, por el cariño incondicional y el apoyo constante.

A mis tíos, Rodrigo y Yesenia, por hacerme parte de su familia y ayudarme a cumplir mis sueños.

A Rocío y Vicente, que con la inocencia que sólo tienen los niños, hacen que todo lo que sucede parezca aún mejor.

A Álvaro, sólo él sabe lo que significa para mí y lo importante que ha sido en todo esto.

A mis amigos de universidad, Carla, Sara, Francisca, Alvaro y Osvaldo; que hicieron de esta etapa algo más que una formación profesional. Sin ustedes todo hubiese sido más difícil y aburrido. Gracias por lo compartido, atesoraré por siempre lo vivido junto a ustedes.

A mis tutores de tesis, Marcela Hernández, Mauricio Garrido y Jocelyn García por haberme integrado en el proyecto y ser una guía y apoyo en este proceso. A Pablo Ahumada, perteneciente al equipo del Laboratorio de Biología Periodontal, por su ayuda en el trabajo experimental de esta investigación.

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	I
LISTA DE ABREVIACIONES	II
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	4
1. Patología Periapical.....	4
2. Periodontitis Apical Asintomática (PAA)	5
3. Respuesta inmuno inflamatoria	6
4. Polimorfonuclear neutrófilo (PMN).....	8
5. Mieloperoxidasa (MPO)	10
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Tipo de estudio	14
2. Obtención y almacenamiento de muestras.....	15
2.1. Lesiones apicales de pacientes con PAA	15
2.2. Tejido apical normal	15
3. Homogeneización de tejidos.....	16
4. Concentración de proteínas.....	16
5. Diagnóstico anátomo patológico.....	17
6. Inmunohistoquímica.....	18
7. Observación de las muestras.....	19
8. Análisis estadístico	19

RESULTADOS	20
1. Determinantes demográficos	20
2. Concentración de proteínas totales (CPT).....	22
3. Niveles de MPO	23
4. Niveles de MPO estandarizados por mg de proteínas totales	24
5. Localización tisular de MPO	25
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	36
Anexo 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación	36
Carta FONDECYT recepción consentimientos informados	37
Anexo 2: Formulario de consentimiento informado	38
Anexo 3: Ficha clínica	41

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Características demográficas de los sujetos en estudio según estado.....	Página 21
Figura 1: Reacción mediada por MPO.....	Página 11
Figura 2: Concentración de proteínas totales en muestras de LS y LPA.....	Página 22
Figura 3: Niveles de MPO estandarizados por ml de homogeneizado en muestras de LS y LPA.....	Página 23
Figura 4: Niveles de MPO estandarizados por mg de proteínas totales en muestras de LS y LPA.....	Página 24
Figura 5: Inmunolocalización de MPO en LS Y LPA.....	Página 25

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado
BCA	Ácido Bicinconínico
CPT	Concentración de Proteínas Totales
FGC	Fluido Gingival Crevicular
GP	Granuloma Periapical
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HCIO	Ácido Hipocloroso
LB	Linfocito B
LPA	Lesión Periapical
LPS	Lipopolisacáridos
LS	Ligamento Periodontal Sano
LT	Linfocito T
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteínasa de Matriz Extracelular
Mø	Macrófago
MPO	Mieloperoxidasa
PAA	Periodontitis Apical Asintomática
PMN	Polimorfonuclear Neutrófilo
QRI	Quiste Radicular Inflamatorio
SCR	Sistema de Canales Radiculares
TIMP	Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas de Matriz Extracelular
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

RESUMEN

Introducción: La Periodontitis Apical Asintomática (PAA) es una patología infecciosa en la que se produce la destrucción del periodonto apical debido a una inflamación crónica local, como respuesta a la infección bacteriana del sistema de canales radiculares (SCR). Se manifiesta como un área radiolúcida apical en ausencia de sintomatología clínica.

La Mieloperoxidasa (MPO) es una enzima que cataliza la formación de ácido hipocloroso (HClO), potente oxidante con rol defensivo contra los agentes infecciosos, sin embargo, puede provocar daño a los tejidos adyacentes. MPO se ha asociado con la pérdida de los tejidos de soporte del diente en enfermedad periodontal marginal y podría participar en la génesis y progresión de las lesiones apicales de origen endodóntico.

Objetivo: Determinar niveles y patrón de localización tisular de MPO en lesiones apicales de origen endodóntico y ligamento periodontal sano.

Metodología: Se obtuvieron muestras de ligamento periodontal sano de premolares de pacientes con indicación de extracción por ortodoncia (n=32) y de lesiones apicales en pacientes con diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática (n=31). Luego, las muestras se procesaron para diagnóstico anatomopatológico de ligamento sano (n=3), granuloma periapical (n=3) y quiste radicular inflamatorio (n=3) e inmunohistoquímica y las muestras restantes se homogeneizaron para determinar la concentración de proteínas totales (CPT) mediante el método BCA y los niveles de MPO mediante plataforma Luminex. Los datos se analizaron estadísticamente con el programa Stata V11.

Resultados: MPO se inmunolocalizó en el infiltrado inflamatorio de granulomas periapicales (GP) y quistes radiculares inflamatorios (QRI). MPO se detectó tanto en lesiones apicales como en tejido sano, sin embargo los niveles de MPO fueron significativamente mayores en las muestras de lesiones apicales en comparación a las muestras de ligamento periodontal sano.

Conclusiones: MPO se encuentra elevada en lesiones apicales de origen endodóntico en asociación con la respuesta inflamatoria local. MPO se asocia con la patogénesis de la PAA y podría jugar un papel central en la destrucción de los tejidos perirradiculares.

Financiamiento: proyecto FONDECYT 1120138.

INTRODUCCIÓN

La Periodontitis Apical Asintomática (PAA) es una patología infecciosa en la que se produce la destrucción del periodonto apical debido a una inflamación crónica local, como respuesta a la infección bacteriana del sistema de canales radiculares (SCR). Se manifiesta como un área radiolúcida apical, en ausencia de sintomatología clínica, la que puede corresponder histológicamente a un quiste radicular inflamatorio (QRI) o a un granuloma periapical (GP) (Katebzadeh N 2000, Nair 2004, AAE 2009, Gutmann J 2009).

En la patogénesis de la PAA existe un balance dinámico entre los agentes irritantes exógenos del SCR y los mecanismos de defensa del hospedero. Entre los mecanismos de defensa del hospedero se encuentran diversos tipos de células, mediadores intercelulares, anticuerpos, metabolitos y moléculas efectoras, sin embargo, si bien éstos no son capaces de eliminar completamente a los agentes patógenos, pueden generar una barrera defensiva circunscrita que previene la diseminación de la infección (Marton and Kiss 2000, Nair 2004).

Entre los elementos celulares participantes en la respuesta inmuno-inflamatoria destacan los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), que liberan sustancias antimicrobianas e inflamatorias cuyo objetivo es controlar la microecología periapical y regular las alteraciones tisulares (Marton and Kiss 2000, Palomo 2009).

Entre los productos enzimáticos liberados por los PMN, la mieloperoxidasa (MPO o peróxido de hidrógeno oxidoreductasa), es un importante componente de los gránulos azurófilos y reacciona con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proveniente de la activación de PMN por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato. Este complejo se combina con el ión cloruro (Cl^-), formando el ácido hipocloroso (HClO), que es un potente oxidante con un rol defensivo contra los agentes infecciosos, aunque también provoca daño a los tejidos adyacentes (García O 1998, Klebanoff 2005, Metzler, Fuchs et al. 2011).

La MPO puede ser liberada dentro de los PMN en el interior del fagosoma, contribuyendo al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos, o hacia el exterior de la célula, provocando daño sobre las células del hospedero y destrucción tisular, participando en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoídea, esclerosis múltiple y periodontitis crónica (Miyasaki K 1997; García O 1998; Klebanoff 2005).

La activación de PMN en los sitios inflamatorios debe estar bien regulada para prevenir el daño tisular injustificado. Sin embargo, existen PMN que exhiben un fenotipo de hiper-respuesta ante los agentes patógenos, esta hiper-reactividad de PMN se asocia con una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno. Se ha descrito que el reclutamiento de PMN hipersensibles al periodonto podría contribuir a la patogénesis de la periodontitis marginal, causando daño tisular oxidativo (Matthews, H.J. et al. 2007).

Se ha evidenciado un desequilibrio oxidante a favor de especies reactivas de oxígeno en lesiones apicales y fluido gingival crevicular (FGC) de dientes con PAA en comparación con los controles sanos y los dientes tratados endodónticamente. La generación de especies reactivas de oxígeno, como el ácido hipocloroso, perturba el equilibrio redox de las células, manteniéndolas en un estado de estrés oxidativo, el cual podría estimular la pérdida ósea apical y el daño de la matriz extracelular del tejido conectivo en enfermedades inflamatorias, participando así en el desarrollo y la progresión de lesiones apicales (Dezerega, Madrid et al. 2012).

Niveles elevados de MPO se han asociado con la pérdida de los tejidos de soporte del diente en periodontitis marginales, (Yamalik N , Hernandez, Gamonal et al. 2010, Meschiari, Marcaccini et al. 2013); sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que relacionen los niveles de MPO con el desarrollo de PAA.

Debido a que la periodontitis marginal y la PAA comparten mecanismos patogénicos similares que resultan en la destrucción de los tejidos de soporte periodontal, entre éstos las especies reactivas de oxígeno y una hiper-reactividad

de PMN, niveles elevados de MPO en el periápice podrían contribuir en la génesis y progresión de PAA.

Así, el objetivo de este estudio es analizar los niveles y el patrón de localización tisular de MPO en lesiones apicales de dientes con diagnóstico de PAA y tejido apical sano con el fin de contribuir a la comprensión de la patogénesis de la PAA y en particular, del papel de la MPO en las lesiones apicales de origen endodóntico.

Los resultados de este estudio podrían contribuir a comprender mejor la etiopatogenia de la PAA e identificación de la MPO como potencial biomarcador para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos complementarios a la práctica clínica endodóntica.

MARCO TEÓRICO

1. Patología Periapical

El tejido apical normal es aquel que posee hueso alveolar intacto alrededor de la raíz, espacio periodontal uniforme y no es sensible a la percusión del diente (AAE 2009). El tejido apical normal puede ser alterado producto de agentes bacterianos que alcanzan la cámara pulpar a través de cavidades de los tejidos duros; una vez que la pulpa ha sido infectada, los microorganismos y sus productos avanzan por el SCR, instalándose un proceso infeccioso que alcanza los tejidos periapicales. En respuesta a la agresión bacteriana se desarrolla un proceso inmuno-inflamatorio, dando origen a las patologías periapicales (Siqueira 2002, Gutmann J 2009) .

La Periodontitis Apical (PA) corresponde a la inflamación y destrucción de los tejidos periapicales de origen infeccioso que compromete el ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar (Nair 2004). De acuerdo a la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) existen cinco entidades de patologías periapicales: 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 síntomas clínicos que incluyen una respuesta dolorosa a la masticación, a la percusión y/o a la palpación. En una visión radiográfica ésta puede o no estar asociada con un área radiolúcida apical (AAE 2009).

La PAA corresponde a la inflamación y destrucción del periodonto apical de origen pulpar que se caracteriza por no presentar sintomatología. Usualmente su hallazgo es radiográfico, observándose una lesión radiolúcida en relación al periápice del diente afectado (AAE 2009).

El AAA es una reacción inflamatoria frente a la infección y necrosis pulpar, caracterizada por un inicio rápido. Los signos clínicos son evidentes, existiendo dolor espontáneo severo, sensibilidad del diente a la percusión y masticación, formación

de pus e inflamación de los tejidos asociados. En una radiografía se puede observar desde un espacio del ligamento periodontal dentro de los rangos normales, hasta una gran radiolucidez apical (AAE 2009, Gutmann J 2009).

El AAC se caracteriza por un inicio gradual, una pequeña o nula molestia y la presencia de fístula. Puede o no existir una zona radiolúcida apical asociada (AAE 2009).

La OC es una lesión radiopaca difusa en el ápice del diente, que representa una reacción ósea localizada frente a un estímulo inflamatorio leve (AAE 2009).

2. Periodontitis Apical Asintomática (PAA)

Inicialmente la pulpa dental es infectada por una microbiota oral autógena, lo que trae como consecuencia su necrosis. La pulpa necrótica proporciona un hábitat selectivo para el establecimiento de una microbiota mixta predominantemente anaerobia. Las especies aisladas con mayor frecuencia a nivel apical del SCR pertenecen a los géneros *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptoestreptococci*, *Eubacterium* y *Campylobacter* (Gomes, Pinheiro et al. 2004, Nair 2004, Siqueira and Rôças 2007).

Al establecerse a nivel apical del SCR, las bacterias toman contacto con el ligamento periodontal a través del foramen apical y foraminas, lo que activa un fenómeno inmuno-inflamatorio e induce daño a los tejidos periapicales (Siqueira and Rôças 2007, Garrido 2011). El daño sobre células del hospedero y/o matriz intercelular del tejido conectivo es causado por las bacterias y sus productos, tales como enzimas, exotoxinas y metabolitos. Además, componentes bacterianos, como el peptidoglicán, ácido teicoico, fimbria, otras proteínas de membrana, cápsula, y lipopolisacáridos, estimulan el desarrollo de una respuesta inmune por parte del hospedero capaz de causar destrucción tisular (Figdor 2007, Siqueira and Rôças 2007).

En la respuesta inmuno-inflamatoria participan diversas clases de células, mediadores intercelulares, anticuerpos y moléculas efectoras, dando como resultado la destrucción de los tejidos periapicales y la formación de una lesión periapical (LPA). Este mecanismo actúa como defensa local, al formar una barrera circunscrita para evitar la invasión bacteriana extrarradicular, pero que también perpetúa la inflamación en el periápice (Marton and Kiss 2000, Siqueira and Rôças 2007).

Histológicamente, la LPA puede ser un granuloma periapical (GP) o un quiste radicular inflamatorio (QRI); cuyo diagnóstico diferencial es anatómo-patológico (Gutmann J 2009). El GP corresponde a tejido de granulación. Está compuesto por fibroblastos, colágeno y células inflamatorias, tales como macrófagos (Mø), polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), linfocitos B (LB), linfocitos T (LT) y mastocitos. Es común encontrar células con capacidad de multiplicación, provenientes de restos epiteliales de Malassez (Carrillo 2007).

El QRI es una lesión inflamatoria crónica compuesta por una cavidad patológica cerrada, revestida por epitelio plano pluriestratificado no queratinizado, derivado de los restos epiteliales de Malassez. Presenta tejido conectivo subyacente que contiene células inflamatorias, principalmente mononucleares, y pequeños vasos sanguíneos (Marton and Kiss 2000, Carrillo 2007).

Mientras se mantenga un balance dinámico entre los mecanismos de defensa del hospedero y los agentes exógenos, tanto la destrucción como la recuperación de los tejidos ocurrirán simultáneamente, manteniéndose la LPA asintomática (Marton and Kiss 2000, Ingle 2002).

3. Respuesta inmuno-inflamatoria

El sistema inmune es parte de los mecanismos biológicos destinados a mantener la integridad estructural y funcional de los individuos y está genéticamente programado para la neutralización y eliminación de agentes infecciosos, células y moléculas extrañas (Palomo 2009).

La respuesta inmune se divide desde un punto de vista funcional en inmunidad innata o inespecífica e inmunidad adquirida o específica. Existe una interacción bidireccional entre estos dos sistemas: el sistema inmune innato funciona como una alerta para el sistema inmune específico y puede determinar el tipo de respuesta adquirida (Barbieri 2005).

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra la infección. Comprende mecanismos inespecíficos compuestos por barreras mecánicas, físicas, químicas y biológicas. Son partícipes de ésta elementos celulares como los PMNs, Mø y células natural killer (NK), así como elementos moleculares. Actúa de manera inmediata, no requiere exposición previa al antígeno, ni se modifica al ser expuesta a éste (Barbieri 2005).

La inmunidad adaptativa es específica y tiene memoria inmunológica, lo que permite al organismo, ante un segundo contacto con el agente infeccioso, presentar una respuesta más rápida e intensa. Según las células involucradas, se divide en inmunidad celular, en la que participan LT, e inmunidad humoral, en la que participan los anticuerpos secretados por LB (Barbieri 2005, Palomo 2009).

La respuesta inmuno-inflamatoria periapical comienza con una fase aguda, en la cual existe un aumento del flujo sanguíneo, lo que conduce a una mayor permeabilidad vascular y formación de exudado. El infiltrado inflamatorio contiene leucocitos, predominantemente PMNs, que migran junto con Mø al tejido afectado (Nair 2000, Nekoofar, Namazikhah et al. 2009). Los PMNs y Mø secretan IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α (Gazivoda 2009) Estas citoquinas intensifican la respuesta vascular local, la reabsorción ósea osteoclástica y la degradación de matriz extracelular (MEC). Por otro lado, los PMNs inician la fagocitosis de los agentes extraños para su posterior degradación (Nair 2004).

Si los microorganismos son momentáneamente neutralizados y recludos al interior del SCR, se producirá una fase crónica, en la cual se observa un infiltrado inflamatorio mixto compuesto por cantidades variables de PMN y células mononucleares (Nair 2000, Nair 2004) En el paso de estado agudo a crónico, los

mecanismos proinflamatorios son controlados mediante las citoquinas inmunorreguladoras (IL-10 y TGF- β) para evitar el daño tisular excesivo (Gazivoda 2009).

La PAA puede permanecer sin cambios radiográficos y asintomática durante largos períodos de tiempo. Si el equilibrio en el ápice es perturbado, favoreciendo el desarrollo de microorganismos, la lesión se agudizará (Nair 2004).

4. Polimorfonuclear neutrófilo (PMN)

Los PMN son las principales células fagocíticas, componentes esenciales del sistema inmune innato. Constituyen la primera línea de defensa inespecífica contra infecciones bacterianas y fúngicas junto con las barreras naturales (Lanza 1998, Barbieri 2005).

Son producidos en la médula ósea a partir de células madre mieloides, por medio del proceso denominado "leucopoyesis". Su vida media es corta, de 8-20 horas en circulación, la que aumenta al ser reclutados en sitios de inflamación donde mueren por apoptosis (Barbieri 2005).

Constituyen, junto con los basófilos y los eosinófilos, la denominada serie granulocítica, un grupo celular con núcleos multilobulados y numerosos gránulos citoplasmáticos, que se clasifican en: gránulos primarios o azurófilos, gránulos secundarios o específicos y gránulos terciarios o secretores (Van Dyke 1990, Diz 2002, Palomo 2009).

Los gránulos azurófilos contienen hidrolasas ácidas, proteasas neutras (elastasa, catepsinas G y D), proteínas catiónicas, mieloperoxidasa (MPO), beta glucuronidasa, fosfatasa ácida, lisozimas y defensinas (Van Dyke 1990, Palomo 2009, Marcaccini 2010).

Los PMNs son altamente especializados, se dirigen hacia los tejidos afectados en respuesta a señales químicas y poseen mecanismos citotóxicos que son capaces de eliminar una amplia gama de patógenos microbianos (Edwards 2005)

La respuesta de los PMNs a la invasión microbiana se puede dividir en:

1. *Adherencia*: Interacción entre moléculas específicas superficiales de los PMNs y su receptor en células endoteliales (Van Dyke 1990).
2. *Quimiotaxis*: Atracción hacia el foco de infección en respuesta a moléculas quimiotácticas específicas (IL-8, factor C5a del complemento (C5a), linfocito T B4 (LTB4), péptidos formilados y factores de activación plaquetaria) (Van Dyke 1990).
3. *Fagocitosis*: El PMN encierra al microorganismo en un fagosoma vía invaginación de la membrana plasmática (Van Dyke 1990, Barbieri 2005),
4. *Actividad microbicida*: Luego de ser fagocitados, los microorganismos son destruidos (Van Dyke 1990).

Durante la fagocitosis se desencadena una serie de reacciones enzimáticas dependientes de energía, generándose un aumento del consumo de oxígeno. Como consecuencia de este proceso metabólico se generan formas reducidas de oxígeno molecular con gran actividad germicida, como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot). (Van Dyke 1990, Diz 2002, Palomo 2009)

A pesar de que los PMNs tienen un rol protector, su acumulación persistente en el sitio de inflamación junto con su estimulación continua va a generar una excesiva liberación de su contenido al espacio extracelular, lo que puede producir trastornos funcionales y daño tisular severo. (Minczykowski 2001, Barbieri 2005)

Los radicales de oxígeno producidos por los PMNs pueden dañar moléculas muy importantes, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. En la degranulación de los PMNs también se liberan enzimas proteolíticas, como la elastasa, que puede hidrolizar diferentes proteínas de la matriz extracelular (elastina, fibronectina y colágeno tipo III y IV) y colagenasa, que es capaz de degradar el colágeno tisular (Barbieri 2005).

Una vez que el PMN cumple su función muere por apoptosis y es eliminado por los Mø para evitar la liberación del contenido citotóxico al medio extracelular. La alteración de la apoptosis de los PMNs se relaciona con daño tisular, debido a que aumenta la liberación de sus productos tóxicos al espacio extracelular, asociándose con la aparición de enfermedades inflamatorias tanto agudas como crónicas (Diz 2002, Gamonal 2010).

Los PMNs participan en el desarrollo de enfermedades inflamatorias como la periodontitis marginal en relación con alteraciones de su número y/o función. En periodontitis marginal el daño tisular se ha asociado con hiper-reactividad de los PMN, por medio de la excesiva generación de radicales de oxígeno y acción de enzimas proteolíticas (Matthews, H.J. et al. 2007). Por lo tanto, los PMNs y particularmente la MPO, podrían estar involucrados en el origen y evolución de la PAA.

5. Mieloperoxidasa (MPO)

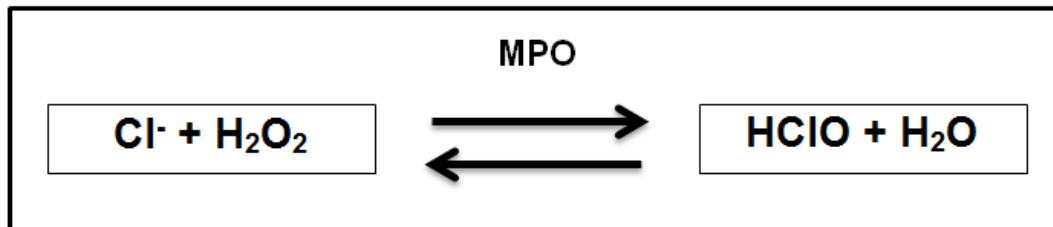
La mieloperoxidasa (MPO, peróxido de hidrógeno oxidorreductasa) es una enzima ampliamente distribuida en el organismo y los PMNs constituyen su fuente fundamental (García, 1998). Ha sido aislada a partir de diferentes fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial y semen, entre otros) y también de diferentes tejidos (corazón, riñón, piel, hígado y placenta, siendo ésta una proteína ubicua (García O 1998, Klebanoff 2005, Roman 2008).

Se considera que la MPO es un constituyente clave del armamento citotóxico de los PMNs, pues es una de las proteína más abundante en estas células y se encuentra localizada a nivel lisosomal, en sus gránulos primarios o azurófilos (Klebanoff 2005).

En los sitios de inflamación, la MPO reacciona con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proveniente de las células fagocitarias activadas frente al contacto con cuerpos extraños, y forma un complejo enzima-sustrato con fuerte capacidad oxidativa (García, 1998). Este complejo se combina con un haluro, generalmente ión cloruro (Cl^-), se oxida y forma ácido hipocloroso (HClO) (**Figura 1**). El HClO es

un potente oxidante y antimicrobiano que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos cuando es liberado en el fagosoma (García O 1998, Klebanoff 2005, Aranda 2012, Cabrera 2012).

Figura 1. Reacción mediada por MPO



(Adaptado (Klebanoff 2005))

Tanto la MPO como el H_2O_2 pueden ser liberados al exterior del PMN, donde también formarán HClO, provocando daño sobre las células del hospedero mediante inactivación de antiproteasas, entrecruzamiento de proteínas y reacción con ácidos grasos saturados para formar clorhidrinas, y por consiguiente destrucción tisular (García O 1998, Klebanoff 2005). Varios procesos patológicos han sido relacionados con el incremento de la actividad de la MPO, lo que estaría asociado con un aumento del riesgo de estrés oxidativo (Dezerega, Madrid et al. 2012). Se ha establecido que la actividad de la MPO está directamente relacionada con el número de PMNs infiltrados en los tejidos. Por esta razón, la actividad de la MPO se utiliza en estudios de inflamación para determinar el índice de migración leucocitaria y por lo tanto el nivel de estrés oxidativo (García 1998).

En las patologías periapicales se desarrolla un proceso inflamatorio que afecta a los tejidos perirradiculares del diente, dicho proceso se encuentra regulado por la actividad proteolítica de diversos mediadores, que incluyen enzimas como las metaloproteínas de matriz extracelular (MMPs), y la actividad de los inhibidores tisulares de las metaloproteínas (TIMPs). La desregulación entre estos elementos ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias (Wang 2007).

Las MMPs son endopeptidasas, dependientes de zinc y calcio que actúan a pH neutro. Son las responsables de la degradación de la mayoría de los componentes de la membrana basal y MEC. Se clasifican según su especificidad de sustrato y estructura en: colagenasas (MMP-1, -8 y -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromelinas (Wang 2007, Hernandez, Gamonal et al. 2010)

El HClO produce la activación oxidativa de colagenasas y gelatinasas latentes y la inactivación de los TIMPs, mediante oxidación del grupo N-terminal. Esto se asociaría con la generación de daño tisular en PAA (Wang 2007, Emingil 2010).

Por los antecedentes expuestos anteriormente, los resultados de este estudio podrían contribuir a comprender mejor la génesis y progresión de la PAA e identificación de la MPO como potencial biomarcador para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos complementarios a la práctica clínica.

HIPÓTESIS

La mieloperoxidasa (MPO) se detecta en niveles mayores en las lesiones de dientes con Periodontitis Apical Asintomática (PAA) en comparación con dientes sin patología periapical.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles y el patrón de localización tisular de MPO en lesiones apicales de origen endodóntico con diagnóstico clínico de PAA y tejido apical sano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la concentración de proteínas totales (CPT) en lesiones apicales de dientes con PAA y en tejido apical sano.

Determinar los niveles de MPO en lesiones apicales de dientes con PAA y en tejido apical sano.

Detectar e inmunolocalizar MPO en lesiones apicales de dientes con PAA y en tejido apical sano.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tipo de estudio

El presente trabajo corresponde a un estudio analítico de casos y controles y es parte de un proyecto financiado por FONDECYT, cuya aprobación tuvo como requisito la aprobación previa del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (**Anexo 1**).

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de tejido apical normal en premolares con indicación de extracción por indicación ortodóncica (controles, n=32) (Dezerega, Madrid et al. 2012) y pacientes con diagnóstico de PAA como consecuencia de necrosis pulpar séptica (casos, n=31), también con indicación de extracción. La exodoncia de los dientes se realizó en la clínica de Cirugía Maxilofacial de 4to Año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Previamente se explicó el procedimiento a los pacientes y entregó un documento con información sobre el proyecto. Se pidió su autorización mediante un consentimiento informado; en caso de ser menores de edad, éstos firmaron su asentimiento y su apoderado la autorización (**Anexo 2**).

El diagnóstico fue determinado mediante anamnesis, examen clínico, examen radiográfico y tests de sensibilidad pulpar y se registró en una ficha elaborada para tal fin (**Anexo 3**). Los criterios de inclusión para el diagnóstico de PAA fueron: respuesta negativa a los tests de sensibilidad pulpar (frío probado con Endo-Ice[®] Hygenic[®] y calor probado con transpoliisopreno) y presencia de lesión radiolúcida periapical mayor a 3 mm al examen radiográfico (Gutmann J 2009). La medición de la lesión fue determinada con el promedio entre su diámetro vertical y horizontal (Dezerega, Madrid et al. 2012).

Para la selección del tejido apical normal, se incluyeron en el estudio premolares sanos asintomáticos y sin alteraciones en el grosor del espacio correspondiente al ligamento periodontal (AAE 2009).

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que recibieron medicación de antibióticos, corticoides o antiinflamatorios en los últimos 3 meses y pacientes con enfermedades sistémicas (Belmar, Pabst et al. 2008).

2. Obtención y almacenamiento de muestras

2.1 Lesiones Apicales de Pacientes con PAA

Con posterioridad a la extracción del diente, éste se lavó 3 veces con suero fisiológico y se retiró la LPA con curetas estériles (Hu-Friedy®) y pinzas y se depositó en microtubos debidamente rotulados. Las muestras fueron trasladadas en cadena de frío hasta su refrigeración a -20°C para ser congeladas hasta su procesamiento (Belmar, Pabst et al. 2008).

Las muestras seleccionadas para diagnóstico anátomo patológico e inmunohistoquímica (n=6) posteriormente a ser lavadas fueron fijadas en formalina tamponada al 10% pH 7.4 y almacenadas a 4° C para su posterior procesamiento.

2.2 Tejido Apical Normal

Posterior a la extracción del diente, éste se lavó 3 veces con suero fisiológico y se retiró el ligamento periodontal mediante curetas estériles (Hu-Friedy®) 2 mm bajo el límite amelocementario y 1mm sobre el ápice medido con sonda periodontal Carolina del Norte (Hu-Friedy®). La muestra se depositó en microtubos debidamente rotulados. Posteriormente fueron trasladadas en cadena de frío hasta su refrigeración a -20°C, para ser congeladas hasta su procesamiento (Belmar, Pabst et al. 2008).

Los dientes extraídos seleccionados para realizar diagnóstico anátomo patológico (n=3) posterior a ser lavados fueron fijados en formalina tamponada al 10% pH 7.4 y almacenados a 4° C para su posterior procesamiento.

3. Homogeneización de tejidos

Tanto las muestras de lesiones apicales de pacientes con PAA como las de ligamento sano fueron lavadas con 1 ml de NaCl 0.9% 3 veces cada una y se secaron con papel filtro para ser pesadas (ADAM ADA-120LC 120GX0, 1MG, Clarkson Laboratory and Supply Inc®, USA). Se les agregó tampón de lisis en relación 1/10 (1mg de tejido: 10 µl tampón); el tampón de lisis utilizado fue: 1 ml Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, 1 ml NaCl 2M 200 µl CaCl₂ 250 nM, 4 µl Tritón x100 25% y agua destilada hasta completar un volumen de 10 ml, al cual se le agregó coctel inhibidor de proteasa libre de EDTA según indicaciones del fabricante (complete Mini, EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Las muestras fueron homogeneizadas en un homogeneizador manual, luego se realizaron 2 centrifugaciones (HERMLE Z 233 MK-2, HERMLE LABORTECHNIK®, Germany), la primera a 4° C 10.000 rpm durante 5 minutos y la segunda a 4° C 1.000 rpm durante 10 minutos. En ambos casos se retiró el sobrenadante, descartando el sedimento. El sobrenadante fue almacenado a -80°C hasta la realización de los ensayos (Dezerega, Madrid et al. 2012).

4. Concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método del Ácido Bicinconínico (BCA). Este método se fundamenta en que en un medio alcalino los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu⁺⁺. Los iones Cu⁺ producidos, se unen a dos moléculas del BCA y al hacerlo, cambia la estructura electrónica de tal manera que el compuesto absorbe luz a 562 nm y se torna de color púrpura. En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteínas totales presente en la muestra.

Para establecer la relación entre la concentración de proteínas presentes en las muestras y la absorbancia, se preparó una curva de calibración que consistió en una serie de diluciones seriadas preparadas a partir de una solución madre de 2µg/ml de albúmina, obteniendo soluciones de concentración conocida. El ensayo se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante, utilizando 2 µl de muestra en

un volumen final de 500 μ l (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A partir de las absorbancias medidas a 562 nm se construyó un gráfica y los valores de absorbancia de las muestras fueron interpolados en la curva, obteniendo así su concentración. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución de las muestras para obtener la concentración final.

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

Para realizar el ensayo, 25 μ l 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 MPO. 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 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-ficoeritrina 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. 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 programa computacional Xponent. Los niveles de MPO fueron obtenidos mediante análisis de los datos por el programa computacional MILLIPLEX® Analyst y expresados en μ g/ml y μ g/mg de proteínas totales.

5. Diagnóstico anátomo patológico

Las muestras que involucraron tejidos duros (dientes) fueron previamente descalcificadas en EDTA e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 4 μ m. A todas las muestras se les realizó procesamiento de rutina y tinción hematoxilina-eosina. El diagnóstico anátomo patológico consideró como ligamento sano cuando

éste se encontró dentro de límites histológicos normales y en ausencia de inflamación. Se realizó el diagnóstico anatomopatológico de ligamento sano (n=3), granuloma periapical (n=3) y quiste radicular inflamatorio (n=3)

6. Inmunohistoquímica

Las muestras fueron desparafinadas e hidratadas en xilol y alcoholes descendentes. Posteriormente se incubaron en peróxido de hidrógeno/metanol 3% por 30 min para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Las muestras se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS HemagenDiagnostics INC®, Maryland usa) 5 min cada vez. Luego se realizó el desenmascaramiento de antígenos con proteínasa K por 6 min (Novocastra®, Lab. Novo, Newcastle, UK) y se repitió, de la misma forma, el lavado.

Para bloquear las uniones inespecíficas las muestras fueron incubadas por 30 min con suero equino en dilución 1:50 en una solución albúmina 2% en PBS (Kit ABC Universal, RTU Vectastain® Kit for laboratory use, Burlingame, CA).

Se agregó anticuerpo monoclonal anti MPO (R&D Systems, Inc®, Minneapolis, MN USA) en concentración 1:100 diluido en PBS y se dejó incubando en cámara húmeda a 4° C durante la noche. Los controles negativos se trataron en ausencia de anticuerpo primario (solución de albúmina 1%).

Para visualizar la reacción, luego de lavar nuevamente las muestras, se utilizó el Kit Vectastain Elite ABC (Mouse IgG) (Vector Lab. Inc., Burlingame, CA) según instrucciones del fabricante. Se agregó el anticuerpo secundario anti IgG biotinilado, luego el complejo avidina / enzima biotinilada y finalmente el sustrato de la peroxidasa, DAB. Por último se realizó la contra tinción con hematoxilina y los preparados se montaron con un medio hidrofílico (Vecta Mount AQ Aqueous Mounting Medium. Vector Lab. Inc., Burlingame, CA).

7. Observación de las muestras

Para observar y fotografiar las muestras se utilizó un microscopio óptico (Zeiss, Axiostar Plus®) conectado a una cámara fotográfica (Zeiss modelo Axiocam Erc5s CMOS).

8. Análisis estadístico

El análisis se realizó mediante el paquete de estadística STATA V.11. 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 los niveles de MPO presentaron distribución no normal, por lo tanto para las comparaciones entre los grupos se utilizó el Test de Mann Whitney.

Para analizar la distribución de género entre los grupos se utilizó χ^2 . Para la evaluación de correlación entre la concentración de MPO y edad en ambos grupos de estudio se utilizó el Test Spearman. Se consideró significación estadística si $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Determinantes demográficos

Las características demográficas se muestran en la **Tabla 1**. La edad fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) en muestras de LPAs en comparación con las muestras de LS. Las edades (media \pm DS) para LS fueron $16,1 \pm 5,3$ años mientras que las de LPA fueron $47,6 \pm 17,3$ años.

Con respecto al género de los pacientes, 24 de éstos correspondieron a mujeres y 39 a hombres. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p > 0,05$). La frecuencia de mujeres en cada grupo fue de 15 y 9 para LS y LPA respectivamente.

En cuanto a la condición de fumadores, 12 de los 63 pacientes eran fumadores. La distribución de individuos fumadores para LS y LPA fue de 4 y 8 respectivamente. No se encontró diferencia significativa respecto de la distribución de fumadores entre LS y LPA ($p > 0,05$).

El nivel educacional para LS y LPA fue enseñanza básica completa y enseñanza media completa respectivamente. Se encontró diferencia significativa ($p = 0,0005$) respecto el nivel educacional entre LS y LPA.

Tabla 1. Características demográficas de los sujetos en estudio según estado

	LS (n=32)	LPA (n=31)	p
Edad (media ± DS)	16,1± 5,3	47, 6 ± 17,3	*<0,0001
Mujeres (n)	15	9	0,145
Fumadores (n)	4	8	0,179
Nivel educacional (mediana)	Básica completa	Media completa	*0,0005

DS: Desviación estándar; LS: Ligamento periodontal sano; LPA: Lesión periapical
***p<0.05**

2. Concentración de Proteínas Totales (CPT)

Se realizó la medición de CPT con el objetivo de determinar y comparar los niveles en muestras de LS y LPA. CPT (**Figura 2**), fue significativamente mayor en LPAs en comparación con las muestras de LS ($p < 0,0001$). Los valores (mediana [recorrido intercuatílico]) para LPAs fueron 7,43 (6,211) mg/ml, mientras que los de LS fueron 2,125 (2,009) mg/ml.

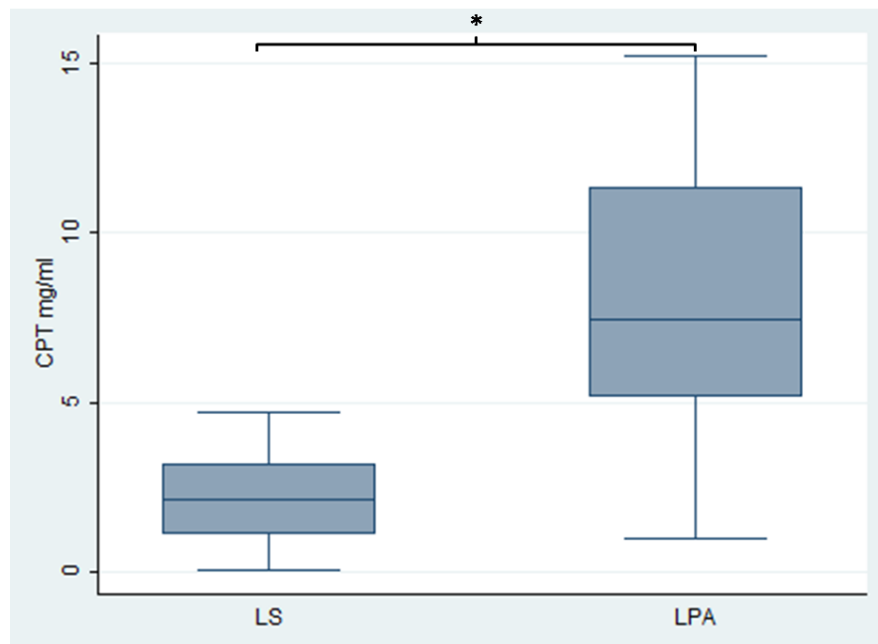


Figura 2. Concentración de proteínas totales en muestras de LS y LPA.

CPT: Concentración de proteínas totales expresadas en mg/ml. LS: Ligamento Periodontal Sano; LPA: Lesión periapical. * $p < 0,0001$

3. Niveles de MPO

Con el objetivo de determinar los niveles de MPO en muestras de LS y LPA se realizó la medición de éstos estandarizados por ml de homogeneizado. Los niveles de MPO estandarizados por ml de homogeneizado (**Figura 3**) fueron significativamente mayores en LPAs con valores (mediana [recorrido intercualítico]) de 95,44 (35,54) ng/ml en comparación con los valores de LS que fueron 73,16 (90,115) ng/ml ($p=0,0022$).

Adicionalmente se analizaron los niveles de MPO respecto de los parámetros demográficos y se encontró que éstos no variaron significativamente respecto al género ($p>0,05$) ni al hábito tabáquico ($p>0,05$) de los sujetos. Además no se encontró correlación de los niveles de MPO y la edad (sanos $r=-0,04$, $p=0,8359$; enfermos $r=0,20$, $p=0,2860$).

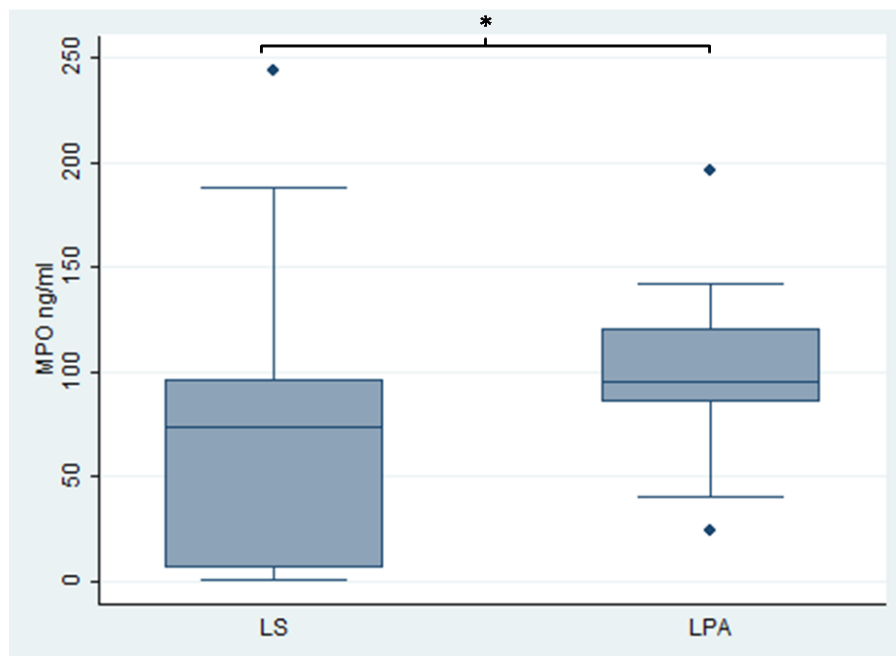


Figura 3. Niveles de MPO estandarizados por ml de homogeneizado en muestras de LS y LPA.

MPO: Concentración de mieloperoxidasa expresada en ng/ml. LS: Ligamento periodontal sano. LPA: Lesión periapical. * $p=0,0022$

4. Niveles de MPO estandarizados por mg de proteínas totales

Con el objetivo de determinar los niveles de MPO en muestras de LS y LPA se realizó la medición de éstos estandarizados por mg de proteínas. Los niveles de MPO estandarizados por mg de proteínas totales (**Figura 4**) no mostraron diferencias significativas entre LPAs con valores (mediana [recorrido intercualítico]) de 13,16 (11,53) ng/mg versus LS 23,68 (37,855) ng/mg ($p > 0,05$).

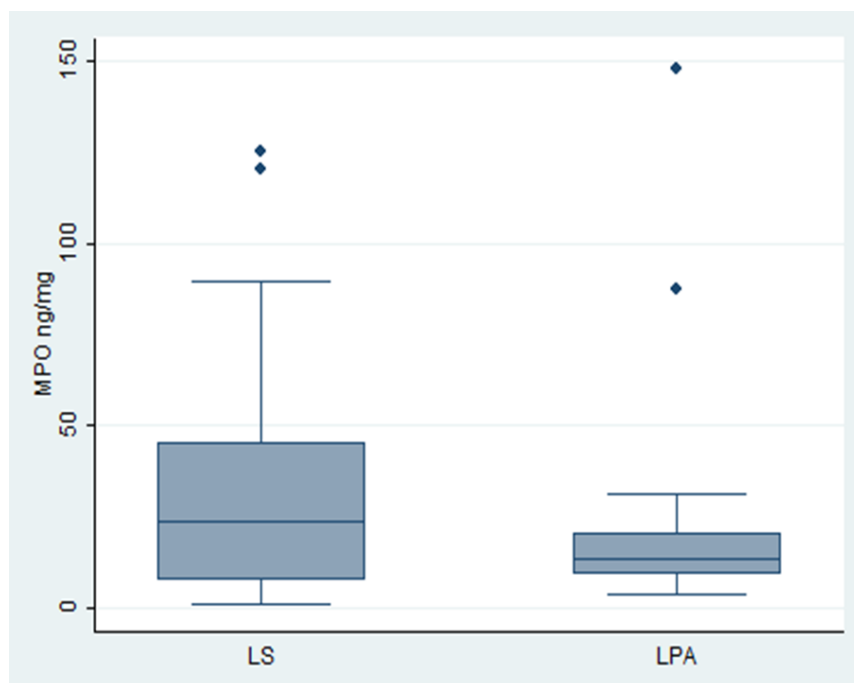


Figura 4. Niveles de MPO estandarizados por mg de proteínas totales en muestras de LS y LPA.

MPO ng/mg: Concentración de mieloperoxidasa estandarizada por milígramo de proteínas totales expresada en ng/mg. LS: Ligamento periodontal sano. LPA: Lesión periapical. $p > 0,05$.

5. Localización tisular de MPO

Con el objetivo de identificar el patrón de localización tisular de la MPO se realizó inmunohistoquímica a muestras de granulomas periapicales, quistes radiculares inflamatorios y ligamento sano. MPO se inmunodetectó (**Figura 5**) en células endoteliales vasculares y en el infiltrado inflamatorio de granulomas periapicales y quistes radiculares inflamatorios, sin embargo, no se detectó inmunopositividad evidente en ligamento sano.

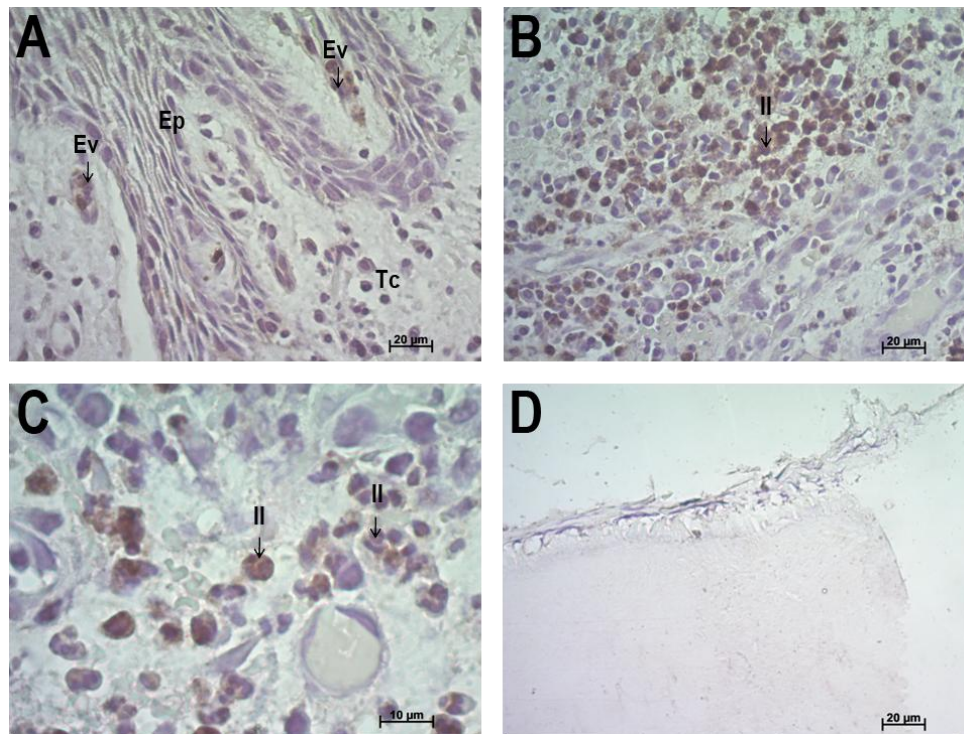


Figura 5. Inmunolocalización de MPO en LS y LPA.

A) Quiste radicular inflamatorio, 40x. B) Granuloma periapical, 40x. C) Granuloma periapical, 100x; D) Ligamento periodontal apical sano, 10x. Ep: Revestimiento epitelial quístico; Tc: Tejido conjuntivo de la cápsula; Ev: Célula endotelial vascular; II: Infiltrado inflamatorio.

Flechas indican células inmunopositivas.

DISCUSIÓN

La PAA es una enfermedad en que se desarrolla una respuesta inmuno-inflamatoria ante un estímulo bacteriano localizado en el SCR que ocasiona la destrucción del tejido periapical del diente y la formación de una LPA, (Nair 2004, AAE 2009). MPO se ha asociado con la pérdida de los tejidos de soporte del diente en enfermedad periodontal marginal (Yamalik N; Hernandez *et al.*, 2010); niveles mayores de MPO en dientes con diagnóstico de PAA en comparación con LS respaldarían el posible rol de la MPO en la génesis y progresión de PAA.

En el presente estudio los niveles de MPO fueron significativamente mayores en homogeneizados de LPAs de dientes con diagnóstico de PAA en comparación con LS, en relación con el proceso inflamatorio crónico local asociado a la LPA. Además, en el presente estudio, la localización tisular de MPO fue confirmada en GP y QRI por inmunohistoquímica. En concordancia con nuestros resultados, estudios previos de nuestro grupo de investigación han evidenciado un aumento de los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con PAA y AAA (Cabrera 2012, Castro 2013). Además, se ha demostrado que existe una disminución significativa de los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con PAA después de la preparación quimio-mecánica y medicación con hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en comparación a los niveles pre-medicación, sugiriendo que debido a sus propiedad bactericida se produciría la disminución de la carga microbiana en el SCR y así, como respuesta, la disminución del infiltrado inflamatorio en los tejidos periapicales, por lo que habría menor presencia de PMNs, disminuyendo la liberación de MPO (Castro 2013).

La MPO es una enzima cuya fuente fundamental la constituyen los PMNs. Estas células del sistema inmune innato, son consideradas la primera línea de defensa contra infecciones (Barbieri 2005). Se dirigen al sitio de infección donde reconocen moléculas específicas en la superficie del invasor para, posteriormente invaginarlo y destruirlo, proceso que se conoce como fagocitosis (Van Dyke 1990). En el presente estudio, si bien encontramos inmunopositividad para MPO en células morfológicamente compatibles con PMN, la encontramos también en otros

leucocitos, tales como plasmocitos, y en células endoteliales vasculares como ha sido descrito (García O 1998).

La MPO, a través de su reacción con H_2O_2 , cataliza la formación de HClO con potente actividad antimicrobiana, que también tienen el potencial de producir daño oxidativo en el tejido del huésped, mediante la modificación de proteínas, lípidos, ADN y ARN, además de provocar disfunciones celulares que estarían implicadas en la patogénesis de diversas enfermedades (Aranda 2012). Niveles elevados de MPO se han asociado con la pérdida de los tejidos de soporte del diente en periodontitis marginales, (Yamalik N , Hernandez, Gamonal et al. 2010, Meschiari, Marcaccini et al. 2013). Además, se ha demostrado que el HClO generado por la MPO produce una inactivación oxidativa de TIMP-1, lo que desregula el equilibrio fisiológico entre MMPs y TIMPs, aumentando la actividad proteolítica y generando daño tisular (Wang 2007). La interrupción de este balance es considerado un paso importante en la destrucción del tejido conectivo, característico de la PAA.

Así también, en este estudio se determinó presencia de MPO también en el grupo control de LS, si bien los niveles fueron significativamente menores podrían deberse a que son necesarios niveles fisiológicos basales para el mantenimiento de la homeostasis del tejido periodontal apical sano. Por otro lado, MPO no se identificó en ligamento periodontal sano mediante inmunohistoquímica, posiblemente debido a la menor sensibilidad de la técnica respecto de los métodos basados en fluorescencia.

Entre las potenciales limitaciones de este estudio, podemos mencionar la diferencia etaria y del nivel educacional entre los grupos. Esto se debe a que la mayoría de las extracciones por indicación ortodóncica se realizan en pacientes jóvenes. Si bien no existen estudios acerca de los niveles de MPO u otros mediadores en ligamento periodontal, en relación con la edad del individuo, la falta de asociación entre los niveles de MPO y la edad de los sujetos sostiene que las diferencias obtenidas se deberían a la PAA. Del mismo modo, la edad del grupo control explicaría el hecho de que cursen hasta la enseñanza básica completa.

Además, el nivel educacional para la mayoría de la población chilena adulta, dentro de la edad promedio para LPA, es enseñanza media completa (INE 2003).

Al considerar el factor tabaquismo, no existieron diferencias significativas entre los grupos, confirmando una distribución homogénea. Este factor es relevante, dado que esta condición podría representar un factor de riesgo para el desarrollo de periodontitis apical (Kirkevang, Vaeth et al. 2007). Además no se encontró relación de este factor con los niveles de MPO, aunque se ha descrito que el humo del tabaco ejerce un importante efecto en la respuesta de los PMN (Barbieri 2005). Se ha descrito un aumento en la producción de H_2O_2 , sustrato de MPO, durante el estallido oxidativo de los neutrófilos expuestos a tabaco *in vitro* (Barbieri 2005). El H_2O_2 se combina con el ión Cl^- , formando HClO, teniendo como consecuencia una mayor destrucción tisular. Así también, se ha reportado que el tabaco contribuye a una predisposición a enfermedades inflamatorias periodontales. (Barbieri 2005, Lordelo 2005, Scott and Krauss 2012).

Con respecto a la CPT, ésta fue significativamente mayor en LPA en comparación con LS. Esta diferencia podría deberse al aumento de los mediadores inflamatorios por activación del sistema inmune, o a un aumento de la concentración de hemoglobina debido a la alta vascularización de las LPAs (Nair 1997, Carrillo 2007, Gazivoda 2009). Por esta razón, sólo se encontró un aumento significativo de los niveles de MPO al estandarizar por ml de homogeneizado; mientras que al estandarizar por mg de proteínas totales las diferencias no fueron significativas. En base a estos datos preliminares, se sugiere que la estandarización por ml de homogeneizado sería el método comparativo más adecuado para el análisis de las muestras.

La caracterización de MPO en LPAs contribuye a la comprensión de la patogenia de estas lesiones y su conocimiento sienta las bases para el desarrollo de métodos menos invasivos y de mayor sensibilidad para el diagnóstico y el monitoreo de LPAs antes, durante y después de la terapia endodóntica. En síntesis, en el presente estudio se observó niveles significativamente mayores de MPO en LPAs de dientes con diagnóstico de PAA en relación a los controles de

LS, sugiriendo que la MPO tendría un rol importante en la patogenia de la PAA. Futuras investigaciones en el área son necesarias para recabar mayor conocimiento acerca de la implicancia de la MPO en el inicio y perpetuación de PAA y los mecanismos involucrados. La detección y evaluación de esta enzima, como potencial biomarcador en LPA podría contribuir en el diagnóstico, evaluación y seguimiento de dientes con PAA.

CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo de investigación se puede concluir:

1. La CPT en homogeneizado de LPA de dientes con diagnóstico de PAA es significativamente mayor que en muestras de LS. Por lo tanto, no sería un método adecuado para la estandarización.
2. Los niveles de MPO son significativamente mayores en LPA en comparación con LS.
3. MPO se identificó en el infiltrado inflamatorio y células vasculares endoteliales de GP y QRI.

REFERENCIAS

AAE (2009). "Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology." J Endod. **35(12)**: 1634.

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.

Barbieri, G., Flores J, Vignoletti F. (2005). "El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal." Av Periodon Implantol **17(1)**: 11-16.

Belmar, M. J., C. Pabst, B. Martínez and M. Hernández (2008). "Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **105(6)**: 801-806.

Cabrera, V. (2012). Niveles de Mieloperoxidasa (MPO) en exudado periapical de dientes con periodontitis apical asintomática (PAA) y absceso apical agudo (AAA). Universidad de Chile.

Carrillo, C., Vera F, Peñarrocha M, Martí E. (2007). "The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **12(8)**: E585-590.

Castro, J. (2013). Niveles de Mieloperoxidasa (MPO) en exudado periapical de dientes con peiodontitis apical asintomática (PAA) medidos pre y post medicación endodóntica con hidróxido de calcio.

Dezerega, A., S. Madrid, V. Mundi, M. A. Valenzuela, M. Garrido, R. Paredes, J. García-Sesnich, A. V. Ortega, J. Gamonal and M. Hernández (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." J Inflamm (Lond) **9(1)**: 8.

Diz, P., Ocampo A, Fernández J. (2002). "Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos." Med Oral **7**: 206-221.

Edwards, S. (2005). Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. London, Cambridge University Press.

Emingil, G., Afacan B, Tervahartiala T, Töz H, Atilla G, Sorsa T. (2010). "GCF and serum myeloperoxidase and matrix metalloproteinase-13 levels in renal transplant patients." Arch Oral Biol **55**(10): 719-727.

Figdor, D., Sundqvist G. (2007). "A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora." Aust Dent J **52**(1 Suppl): S38-51.

Gamonal, J., Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I, Aranda W y cols (2010). "Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey." J Periodontol **81**(10): 1403-1410.

García, O., Pereira N, Flores R. (1998). "Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa." Rev Cubana Invest Biomed **17**(3): 190-197.

García O, P. N., Flores R. (1998). "Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa." Rev Cubana Invest Biomed. **17**(3): 190-197.

Garrido (2011). Asociación entre niveles de TNF en fluido gingival crevicular de dientes con periodontitis apical asintomática. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. **4**: 3.

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." J Oral Pathol Med **38**(7): 605-611.

Gomes, B. P., E. T. Pinheiro, C. R. Gadê-Neto, E. L. Sousa, C. C. Ferraz, A. A. Zaia, F. B. Teixeira and F. J. Souza-Filho (2004). "Microbiological examination of infected dental root canals." Oral Microbiol Immunol **19**(2): 71-76.

Gutmann J, B. J., Gluskin A, Hartwell G, Walton R. (2009). "Identify and define all diagnostic terms for periapical/ periradicular health and disease states." J Endod. **35(12)**: 1658-1674.

Hernandez, M., J. Gamonal, T. Tervahartiala, P. Mantyla, O. Rivera, A. Dezerega, N. Dutzan and T. Sorsa (2010). "Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study." J Periodontol **81(11)**: 1644-1652.

INE (2003). XVII Censo Nacional de Población y VI de Vivienda.

Ingle, J., Bakland L (2002). Endodontics 5th edition. Hamilton, Ontario, B.C. Decker.

Katebzadeh N, S. A., Trope M. (2000). "Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root Canals: an in vivo study." Int Endod J. **33(1)**: 60-66.

Kirkevang, L. L., M. Vaeth, P. Hörsted-Bindslev, G. Bahrami and A. Wenzel (2007). "Risk factors for developing apical periodontitis in a general population." Int Endod J **40(4)**: 290-299.

Klebanoff, S. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." J Leukoc Biol **77(5)**: 598-625.

Klebanoff, S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." J Leukoc Biol **77(5)**: 598-625.

Lanza, F. (1998). "Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency." J Mol Med (Berl) **76(10)**: 676-681.

Lordelo, M. (2005). "El tabaco y su influencia en el periodonto." Avances en Periodondocia **17(1)**: 221-228.

Marcaccini, A., Amato P, Lea˜ o F, Gerlach R, Ferreira J (2010). "Myeloperoxidase activity is increased in gingival crevicular fluid and whole saliva after fixed orthodontic appliance activation." Am J Orthod Dentofacial Orthop **138**(5): 613-616.

Marton, I. J. and C. Kiss (2000). "Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis." Oral Microbiol Immunol **15**(3): 139-150.

Matthews, W. H.J., R. A. and L.-M. N. (2007). "Neutrophil Hyper-responsiveness in Periodontitis." Dent Res **86**: 8.

Meschiari, C. A., A. M. Marcaccini, B. C. Santos Moura, L. R. Zuardi, J. E. Tanus-Santos and R. F. Gerlach (2013). "Salivary MMPs, TIMPs, and MPO levels in periodontal disease patients and controls." Clin Chim Acta **421**: 140-146.

Metzler, K. D., T. A. Fuchs, W. M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, I. Schulze, V. Wahn, V. Papayannopoulos and A. Zychlinsky (2011). "Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity." Blood **117**(3): 953-959.

Minczykowski, A., Woszczyk M, Szczepanik A, Lewandowski L, Wysocki H. (2001). "Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment." Clin Oral Invest **5**(1): 6-10.

Nair, P. (2000). "Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response." Periodontol 2000 **13**: 121-148.

Nair, P. (2004). "Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures." Crit Rev Oral Biol Med **15**(6): 348-381.

Nair, P. N. (1997). "Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response." Periodontol 2000 **13**: 121-148.

Nair, P. N. R. (2004). "Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Causes of Endodontic Failures." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine **15**(6): 348-381.

Nekoofar, M. H., M. S. Namazikhah, M. S. Sheykhrezae, M. M. Mohammadi, A. Kazemi, Z. Aseeley and P. M. Dummer (2009). "pH of pus collected from periapical abscesses." Int Endod J **42**(6): 534-538.

Palomo, I., Ferreira A, Sepúlveda C, Rossemblatt M, Vergara U (2009). Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica. Talca, Chile, Universidad de Talca.

Roman, R., Wendland AE, Polanczyk CA (2008). "Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice." Arq Bras Cardiol **91**(1): 11-19.

Scott, D. A. and J. Krauss (2012). "Neutrophils in periodontal inflammation." Front Oral Biol **15**: 56-83.

Siqueira, J. F. and I. N. Rôças (2007). "Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis." Braz Dent J **18**(4): 267-280.

Siqueira, J. J. (2002). "Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **94**(3): 281-293.

Van Dyke, T., Hoop G. (1990). "Neutrophil Function And Oral Disease." Crit Rev Oral Biol Med **1**(2): 117-133.

Wang, Y., Rosen H, Madtes D, Shao B, Martin T, Heinecke J, y cols. (2007). "Myeloperoxidase Inactivates TIMP-1 by Oxidizing Its N-terminal Cysteine Residue." J Biol Chem **282**(44): 31826–31834.

Yamalik N, C. F., Kilinc K, Kilinc A and Tümer C. "The Importance of Data Presentation Regarding Gingival Crevicular Fluid Myeloperoxidase and Elastase Like Activity in Periodontal Disease and Health Status." J Periodont **71**(3): 460-467.

ANEXOS

ANEXO 1



30/07/2011

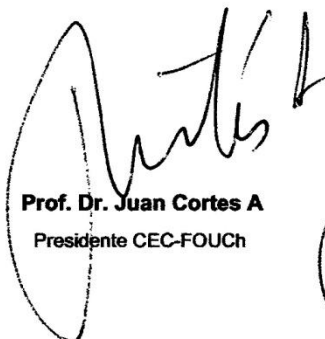
ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Este comité ha considerado que este proyecto no vulnera la dignidad de los sujetos, no constituye una amenaza, ni causa daño emocional ni moral a los investigados.

Se ha garantizado el derecho a la privacidad y al anonimato de los participantes y se ha definido con claridad la cadena de custodia de la información obtenida y las restricciones para su uso por terceros.

En consecuencia, el Comité Ético Científico del Servicio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba por unanimidad de sus miembros el estudio: "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 30/07/2011, bajo la supervisión de la Dra. Marcela Hernández Ríos como Investigador Principal.

Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si fuera necesario.



Prof. Dr. Juan Cortes A
Presidente CEC-FOUCh



c/C.: Investigador Principal. Y Secretaría C.E.C.



Comisión Nacional de Investigación
Científica y Tecnológica - CONICYT

N°018/FONDECYT/ Medicina G1/0514

Santiago, 03 MAY 2012

**Señora
Marcela Hernández Ríos
Investigador Responsable Proyecto FONDECYT N°1120138
Universidad de Chile
Facultad de Odontología
Depto. de Patología
Santos Dumont #964, Edif. Dr. Honorato Cienfuegos
Santiago**

Estimada Sra. Hernández:

Me dirijo a usted para confirmar el recibo de los consentimientos informados de su proyecto FONDECYT N°1120138 aprobados, visados y timbrados por los comités de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Estos antecedentes pasaron a formar parte de su carpeta de proyecto.

Saluda atentamente a Ud.,



La Loreto Martínez Guzmán
MARÍA LORETO MARTÍNEZ GUZMÁN
Presidenta
Consejo Superior de Ciencia
Programa FONDECYT

ERS/pap

ANEXO 2

ED. 30/01/2011

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:



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: mhernandezrios@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, 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 ue toma el consentimiento	Fecha	Firma

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



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: mhermandezrios@gmail.com.

FIRMA IP:

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.

Marcar con

cruz

1. Confirmo 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. Confirmo 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 mis 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 ue toma el consentimiento

Fecha

Firma



ANEXO 3

CLINICAL RECORD

Name _____ Date _____ ID number _____

Gender Female Male

Age (y)

Educational level Básica incompleta (<8a) Básica completa Media completa Superior completa

Systemic diseases Current Former Specify _____

Medical treatment last 6 months Yes No

Periodontitis Yes No Gingivitis Yes No

Current smoker Yes No

Non-HDL cholesterol (mg/dL)

HDL-cholesterol (mg/dL)

Blood pressure (mm/Hg)

Obesity (BMI) (kg/m²)

Hyperglycemia (glucohemoglobin %)

N° of teeth with AAP N° of teeth with dentinal caries

Tooth number Rx lesion size (mm) vertical horizontal

Vitalometry Positive Negative Percussion Yes No

Control after treatment (1 week) Date

Asymptomatic Yes No

Rx filling Adequate Inadequate

Control after treatment (1 month)		Date	<input type="text"/>
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
Control after treatment 3 months		Date	<input type="text"/>
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
Lesion size (mm)	Vertical <input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>
Control after treatment 6 months		Date	
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
Lesion size (mm)	Vertical <input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>
Control after treatment 12 months		Date	<input type="text"/>
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	
Lesion size (mm)	Vertical <input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>

