



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA**

**“NIVELES DE FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)
EN LESIONES PERIAPICALES CONSECUTIVAS A NECROSIS PULPAR Y
LIGAMENTO PERIODONTAL”**

Magdalena Paz Infante Figueroa

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos**

**TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dr. Nicolás Dutzan Muñoz
Asesora: Dra. Ester Montenegro**

FINANCIAMIENTO: FONDECYT 1090461

Santiago-Chile

2011



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA**

**“NIVELES DE FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)
EN LESIONES PERIAPICALES CONSECUTIVAS A NECROSIS PULPAR Y
LIGAMENTO PERIODONTAL”**

Magdalena Paz Infante Figueroa

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos**

**TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dr. Nicolás Dutzan Muñoz
Asesora: Dra. Ester Montenegro**

FINANCIAMIENTO: FONDECYT 1090461

Santiago-Chile

2011

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mis padres, Adela y Rodrigo, y a mis hermanos Catalina Y Bernardo, por el amor y apoyo incondicional que me entregaron durante todos estos años. Por escucharme y alentarme cada vez que lo necesité.

A mis amigos por los inolvidables momentos que compartimos a lo largo de la carrera, en especial a mis amigas, que siempre me escucharon y aconsejaron. A mis amigas del colegio, por toda una vida de amistad incondicional.

A Luis por su compañía, cariño y paciencia infinita, y por entregarme una mirada distinta de las cosas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marcela Hernández por su paciencia y dedicación durante todo el período en que se realizó este trabajo de investigación al guiarme y entregarme sus valiosos conocimientos.

Al Dr. Nicolás Dutzan por su tiempo al corregirme y orientarme cuando lo necesité.

A todo el equipo del Laboratorio de Biología Periodontal, quienes han hecho posible este estudio, enseñándome generosamente el trabajo de laboratorio, en especial a Leslie Henríquez, quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme.

A la Dra. Ester Montenegro por la excelente disposición que tuvo para ayudarme en la recolección de las muestras.

A Verónica Mundi y Constanza Osorio por entregarme su experiencia y conocimientos cada vez que tuve una duda.

ÍNDICE

Introducción	1
1. Periodontitis apical asintomática.....	1
2. Factor de crecimiento vascular endotelial.....	4
2.1 Regulación de VEGF	7
2.2 VEGF en periodontitis apical asintomática	9
Hipótesis	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
Materiales y métodos	12
1. Selección de pacientes	12
2. Preparación de muestras tisulares (homogeneizados)	13
3. Determinación de concentración de proteínas totales	13
4. Determinación de niveles de VEGF	13
5. Análisis estadístico	14
Resultados	15
1. Detección de VEGF	15
2. Niveles de VEGF	15
3. Concentración de proteínas totales y niveles de VEGF estandarizados por concentración de proteínas totales	16
4. Asociación entre VEGF y características generales de los sujetos	17
Discusión	18
Conclusiones	23
Referencias bibliográficas	24
Anexo 1	27
Anexo 2	28

RESUMEN

“Niveles de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) en lesiones periapicales consecutivas a necrosis pulpar y ligamento periodontal”

Introducción

La periodontitis apical asintomática (PAa) corresponde a un cuadro inflamatorio crónico, producido por infecciones intrarradiculares que se desarrolla en el periápice de los dientes, provocando la destrucción del ligamento periodontal y hueso alveolar. VEGF participa en angiogénesis, aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación, fenómenos centrales en la patogenia de las lesiones periapicales (LPAs) durante la PAa. El objetivo de este estudio fue determinar niveles de VEGF en LPAs consecutivas a necrosis pulpar y controles de ligamento periodontal de piezas sanas.

Materiales y Métodos

Se incluyeron sujetos con diagnóstico clínico de PAa e indicación de exodoncia (n=20) y sujetos sanos con indicación de exodoncia por ortodoncia (n=20). Las muestras de lesiones apicales y ligamento periodontal extraídas fueron homogeneizadas. Se determinó la concentración de proteínas totales (CPT) en los homogeneizados tisulares mediante el método del ácido bisciconítico. Los niveles de VEGF se determinaron usando un kit comercial “FlowCytomix”. Los datos fueron analizados mediante el software Stata v.11.1 utilizando test chi cuadrado, test t no pareado, test Mann-Whitney y correlación de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo un $p < 0,05$.

Resultados

Se detectó la presencia de VEGF en el 60% de las lesiones y solo en el 20% de los controles ($p=0,013$). Se encontraron niveles de VEGF significativamente mayores en LPAs en relación con los controles. De modo similar, la CPT fue significativamente mayor en LPAs que en los controles sanos; mientras que los niveles de VEGF estandarizados por CPT no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Conclusiones

VEGF aumenta en LPAs en relación con controles de ligamento periodontal sano y por tanto podría tener un papel importante en el desarrollo y perpetuación de la PAa. Por su parte, la CPT varía entre tejidos sanos y enfermos aumentando significativamente en los últimos, por lo tanto podría no representar un método adecuado de estandarización.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones más frecuentes de la cavidad oral son la caries dental, la gingivitis y la periodontitis. Entre las enfermedades más prevalentes que afectan a los tejidos periodontales están las periodontitis crónica marginal y apical, y representan una de las principales causas de pérdida de dientes ^[1]. Estudios acerca de lesiones periapicales muestran que entre el 75% y el 95% de ellas son consecutivas a una necrosis pulpar ^[2].

1. Periodontitis Apical Asintomática

La periodontitis apical asintomática (PAa) corresponde a un cuadro inflamatorio crónico producido por infecciones intrarradiculares que se desarrolla en el periápice de los dientes ^[3, 4]. Inicialmente la pulpa dentaria se infecta por la flora oral autógena, produciéndose necrosis pulpar. El ambiente endodóntico posee condiciones adecuadas para el desarrollo de flora principalmente anaerobia ^[3, 5]. Los productos bacterianos que actúan como antígenos, se establecen en la región periapical desencadenando una respuesta inflamatoria local del ligamento periodontal que provoca la destrucción de los tejidos perirradiculares y la formación de una lesión periapical ^[4, 6, 7]. El ligamento periodontal corresponde a un tejido conectivo de células altamente especializadas que une el cemento radicular con el hueso alveolar. En el ligamento periodontal apical se desarrollan las primeras manifestaciones de una inflamación de los tejidos extrarradiculares ^[6, 8].

Es por esto que la PAa se considera como una consecuencia del encuentro dinámico entre los microorganismos del canal radicular y la respuesta defensiva del hospedero, que resulta en la activación del sistema inmune innato y adquirido ^[3, 9, 10]. Dicha respuesta defensiva, que representa un intento del organismo por prevenir la propagación de la infección, es incapaz de eliminar los microorganismos alojados en el canal radicular necrótico. Por esta razón, el tratamiento consiste en la eliminación de la infección del conducto radicular y la

prevención de la reinfección mediante el sellado del canal radicular y una adecuada rehabilitación coronaria [3, 11].

El esmalte y la dentina son los tejidos encargados de proteger a la pulpa dentaria de los microorganismos de la cavidad oral. La exposición de la pulpa a las bacterias y sus productos, desencadena una respuesta inflamatoria en dicho tejido [5, 10]. La puerta de entrada de la infección al canal radicular es producida con mayor frecuencia por una ruptura de la continuidad del tejido dentario, como consecuencia de caries dental, procedimientos clínicos, fracturas o cracks dentarios. Los microorganismos también pueden penetrar al canal radicular en dientes con coronas intactas, esto lo pueden hacer desde el surco gingival o sacos periodontales a través de los vasos sanguíneos periodontales, por exposición de túbulos dentinarios a nivel cervical, o por vía anacorética [3, 10, 11].

En términos generales se considera que la flora endodóntica por sí sola posee una baja virulencia, pero existen factores que potencian su propiedades patogénicas y permiten su supervivencia. Entre estos factores se encuentran: la interacción entre diferentes microorganismos desarrollando una relación sinérgica, la habilidad para evadir e interferir en la respuesta del hospedero, la liberación de lipopolisacáridos y otros productos bacterianos, y la síntesis de enzimas capaces de causar daño a los tejidos del hospedero [3, 5].

Este proceso comienza generalmente como una periodontitis apical aguda cuyos síntomas son dolor, sensación de diente elongado, movilidad y molestias a la percusión. Radiográficamente la lesión aún es indetectable o se puede ver como un ensanchamiento del espacio periodontal apical [3, 8]. Durante esta etapa se produce una hiperemia, congestión vascular, edema del ligamento periodontal y extravasación de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), los cuales son atraídos mediante quimiotaxis inducida inicialmente por el daño tisular, productos bacterianos y el sistema del complemento [3]. La prolongación de los irritantes microbianos en la zona produce un cambio en el predominio celular de PMN a macrófagos, linfocitos y células plasmáticas [5, 7]. La persistencia de la respuesta inflamatoria se asocia con una reabsorción del hueso circundante que es

reemplazado por tejido de granulación para dar origen a un granuloma periapical; dicha etapa se caracteriza por ser asintomática y observarse radiográficamente como una zona radiolúcida en relación al ápice dentario [3, 9, 12, 13]. La perpetuación del estímulo inflamatorio, eventualmente puede inducir la proliferación de los restos epiteliales de Malassez y la progresión de la lesión a un quiste radicular inflamatorio [5, 14]. Se considera que el granuloma y el quiste radicular son etapas diferentes del desarrollo del mismo proceso inflamatorio [15]. Se ha descrito que todas las lesiones quísticas son secuela de un granuloma periapical, pero no todas las lesiones crónicas progresarán a un quiste radicular inflamatorio, de hecho se ha determinado en algunos estudios que la incidencia de quistes es menor al 20% del total de casos de PAa [3, 16].

La PAa se caracteriza por presentar un equilibrio dinámico entre la respuesta inmune y la infección bacteriana el cual puede ser interrumpido por uno o más factores que favorezcan a la flora microbiana, lo cual se manifestará como una agudización del proceso evidenciándose por la aparición de sintomatología clínica [3].

Histológicamente, el granuloma periapical se caracteriza por la presencia de tejido de granulación e infiltrado inflamatorio crónico, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, mastocitos, fibroblastos, vasos sanguíneos y ocasionalmente por células epiteliales derivadas de los restos epiteliales de Malassez, células espumosas y cuerpos de Russell [6, 7, 14, 15]. Dentro de los linfocitos las células T predominan sobre las B, siendo los linfocitos T CD4⁺ mayores en número. El tejido conectivo que rodea la lesión está formado por fibras de colágeno denso que se adhieren firmemente a la superficie radicular [3, 4, 10]. El quiste radicular inflamatorio es una lesión que se caracteriza por la presencia de una cavidad patológica totalmente delimitada por epitelio plano pluriestratificado no queratinizado y una cápsula conjuntiva inflamada [7, 17].

Las lesiones periapicales contienen extensas redes capilares formadas mediante un proceso de angiogénesis el cual está regulado por el balance entre varios factores inhibidores y estimulantes. Entre éstos, el factor de crecimiento

vascular endotelial (VEGF), un potente factor proangiogénico ^[6]. La presencia de VEGF en granulomas periapicales con y sin proliferación de epitelio y en quistes radicales se ha determinado en estudios previos utilizando técnicas de inmunohistoquímica ^[18, 19].

2. Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

Los factores de crecimiento son un tipo de moléculas de señalización química sintetizadas por la mayoría de las células de nuestro organismo, las cuales al unirse a un receptor de membrana van a gatillar una cascada intracelular que determinará el comportamiento de dicha célula blanco, produciendo diversos efectos tales como división, diferenciación y migración celular ^[19].

VEGF es una glicoproteína homodimérica que se expresa en tejidos altamente vascularizados ^[20, 21]. La familia de VEGF incluye 7 miembros: VEGF-A, B, C, D, E, F y factor de crecimiento placentario (PlGF). Esta familia está íntimamente relacionada con la regulación del crecimiento y la función del endotelio vascular y linfático en procesos tanto fisiológicos como patológicos del organismo ^[19, 21, 22].

VEGF es producido por diferentes tipos celulares, tales como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales, células endoteliales, osteoblastos y células inflamatorias entre las cuales están los macrófagos, monocitos y linfocitos ^[21, 23-25].

Esta citoquina cumple un rol fundamental en la regulación de las diferentes etapas de la angiogénesis que corresponde a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya formados ^[22, 25, 26]. Este proceso juega un papel esencial en la vascularización en el embrión y en el crecimiento del tejido normal, además de involucrar una serie de eventos coordinados incluyendo la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular que rodea al vaso precursor, la proliferación y migración de células endoteliales y de la pared, y finalmente la formación del lumen para obtener la morfología tubular del vaso sanguíneo que a través de la anastomosis con otros vasos formará una red capilar ^[18, 27-29]. Muchos

factores, proangiogénicos y antiangiogénicos, están involucrados en la regulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos pero no se ha establecido con claridad si participan en procesos patológicos o fisiológicos. Sin embargo diversas investigaciones han demostrado un rol fundamental de VEGF en procesos normales y anormales de angiogénesis [26, 29]. Durante la angiogénesis esta proteína presenta una actividad mitogénica específica sobre células vasculares endoteliales derivadas de arterias, venas y vasos linfáticos, promueve la migración y organización de las células endoteliales en estructuras tubulares, además de favorecer un ambiente prodegradativo de la matriz extracelular que rodea a las células endoteliales ya que induce la expresión de activadores del plasminógeno y colagenasas, lo que facilitaría la migración celular [19, 22, 26, 29]. Recientemente se ha visto que VEGF podría aumentar la sobrevivencia de células endoteliales frente a señales de muerte celular durante la angiogénesis [22]. En consecuencia, VEGF cumple una importante función en condiciones normales durante la embriogénesis, en la etapa de desarrollo y diferenciación de los órganos, participando además en el desarrollo esquelético, en la cicatrización de heridas durante la fase de granulación y en el ciclo reproductivo femenino. Sin embargo, también es un factor importante en varias patologías como el cáncer, la artritis reumatoidea, la psoriasis y diferentes retinopatías, eventos en los cuales la angiogénesis es central [19, 22, 25, 29].

VEGF también es conocido como factor de permeabilidad vascular ya que en condiciones inflamatorias, induce vasodilatación y un aumento de la permeabilidad microvascular provocando extravasación de proteínas plasmáticas, acumulación de fluidos y edema [18, 26, 30]. Además VEGF favorece el aumento del transporte de hexosa en el endotelio vascular, evento relevante debido al aumento de la demanda energética que se produce durante la proliferación de células endoteliales e inflamación [19, 26]. Por otro lado, promueve la quimiotaxis de monocitos, aumenta la adhesión de células natural killer al endotelio vascular y se ha descrito un efecto inhibitorio en la maduración de células presentadoras de antígenos como las células dendríticas [26, 29, 30]. Por otra parte, diversos estudios sugieren que VEGF es indispensable en la regulación de la remodelación ósea ya sea por la inducción de neovascularización o por acciones directas sobre células.

Se ha descrito el efecto directo que tiene VEGF sobre la diferenciación ostoblastos, además se ha visto que induce reclutamiento de osteoclastos y la reabsorción ósea ^[20, 23].

Los receptores de VEGF expresados principalmente en la superficie de células endoteliales son del tipo tirosina kinasa, dentro de esta familia encontramos 3 miembros: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) y VEGFR-3 (Flt-4). VEGF también puede interactuar con correceptores, las neuropilinas y los proteoglicanos de tipo heparán sulfato. Las neuropilinas presentan la proteína a sus receptores aumentado la eficacia de la cascada de señalización, ya que favorecen la unión de VEGF a VEGFR-2. El heparán sulfato, al unirse a VEGF, incrementa su difusión, vida media e interacción con VEGFR. Estos receptores presentan diferentes propiedades de transducción y probablemente median distintas funciones debido a las diversas afinidades que presentan con VEGF ^[19, 23, 29]. Los sitios de unión de baja afinidad se encuentran mayormente en fagocitos mononucleares y están relacionados con los efectos quimiotácticos que ejerce VEGF, mientras que los sitios de unión de alta afinidad están localizados en el endotelio vascular de grandes y pequeños vasos evidenciando que las células endoteliales son el principal blanco de acción de VEGF ^[26]. VEGFR-2, expresado principalmente en células endoteliales, es el más importante en la angiogénesis ya que participa en la proliferación y migración celular y en el aumento de la permeabilidad vascular. La unión a VEGFR-1 induce la migración de fagocitos mononucleares y la respuesta quimiotáctica de PMN, además de favorecer la proteólisis de la matriz extracelular. VEGFR-3 está restringido casi exclusivamente a células endoteliales linfáticas en la etapa adulta, por lo que su activación estimula la mitosis, migración, diferenciación y supervivencia de estas células **(Figura 1)** ^[19, 22, 29].

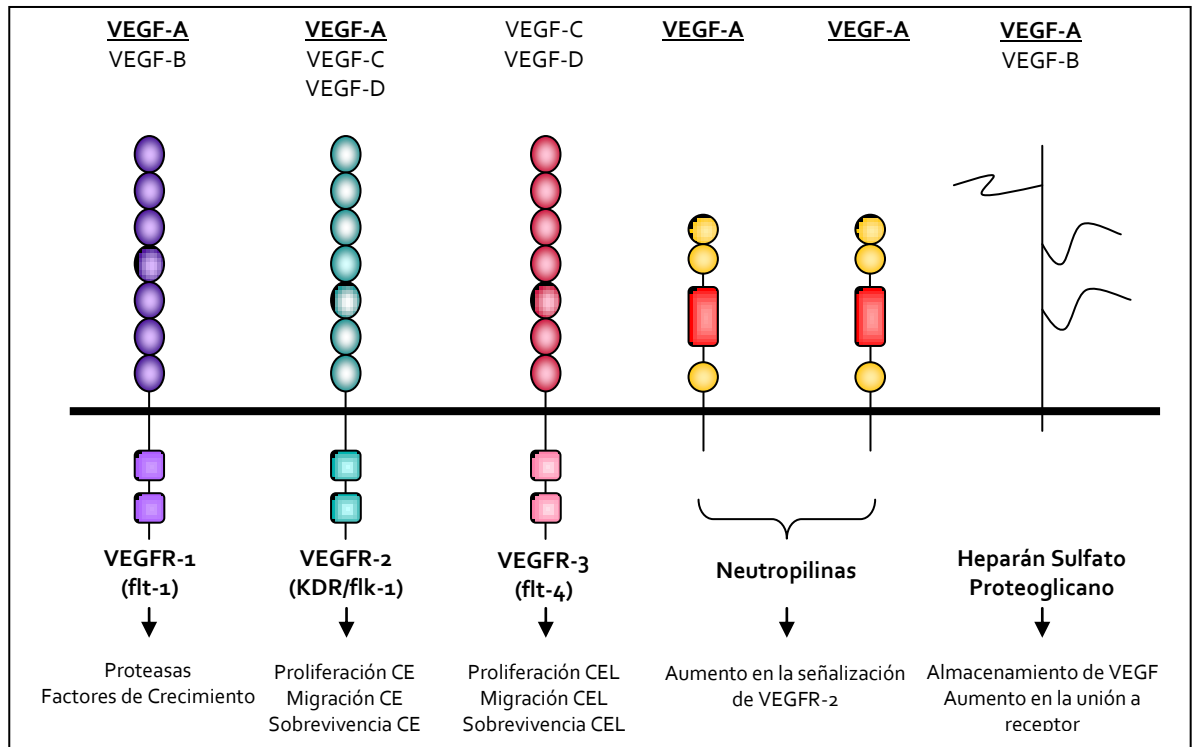


Figura 1. Familia de receptores de VEGF (adaptado de Hoeben et al, 2004). CE: células endoteliales. CEL: células endoteliales linfáticas.

2.1 Regulación de VEGF

La expresión del gen VEGF está regulada por diferentes mecanismos estimulantes e inhibitorios, que se describen a continuación:

Hipoxia

La tensión de oxígeno juega un papel fundamental en la expresión de VEGF. La exposición a un ambiente con baja tensión de oxígeno induce la expresión rápida y reversible de ARNm de VEGF, además de un aumento en su vida media ^[21, 25, 26]. En varios estudios se ha visto el incremento de VEGFR-1 y VEGFR-2 en ambientes hipóxicos ^[29]. En forma opuesta, condiciones normales de tensión de oxígeno disminuyen la producción de VEGF y promueven la regresión de los microvasos recién formados ^[22, 29].

Mediadores inflamatorios

También existe un aumento en la expresión de ARNm de VEGF o estimulación de liberación de la proteína VEGF mediado por diferentes citoquinas o factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina-1 β (Il-1 β), interleuquina-6 (Il-6), factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), ciclooxigenasa-2 (COX-2), prostaglandinas (Pg) y metaloproteínasa de la matriz-9 (MMP-9) entre otros [22, 25, 26, 29, 31]. Algunos de ellos también regulan la expresión de receptores y coreceptores de VEGF [29]. Se ha observado dicho efecto en fibroblastos gingivales y de pulpa humana, aumentando así la expansión de una red vascular que contribuye en parte con la destrucción del tejido pulpar y periapical [19].

Antígenos bacterianos

Lipopolisacáridos (LPS) producidos por bacterias Gram (-) y ácidos lipoteicoicos (LTA) producidos por las bacterias Gram (+) aumentan la expresión de ARNm de VEGF. En estudios previos se encontró que células tipo odontoblasto y macrófagos, en presencia de LPS, aumentan la expresión de VEGF, mientras que en células pulpares indiferenciadas y fibroblastos no se observa el mismo fenómeno. De esto se deduce que este efecto sería propio de determinados tipos celulares [19]. Sin embargo este tema es controversial ya que existen investigaciones que afirman que el LPS sí aumentaría la expresión de VEGF en células pulpares indiferenciadas y fibroblastos [32]. Por su parte LTA induce la expresión de VEGF en células tipo odontoblastos, macrófagos y células pulpares indiferenciadas [19].

Hormonas

Los estrógenos, la progesterona y la testosterona estimulan la transcripción y estabilizan el ARNm de VEGF, aumentando su vida media. Por su parte, los antagonistas de los estrógenos no inhiben la síntesis de VEGF inducida por estrógenos, sino que por el contrario, aumentan su producción. Todos estos factores tienen una implicancia importante en la terapia hormonal del cáncer de mamas [29]. La hormona tiroidea estimula en parte el metabolismo óseo, mediante el aumento en la liberación de VEGF [23].

La sobreexpresión de VEGF participa en la etiología de varias enfermedades caracterizadas por una angiogénesis anormal [26, 30, 33]. Dicha angiogénesis *per se* puede aumentar la severidad del proceso inflamatorio debido al transporte de células inflamatorias, nutrientes y oxígeno al sitio de la inflamación [28].

2.2 VEGF en periodontitis apical asintomática

Se ha detectado VEGF en diferentes tejidos periodontales y en saliva, por lo que se ha postulado que éste juega un rol importante en la mantención de la homeostasis de los tejidos y en la cicatrización de las heridas. Esta macromolécula está sobreexpresada en la mayoría de los tejidos inflamados [26, 30, 33]. Se ha visto que está fuertemente expresado en dientes con diagnóstico de pulpitis irreversible asociado a la inflamación y a reacciones vasculares en relación a la dentinogénesis [28, 32]. Se ha encontrado una elevada expresión de VEGF en liquen plano oral, enfermedad inflamatoria crónica autoinmune [25]. Recientemente, VEGF se ha vinculado con la progresión de gingivitis a periodontitis [28]. Su evaluación en el fluido gingival crevicular ha mostrado que juega un rol clave en la progresión de la enfermedad periodontal ya que sus niveles aumentan notoriamente en presencia de periodontitis en comparación con tejidos sanos, y luego del tratamiento resulta en una disminución de su concentración [33].

Mediante inmunohistoquímica se ha visto que los niveles de VEGF estarían relacionados positivamente con la intensidad de la respuesta inflamatoria de los tejidos, por lo tanto este factor proangiogénico estaría involucrado en la formación y desarrollo de tejido de granulación en lesiones periapicales [24]. VEGF se ha relacionado con el desarrollo y crecimiento de quistes radiculares inflamatorios ya que se ha detectado tanto en el tejido conectivo como en el epitelio que los recubre. Su expresión en el revestimiento epitelial mantiene el estímulo proangiogénico en este tejido y aumenta de la permeabilidad vascular, lo que favorecería la acumulación de fluidos quísticos [18, 24].

Se ha encontrado presencia de VEGF en todas las lesiones periapicales aunque con algunas diferencias en los niveles de inmunoexpresión determinados por las etapas de desarrollo de las lesiones, que se relacionan con el índice angiogénico y la intensidad del infiltrado inflamatorio. En diversos estudios realizados se detectó que en granulomas periapicales sin epitelio casi todas las células inflamatorias presentaron una gran reactividad, en granulomas periapicales con restos epiteliales de Malassez las células inflamatorias presentaron una tinción moderada, mientras que todas las células epiteliales reaccionaron a VEGF, por último en quistes radiculares todas las capas epiteliales presentaron tinción a diferencia del infiltrado inflamatorio que no presentó reacción alguna ^[18, 19, 30]. Esto sugiere que las células inflamatorias y fibroblastos serían los encargados de la síntesis de VEGF en estados tempranos de la formación de la lesión, mientras que durante etapas más tardías las células epiteliales estarían a cargo de esta función ^[24]. Por otra parte, en quistes radiculares residuales se ha encontrado una baja expresión de VEGF debido a la menor inflamación que presentan estos tejidos, probablemente en respuesta al reducido estímulo antigénico existente ^[18].

Niveles elevados de VEGF en lesiones periapicales crónicas, como el granuloma periapical y el quiste radicular inflamatorio podrían estar relacionados con la patogénesis y progresión de las lesiones periapicales. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar los niveles de VEGF en lesiones periapicales consecutivas a necrosis pulpar y controles de ligamento periodontal.

HIPÓTESIS

Los niveles de VEGF son mayores en lesiones periapicales consecutivas a necrosis pulpar que en ligamento periodontal sano.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de VEGF en lesiones periapicales consecutivas a necrosis pulpar y controles de ligamento periodontal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar y comparar niveles de VEGF en lesiones periapicales consecutivas a necrosis pulpar y controles de ligamento periodontal.
2. Determinar la concentración de proteínas totales en muestras de lesiones periapicales y controles.
3. Asociar niveles de VEGF en lesiones periapicales con las características generales de los sujetos de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes

Se seleccionaron sujetos con diagnóstico clínico de PAa (n=20) y sujetos sanos (n=20) que consultaron en las Clínicas de Cirugía y Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y en el Centro de Diagnóstico y Tratamiento (CDT) Dra. Eloísa Díaz respectivamente. La edad promedio de los sujetos fue de $50,1 \pm 17,5$ años en el grupo de PAa y $23,2 \pm 3,8$ años para el grupo control. El grupo de pacientes que presentaban la patología se compuso por un 40% de hombres y un 60% de mujeres, mientras que en el grupo control hubo un 33% de hombres y un 67% de mujeres.

Las lesiones periapicales se obtuvieron a partir de los pacientes con diagnóstico clínico de PAa e indicación de exodoncia. El diagnóstico de PAa se realizó en aquellos sujetos que presentaron uno o más dientes con lesiones periapicales consecutivas a caries detectadas mediante radiografía periapical, con un diámetro promedio mayor a 5 mm, respuesta negativa al test de sensibilidad pulpar y formación radicular completa.

Como controles se seleccionaron pacientes que fueron sometidos a exodoncia de premolares sanos por indicación de ortodoncia y a partir de éstos se obtuvieron los ligamentos periodontales mediante curetaje de la raíz, realizado 3 mm bajo el límite amelocementario y 1 mm sobre el ápice para evitar contaminación con el epitelio de unión y con tejido pulpar respectivamente. Las muestras fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los criterios de exclusión en sujetos con PAa y controles fueron:

- Trauma oclusal.
- Tratamiento con antibióticos, corticoides o AINES en los últimos 6 meses anteriores al estudio.
- Presencia de enfermedades sistémicas tales como diabetes mellitus, inmunodepresiones, artritis reumatoidea y osteoartritis.

Los pacientes se incluyeron en el estudio previa información y aprobación de un consentimiento informado aprobado por los Comités de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y FONDECYT (Anexo 1).

Los antecedentes y datos clínicos de los pacientes fueron registrados en una ficha clínica (Anexo 2).

2. Preparación de muestras tisulares (homogeneizados)

Las muestras de tejido fueron homogeneizadas en una relación peso:volumen de 1 µg de tejido:10 µl de tampón de homogeneización. Las muestras se prepararon con un homogeneizador automático (OMNI International, Kennesaw, USA) en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 5 mM, Tritón X-100 al 0,01% con un cocktail inhibidor de proteasas libre de EDTA, según indicaciones del fabricante (Roche, Basel, Suiza), se centrifugaron a 15.000 g durante 5 minutos a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes que fueron mantenidos a -80°C hasta su posterior análisis.

3. Determinación de concentración de proteínas totales

Se determinó la concentración de proteínas totales (CPT) en los homogeneizados tisulares mediante el método del ácido bicinonínico, según indicaciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Las concentraciones fueron expresadas como mg/mL obtenidas a partir de una curva estándar usando como estándar albúmina sérica de bovino (BSA).

4. Determinación de niveles de VEGF

Los niveles de VEGF en las muestras de tejido se determinaron cuantitativamente mediante un kit "FlowCytomix" (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria) para VEGF-A humano, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los niveles de VEGF se obtuvieron de una curva estándar. Los resultados fueron expresados como pg/mg de proteínas totales y mg de tejido.

5. Análisis estadístico

La determinación de la distribución de los datos se realizó mediante el test Shapiro Wilk. Los datos referentes a la detección/no detección de VEGF en lesiones periapicales y tejido periodontal sano se analizaron mediante el test chi cuadrado. Los niveles de VEGF mostraron una distribución normal por lo tanto se analizaron con test t no pareado y se expresaron como promedio \pm desviación estándar, mientras que su asociación con edad se determinó con correlación de Pearson. Para la evaluación de concentración de proteínas totales se utilizó el test Mann-Whitney, dado que los datos no mostraron una distribución normal, por lo tanto se expresaron como mediana (recorrido intercuartil). Todos los datos obtenidos fueron analizados por medio del software Stata versión 11.1. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Detección de VEGF

Se detectó la presencia de VEGF en 12 de 20 muestras de lesiones periapicales que correspondió al 60% del total de muestras con lesión, y solo en 4 de 20 controles, que representó el 20% de los ligamentos periodontales sanos (**Tabla 1**). Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p=0,013$).

Tabla 1. Detección de VEGF en lesiones periapicales y ligamentos periodontales.

VEGF	Controles (n = 20)	LPAs (n = 20)
n (%)	4 (20%)	12 (60%)

LPAs: lesiones periapicales. Resultados expresados como frecuencias. **$p=0,013$** .

2. Niveles de VEGF

Al analizar los niveles de VEGF expresados por mg de tejido, se encontró que el promedio de VEGF estandarizado por mg de tejido en controles sanos fue de $238,6 \pm 79,5$, mientras que en lesiones periapicales fue de $790,8 \pm 552$, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,035$) (**Gráfico 1**).

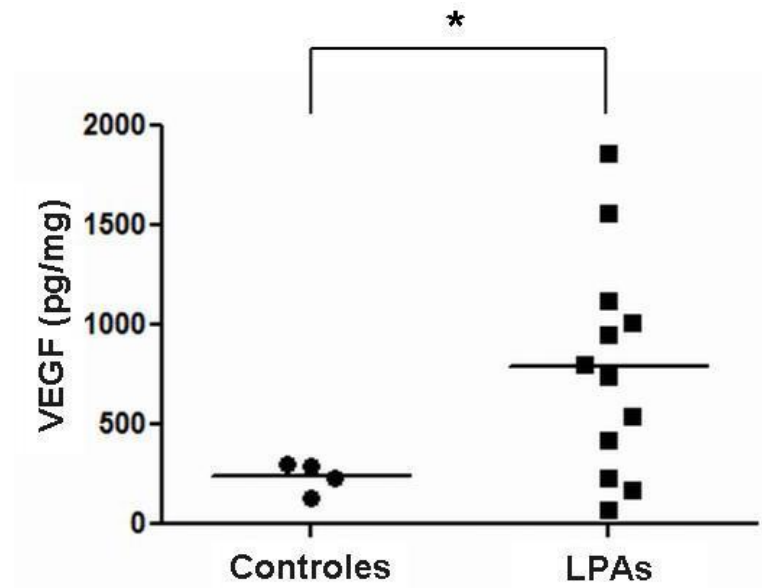


Gráfico 1. Niveles de VEGF en lesiones periapicales y controles.

LPAs: lesiones periapicales. Las líneas representan el promedio de cada grupo.
* $p=0,035$.

3. Concentración de proteínas totales (CPT) y niveles de VEGF estandarizados por concentración de proteínas totales

Con respecto a la CPT, ésta fue significativamente mayor en lesiones periapicales en comparación con las muestras de ligamento periodontal ($p<0,0001$) (**Tabla 2**).

Por otra parte, al estudiar los niveles de VEGF estandarizados por CPT se identificó que la diferencia de los niveles de VEGF en las muestras de lesiones periapicales en comparación con ligamento periodontal sano no fue estadísticamente significativa ($p=0,438$) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Niveles de VEGF y concentración de proteínas totales en lesiones periapicales y controles.

	Controles (n=20)	LPAs (n=20)	P
CPT (mg/mL)	0,3 (0,4)	1,1 (0,5)	<0,0001
VEGF (pg/mgPT)	77,4 ± 26,1	81,9 ± 52,9	0,438

LPAs: lesiones periapicales. PT: proteínas totales. CPT: concentración de proteínas totales. Valores de CPT expresados como mediana (recorrido intercuartil). Valores de VEGF/mg de PT expresados como promedio ± DS.

4. Asociación entre VEGF y características generales de los sujetos

No se encontró correlación entre VEGF y edad, ni entre los niveles de VEGF distribuidos por género ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

La PAa representa una respuesta del hospedero frente a una infección proveniente del sistema de canales radiculares del diente provocando destrucción del ligamento periodontal y hueso alveolar ^[3, 6, 8]. En este estudio se encontraron niveles mayores de VEGF en lesiones periapicales en comparación con ligamento periodontal sano. Es por eso que los resultados del presente estudio apoyan un posible rol de VEGF en la patogénesis de PAa.

Sobre la base de los resultados de este trabajo, la detección de VEGF en lesiones periapicales fue considerablemente mayor en homogeneizados de tejido enfermo en comparación con tejido sano, en relación con la ocurrencia de inflamación y angiogénesis asociadas a las lesiones periapicales. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde se comprobó la presencia de VEGF en lesiones periapicales inflamatorias mediante inmunohistoquímica y se relacionó positivamente con la intensidad del infiltrado inflamatorio de dichas lesiones ^[18, 24, 30]. De modo similar, la determinación de los niveles de VEGF en el presente estudio demostró aumentos significativos en lesiones periapicales con respecto a los controles de ligamento periodontal sano. Estos datos sugieren que VEGF participaría en cuadros patológicos caracterizados por angiogénesis e inflamación, como es el caso de la PAa ^[26, 30, 33]. Por otro lado, diferentes factores que se encuentran característicamente presentes en la patogenia de las lesiones periapicales inducirían un aumento de la expresión de ARNm de VEGF; entre éstos se encuentra la baja en la tensión de oxígeno, la elevada producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células residentes del periodonto apical y leucocitos infiltrantes, y la presencia de productos bacterianos, tales como LPS y LTA ^[3, 14, 19, 21, 26, 34].

En los estados iniciales de PAa el tejido perirradicular perdido, fundamentalmente el tejido óseo, es reemplazado por tejido de granulación ^[3, 9, 12, 13]. Existen antecedentes que demuestran que la expresión elevada de VEGF se asocia con la formación de tejido de granulación anormal en la tráquea luego de traqueotomías prolongadas o intubaciones endotraqueales, por lo cual también

podría estar relacionado con la formación de este tejido en PAa ^[35]. El tejido de granulación se caracteriza por la presencia de una vasta red capilar que se forma mediante el proceso de angiogénesis. La angiogénesis corresponde a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes ^[27]. Este evento está regulado por múltiples factores, entre los cuales VEGF desarrolla un papel fundamental ya que favorece la proliferación, diferenciación y migración de las células vasculares endoteliales ^[26]. VEGF también tiene un efecto proinflamatorio estimulando la vasodilatación, quimiotaxis de monocitos, el aumento de la adhesión de células natural killer al endotelio vascular y el aumento del transporte de hexosa en células endoteliales, cubriendo así el aumento del requerimiento energético que se produce durante la proliferación de células endoteliales e inflamación. Adicionalmente, VEGF favorece el incremento de la permeabilidad vascular, lo que favorece el proceso inflamatorio ^[19, 24, 26, 30]. Dado que todos estos son fenómenos que participan en la patogenia de la PAa y particularmente del desarrollo de un granuloma periapical; los resultados soportan un potencial papel de VEGF en la génesis y progresión de las lesiones periapicales ^[18, 24, 30].

Adicionalmente, VEGF se ha relacionado con el desarrollo y crecimiento del quiste radicular inflamatorio ya que se ha detectado tanto en el tejido conectivo como en el epitelio que lo recubre. Su expresión en el revestimiento epitelial mantiene el estímulo proangiogénico en este tejido y aumenta la permeabilidad vascular, lo que podría contribuir a aumentar el tamaño del quiste radicular inflamatorio, al estimular el ingreso de fluidos al interior de la cavidad quística ^[18, 24]. Diversos estudios han relacionado la presencia de VEGF con el desarrollo y crecimiento de quistes de diferente naturaleza a lo largo de la economía humana ^[31, 36, 37]. Se ha detectado una mayor expresión de VEGF en el fluido quístico de nódulos tiroideos en crecimiento o recurrentes, al compararlos con aquellos en regresión ^[31]. También se ha asociado a la formación y aumento en el tamaño de tumores quísticos cerebrales, debido a la acumulación de fluidos quísticos sumado al incremento en el aporte de oxígeno gracias a la vascularización de los tejidos ^[18, 36].

Aún cuando la diferencia entre los niveles de VEGF de ambos grupos fue significativa, hubo muestras de lesiones periapicales que presentaron niveles de VEGF similares a los encontrados en el grupo control. En diversos estudios se ha descrito que la progresión de PAA no es continua ya que presenta discretos aumentos de actividad seguidos por períodos de estabilidad, lo cual histológicamente implica un cambio en el infiltrado inflamatorio ^[3, 16]. Por otra parte, se ha correlacionado positivamente la intensidad del infiltrado inflamatorio en lesiones, con la detección de VEGF ^[18, 24]. Por lo tanto estos resultados pueden deberse a que dichas muestras de lesiones periapicales presentaron un menor infiltrado inflamatorio, por encontrarse en un estadio distinto de la enfermedad.

En cuanto a la CPT, esta fue significativamente mayor en lesiones periapicales en comparación con ligamento periodontal sano. Es posible que estas diferencias se deban al aumento de los mediadores inflamatorios presentes en las lesiones periapicales, o a un aumento en la concentración de hemoglobina en las muestras de lesiones, debido a que el tejido que compone las lesiones periapicales es altamente vascular, o bien que estas diferencias sean consecuencia de una combinación de ambos eventos ^[3, 38]. Por esta razón solo se encontraron aumentos significativos de VEGF al normalizar por mg de tejido, mientras que al normalizar por mg de proteínas totales las diferencias no fueron significativas. En base a estos datos preliminares, la estandarización por mg de tejido correspondería al método más adecuado para el análisis comparativo de estos tejidos.

A pesar de que no se encontró una correlación entre los niveles de VEGF y la edad de los sujetos en estudio, se observó una marcada diferencia entre las edades promedio de cada grupo, siendo $50,1 \pm 17,5$ años en el grupo de PAA y $23,2 \pm 3,8$ años para el grupo control. Esto es consecuencia de que los pacientes del grupo control tenían indicación de exodoncia por ortodoncia, tratamiento que es realizado con mayor frecuencia en pacientes jóvenes. No existen estudios acerca de las variaciones de VEGF u otros mediadores en relación con la edad en ligamento periodontal. Sin embargo, la falta de asociación entre niveles de VEGF y

la edad de los sujetos en el presente estudio avalan que las diferencias encontradas se deberían al estado de PAa.

Actualmente existen diversas limitaciones en cuanto al diagnóstico de la PAa, el seguimiento y la evaluación de la respuesta al tratamiento endodóntico [39-41]. El diagnóstico y seguimiento de la PAa se basa fundamentalmente en la evaluación clínico-radiográfica [41-43]. Sin embargo existen numerosas limitaciones en relación a la radiografía común, como la obtención de imágenes bidimensionales de una estructura tridimensional y la superposición de estructuras que interfiere con la observación de la lesión radiolúcida [41, 42]. Además, se requieren largos períodos de seguimiento para determinar el éxito del tratamiento endodóntico y la reparación periapical. Para contrarrestar dichas limitaciones se han buscado métodos complementarios para el estudio de las lesiones como la tomografía computarizada, la ecotomografía y el estudio del exudado periapical durante el tratamiento endodóntico [13, 43, 44]; sin embargo, el diagnóstico definitivo solo se puede realizar mediante el estudio anátomo-patológico de la lesión apical [13, 40, 45, 46]. La caracterización de los mediadores de destrucción apical puede conducir al futuro desarrollo de métodos no invasivos y complementarios a la práctica clínica, facilitando la evaluación y manejo clínico de la PAa, además de potenciar el desarrollo de nuevos tratamientos o mejoras en los procedimientos ya existentes [4, 10]. Un conocimiento más acabado de los niveles y funciones de VEGF en PAa podría complementar los métodos de diagnóstico y evaluación de la respuesta de los tejidos periapicales frente al tratamiento endodóntico, representando un potencial biomarcador de esta patología.

La caracterización de los mediadores de destrucción también puede contribuir a establecer nuevas opciones terapéuticas que complementen las ya existentes. Se ha planteado la posibilidad de usar estrategias antiangiogénicas, incluyendo la inhibición específica de VEGF, para el tratamiento de enfermedades dependientes o asociadas a la angiogénesis como es el caso de las enfermedades inflamatorias crónicas. Esto permitiría detener o atenuar la formación de nuevos vasos sanguíneos, aminorando la severidad y previniendo la progresión de esta clase de patologías [22, 25]. Oliveira et al. (2008), en su estudio en ratas, observaron

que el uso de meloxicam, antiinflamatorio no esterooidal inhibidor selectivo de COX-2, disminuiría la expresión de VEGF y por ende la progresión de periodontitis experimental al disminuir la pérdida ósea alveolar ^[33]. Del mismo modo diversos estudios proponen terapias anti-VEGF basadas en el empleo de anticuerpos anti-VEGF o anti-VEGFR-1 y anti-VEGFR-2. Otra forma de inhibir la acción de VEGF es mediante pequeñas moléculas que bloqueen o prevengan la activación de los receptores tirosina kinasa para VEGF. Estas opciones podrían representar una alternativa para el tratamiento de tumores humanos donde se observa una sobreexpresión de VEGF y en consecuencia una elevada angiogénesis. Se especula que algunas de estas terapias serían de baja toxicidad aunque aún no se ha establecido su seguridad ^[26, 29]. De modo similar, la inhibición de la expresión de VEGF podría contribuir a controlar la progresión de la PAa, o bien disminuir el crecimiento del quiste radicular inflamatorio, eventos en los cuales VEGF tendría un rol fundamental ^[18, 24, 30].

En síntesis, en este estudio se observó un aumento significativo de VEGF en lesiones periapicales en relación a los controles de ligamento periodontal sano, sugiriendo que VEGF podría tener un papel importante en la patogenia de la PAa. La realización de nuevos estudios permitirá clarificar el rol de VEGF en el desarrollo y perpetuación de la PAa y los mecanismos involucrados en dichos procesos. La detección y evaluación de los niveles de esta molécula y otros mediadores químicos en lesiones periapicales podría complementar el diagnóstico y seguimiento de la patología periapical; mientras que la inhibición de este factor proangiogénico podría contrarrestar la progresión de la PAa.

CONCLUSIONES

1. Se encontró mayor detección y niveles de VEGF en de lesiones periapicales que en ligamento periodontal sano. Por esta razón VEGF podría tener un papel importante en el desarrollo y perpetuación de la PAa.
2. La CPT varía entre tejidos sanos y enfermos siendo significativamente mayor en el último, por lo tanto podría no representar un método adecuado de estandarización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Takahashi, J., et al., *Dynamics of serum immunoglobulin G avidity for Porphyromonas gingivalis in adult periodontitis*. J Periodontol, 1998. **69**(3): p. 367-73.
2. Ortega, A., et al., *Nonendodontic periapical lesions: a retrospective study in Chile*. Int Endod J, 2007. **40**(5): p. 386-90.
3. Nair, P.N., *Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures*. Crit Rev Oral Biol Med, 2004. **15**(6): p. 348-81.
4. Vernal, R., et al., *RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction*. Oral Dis, 2006. **12**(3): p. 283-9.
5. Stashenko, P., R. Teles, and R. D'Souza, *Periapical inflammatory responses and their modulation*. Crit Rev Oral Biol Med, 1998. **9**(4): p. 498-521.
6. Davey, K.J., et al., *Assessment of vascularity as an index of angiogenesis in periradicular granulomas. Comparison with oral carcinomas and normal tissue counterparts*. Int Endod J, 2008. **41**(11): p. 987-96.
7. Marton, I.J., et al., *Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma*. Oral Microbiol Immunol, 2000. **15**(1): p. 63-5.
8. Gutmann, J.L., et al., *Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states*. J Endod, 2009. **35**(12): p. 1658-74.
9. Ataoglu, T., et al., *Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates*. Int Endod J, 2002. **35**(2): p. 181-5.
10. Silva, T.A., et al., *Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases*. Oral Microbiol Immunol, 2005. **20**(5): p. 310-6.
11. Ricucci, D. and J.F. Siqueira, Jr., *Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures*. J Endod. **36**(1): p. 1-15.
12. Marton, I.J., et al., *The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 1993. **8**(4): p. 254-7.
13. Cotti, E., *Advanced techniques for detecting lesions in bone*. Dent Clin North Am. **54**(2): p. 215-35.
14. Nair, P.N., *Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response*. Periodontol 2000, 1997. **13**: p. 121-48.
15. Walker, K.F., et al., *Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry*. Eur J Oral Sci, 2000. **108**(3): p. 195-201.
16. Liapatas, S., M. Nakou, and D. Rontogianni, *Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study*. Int Endod J, 2003. **36**(7): p. 464-71.
17. Garcia, C.C., et al., *The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2007. **12**(8): p. E585-90.
18. Ruiz, P.A., et al., *Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in radicular and residual radicular cysts*. J Appl Oral Sci. **18**(6): p. 613-20.
19. Grando Mattuella, L., et al., *Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp*. J Endod, 2007. **33**(5): p. 524-30.
20. Tan, Y.Y., et al., *Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on MC3T3-E1*. Orthod Craniofac Res. **13**(4): p. 223-8.
21. Jung, S., et al., *The impact of hyperbaric oxygen therapy on serological values of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF)*. Head Face Med. **6**: p. 29.
22. Polverini, P.J., *Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities*. J Dent Educ, 2002. **66**(8): p. 962-75.

23. Dai, J. and A.B. Rabie, *VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification*. J Dent Res, 2007. **86**(10): p. 937-50.
24. Nonaka, C.F., et al., *Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **106**(6): p. 896-902.
25. Tao, X., et al., *Assessment of local angiogenesis and vascular endothelial growth factor in the patients with atrophic-erosive and reticular oral lichen planus*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. **103**(5): p. 661-9.
26. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
27. Goodwin, A.M., *In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents*. Microvasc Res, 2007. **74**(2-3): p. 172-83.
28. Artese, L., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps*. J Endod, 2002. **28**(1): p. 20-3.
29. Hoeben, A., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(4): p. 549-80.
30. Leonardi, R., et al., *Detection of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in periapical lesions*. J Endod, 2003. **29**(3): p. 180-3.
31. Sato, K., et al., *Increased concentration of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in cyst fluid of enlarging and recurrent thyroid nodules*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(6): p. 1968-73.
32. Botero, T.M., et al., *MAPK signaling is required for LPS-induced VEGF in pulp stem cells*. J Dent Res. **89**(3): p. 264-9.
33. Oliveira, T.M., et al., *COX-2 inhibition decreases VEGF expression and alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats*. J Periodontol, 2008. **79**(6): p. 1062-9.
34. Chavez de Paz, L.E., *Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities*. J Endod, 2007. **33**(6): p. 652-62.
35. Pokharel, R.P., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in exuberant tracheal granulation tissue in children*. J Pathol, 1999. **188**(1): p. 82-6.
36. Vaquero, J., et al., *Expression of vascular permeability factor in craniopharyngioma*. J Neurosurg, 1999. **91**(5): p. 831-4.
37. Strugar, J.G., et al., *Vascular endothelial growth/permeability factor expression in human glioma specimens: correlation with vasogenic brain edema and tumor-associated cysts*. J Neurosurg, 1995. **83**(4): p. 682-9.
38. Beutler, E. and J. Waalen, *The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration?* Blood, 2006. **107**(5): p. 1747-50.
39. Rozylo-Kalinowska, I., *Digital radiography density measurements in differentiation between periapical granulomas and radicular cysts*. Med Sci Monit, 2007. **13 Suppl 1**: p. 129-36.
40. de Paula-Silva, F.W., et al., *Accuracy of periapical radiography and cone-beam computed tomography scans in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard*. J Endod, 2009. **35**(7): p. 1009-12.
41. Burgener, B., et al., *Biologic markers for odontogenic periradicular periodontitis*. J Endod. **36**(8): p. 1307-10.
42. Jorge, E.G., et al., *Detection of periapical lesion development by conventional radiography or computed tomography*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **106**(1): p. e56-61.
43. Low, K.M., et al., *Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery*. J Endod, 2008. **34**(5): p. 557-62.
44. Shimauchi, H., et al., *Development of a quantitative sampling method for periapical exudates from human root canals*. J Endod, 1996. **22**(11): p. 612-5.

45. Caliskan, M.K., *Prognosis of large cyst-like periapical lesions following nonsurgical root canal treatment: a clinical review*. Int Endod J, 2004. **37**(6): p. 408-16.
46. Lin, L.M., G.T. Huang, and P.A. Rosenberg, *Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing*. J Endod, 2007. **33**(8): p. 908-16.

Anexo 1: Formulario de Consentimiento Informado

COMITE ASESOR
 DE BIOÉTICA
FONDECYT

Formulario de Consentimiento Informado Fecha Edición: 04.05.09

Trabajo de Investigación: Caracterización del estado oxidativo y proteólisis apical crónica en el fluido gingival crevicular: ¿una nueva herramienta en la búsqueda de marcadores precoces de pronóstico?

Investigador Responsable: Marcela Hernández Ríos. Dpto. Patología. Facultad de Odontología. Universidad de Chile. Fono 9781808. email:chernandezrios@gmail.com

Presidente del Comité Científico: Dr. Francisco Campos. Fono: 9781701

Antecedentes Generales

Las lesiones periapicales (Periodonitis apical crónica) se producen generalmente como consecuencia de caries dentales. El tratamiento indicado para estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones de esta patología. El propósito del presente estudio es caracterizar posibles mediadores de destrucción tisular asociados a estas lesiones, en estados de enfermedad, reparación y salud. Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura.

Procedimiento

Se incluirán sujetos mayores de 18 años, que en el examen clínico y radiográfico presenten diagnóstico de Periodonitis Apical Crónica. Cuando esté indicado, serán sometidos a diagnóstico, durante el cual se les tomará una muestra de fluido del surco dentario mediante tiras de papel absorbente, antes, una semana después del tratamiento, después de 3 y 6 meses postratamiento y de un diente control. El financiamiento del tratamiento endodóntico será responsabilidad del paciente.

En los pacientes que presenten indicación de extracción dentaria, a las lesiones asociadas se les tomará una biopsia y/o se extirpará el tejido a partir del diente extraído. Tanto la biopsia como la extracción se realizarán en forma gratuita para el paciente. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos ni costos adicionales para el paciente y una vez analizadas serán descartadas. Lo anterior significa que no se harán exámenes genéticos en las muestras.

El total de muestras y datos obtenidos serán almacenadas por el investigador responsable para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio, y no usarán para ningún trabajo futuro. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales. 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, solo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

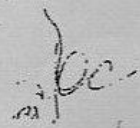
Beneficio

Como beneficio de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les obsequiarán elementos de higiene dental. Además, el diagnóstico de biopsias y radiografías con fines de este estudio no tendrán costo económico.

Declaro

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación.

Identificación Paciente:	Identificación Dentista	Identificación Jefe de Clínica
Nombre	Nombre	Nombre
RUT	RUT	RUT
Teléfono	Teléfono	Teléfono
Firma	Firma	Firma



Anexo 2: Ficha Clínica

NOMBRE:			FECHA		
SEXO:	F	M	EDAD:		
TELÉFONO:					
ANAMNESIS:					
TABAQUISMO	NO	SÍ	Nº		
ENFERMADADES GENERALES	NO	SÍ	CIGARRILLOS/DÍA		
TRATAMIENTOS MÉDICOS			CUÁL		
ACTUALES	NO	SÍ	CUÁL		
O ÚLTIMOS 6 MESES					
EXAMEN CLÍNICO:				SÍ	NO
DIENTE A TRATAR:	+	-	DOLOR		
PERCUSIÓN	NO	SÍ	ESPONTÁNEO		
MOVILIDAD	SÍ	NO	GRADO:		
TRAUMA OCLUSAL					
VESTÍBULO:	FÍSTULA	AUMENTO DE VOLUMEN			
ENROJECIMIENTO					
GINGIVITIS O PERIODONTITIS:	SÍ	NO	VITALOMETRÍA	+	-
CARIES O RESTO RADICULAR	SÍ	NO			
RADIOGRAFÍA:					
TAMAÑO DE LA LESIÓN (MM)	VERTICAL	HORIZONTAL			
DIAGNÓSTICO:					
PRIMER CONTROL (POST-OBTURACIÓN)					
FECHA					
RADIOGRAFÍA:					
TAMAÑO DE LA LESIÓN (MM)					
SIGNOS O SÍNTOMAS	SÍ	NO	PERCUSIÓN	+	-
SEGUNDO CONTROL (3 MESES POST- OBTURACIÓN)					
FECHA					
RADIOGRAFÍA:					
TAMAÑO DE LA LESIÓN (MM)	VERTICAL	HORIZONTAL			
SIGNOS O SÍNTOMAS:	AL	PERCUSIÓN		+	-
TERCER CONTROL: 4 MESES POST- OBTURACIÓN)					