



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

**“Niveles de Mieloperoxidasa (MPO) en exudado periapical  
de dientes con Periodontitis Apical Asintomática (PAA)  
medidos pre y post medicación endodóntica con  
Hidróxido de Calcio”.**

*Josefa Belén Castro Salas.*

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO – DENTISTA

**TUTOR PRINCIPAL**

Prof. Dra. Andrea Dezerega Piwonka.

**TUTORES ASOCIADOS**

Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos.

Prof. Dr. Mauricio Garrido Flores.

**TUTOR EXPERTO**

Jocelyn García Sesnich.

Financiamiento  
FONDECYT 1120138.

Santiago – Chile

2013

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, José y Soledad: por ser la base de todo, por acompañarme sin nunca poner obstáculos, por creer siempre en mí, por hacer mis días cada segundo más gratos, por entregarme su amor y compañía, por ser el pilar de mi vida, por ser los mejores papás.

A mis hermanos, Claudio y Daniela: por compartir juntos cada momento, por su cariño desinteresado, por su ayuda infinita, por ser junto a mis padres mis ejemplos de vida.

A la Panchi: por estar siempre junto a mí, por cuidarme y regalarme su amor incondicional, por ayudarme en todo lo que necesito, por ser mi segunda mamá.

A Ignacio: por ser mi compañero de camino, por ayudarme a conseguir mis objetivos y por estar cumpliendo esta meta juntos, por su amor y cariño, por enseñarme y contagiarme de su bondad, nobleza y humildad.

A mis amigos: por todos los momentos que hemos compartido estos 6 años, por hacer mi paso por la universidad un periodo maravilloso, por su cariño y apoyo siempre.

A mis tutores Andrea Dezerega, Mauricio Garrido, Marcela Hernández y Jocelyn García: por su ayuda durante todo el proceso de elaboración de la tesis, por su amabilidad para resolver mis dudas e inquietudes, por su gran calidad como docentes y personas. Al equipo del laboratorio de Biología Periodontal, por su tiempo y dedicación.

A todos los docentes y funcionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: por tantos momentos inolvidables que viví en la universidad junto a ustedes y por formar parte de mi formación profesional.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	II
LISTA DE ABREVIACIONES.....	III
RESUMEN.....	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b>	
- Patologías periapicales de origen endodóntico .....	3
- Periodontitis Apical Asintomática .....	4
- Aspectos inmunológicos de la PAA.....	6
- Polimorfonuclear Neutrófilo.....	9
- Mieloperoxidasa y Metaloproteinasas en PAA.....	11
- Hidróxido de calcio en el tratamiento de PAA.....	15
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN .....	28
CONCLUSIONES.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
<b>ANEXOS</b>	
- Anexo 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación.....	42
- Anexo 2: Formulario de consentimiento informado.....	43
- Anexo 3: Ficha clínica.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Características de los pacientes seleccionados.....	25
Figura 1: Reacción mediada por Mieloperoxidasa.....	14
Figura 2: Concentración de proteínas totales en µg/ml.....	26
Figura 3: Niveles de MPO en ng/ml.....	27
Figura 4: Niveles de MPO/CPT en ng/ug.....	28

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
AAA.....	Absceso Apical Agudo
AAC.....	Absceso Apical Crónico
Ca(OH) <sub>2</sub> .....	Hidróxido de Calcio
Cl <sup>-</sup> .....	Cloruro
CPT.....	Concentración de Proteínas Totales
ELISA.....	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
GP.....	Granuloma Periapical
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Peróxido de Hidrógeno
HCIO.....	Ácido Hipocloroso
IL.....	Interleuquina
LB.....	Linfocito B
LPA.....	Lesión Periapical
LPS.....	Lipopolisacáridos
LT.....	Linfocito T
MEC.....	Matriz Extracelular
MMP.....	Metaloproteinasa de matriz extracelular
Mø.....	Macrófago
MO.....	Monocito
MPO.....	Mieloperoxidasa
NK.....	Natural Killer
PA.....	Periodontitis Apical
PAA.....	Periodontitis Apical Asintomática
PAS.....	Periodontitis Apical Sintomática
PMCFA.....	Paramonoclorofenol Alcanforado
PMN.....	Polimorfonuclear Neutrófilo
Pre Med.....	Pre Medicación
Post Med.....	Post Medicación
QRI.....	Quiste Radicular Inflamatorio
RANK.....	Receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$
TIMP.....	Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas
TNF.....	Factor de Necrosis Tumoral

## RESUMEN

**Introducción:** La periodontitis apical asintomática (PAA) corresponde a una patología infecciosa generada por la invasión microbiana del sistema de canales radiculares que resulta en la destrucción del periodonto apical. Clínicamente no presenta sintomatología, por lo que usualmente su hallazgo es radiográfico, observándose un área radiolúcida periapical. La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima que cataliza la formación de ácido hipocloroso (HClO) y su presencia ha sido descrita en PAA. El HClO es un potente oxidante con rol defensivo contra los agentes infecciosos y que paralelamente provoca daño a los tejidos adyacentes. Las pastas de hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) son utilizadas como medicación intracanal entre sesiones en el tratamiento endodóntico de dientes con PAA para desinfectar y evitar la reinfección de los canales ya tratados. A la fecha no se ha estudiado el efecto del  $\text{Ca(OH)}_2$  sobre los niveles de MPO en patologías periapicales.

**Objetivo:** Comparar los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con diagnóstico de PAA antes y después de la medicación intracanal con  $\text{Ca(OH)}_2$ .

**Materiales y métodos:** Se seleccionaron 15 pacientes con diagnóstico de PAA e indicación de endodoncia, y se obtuvieron muestras de exudado periapical al inicio del tratamiento y después de dos semanas de medicación con  $\text{Ca(OH)}_2$ . Las muestras fueron eluidas y se les realizó cuantificación de proteínas totales. Para determinar los niveles de MPO se realizó test de ELISA. Los resultados se analizaron con el programa GraphPad PRISM 5.0.

**Resultados:** La concentración de proteínas totales (CPT) y los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con PAA son significativamente mayores previo a la medicación intracanal con  $\text{Ca(OH)}_2$  con respecto a los niveles detectados posterior a dicha medicación.

**Conclusiones:** La medicación intracanal con  $\text{Ca(OH)}_2$  se asocia a una disminución en los niveles de MPO y CPT en exudado periapical de dientes con PAA, sin embargo faltan estudios para determinar la influencia de otros factores como la instrumentación biomecánica y la utilización de irrigantes durante la terapia endodóntica.

## INTRODUCCIÓN

La PAA corresponde a un proceso inflamatorio que conlleva la destrucción de los tejidos periapicales del diente y que se inicia luego de la infección y necrosis pulpar, una vez que los microorganismos han invadido y colonizado el sistema de canales radiculares. Se caracteriza por la ausencia de sintomatología dolorosa y por presentar un área radiolúcida periapical, que puede corresponder a un quiste radicular inflamatorio (QRI) o bien a un granuloma periapical (GP), cuyo diagnóstico diferencial es netamente histopatológico (Katebzadeh, Sigurdsson et al. 2000; Gutmann, Baumgartner et al. 2009).

Dentro de la respuesta inmuno-inflamatoria que desarrolla el hospedero durante la PAA, participan una serie de células entre las cuales se encuentran los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) que constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune innato o inespecífico contra infecciones bacterianas y fúngicas, seguidos por los macrófagos (Mø) y linfocitos (Marton and Kiss 1993).

En los gránulos primarios o azurófilos de los PMN se encuentra una enzima llamada mieloperoxidasa (MPO) que es capaz de catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y cloruro ( $Cl^-$ ) a ácido hipocloroso (HClO), que es un poderoso agente antioxidante que contribuye a la defensa contra microorganismos cuando es liberado dentro del fagosoma del PMN (García Morales, Pereira Roche et al. 1998; Klebanoff 2005). La MPO y  $H_2O_2$  también pueden ser liberados al exterior del PMN, donde reaccionarán con  $Cl^-$  generando HClO el cual puede provocar daño a los tejidos adyacentes y contribuir con la patogénesis de la enfermedad (Klebanoff 2005; Aranda 2012). En estudios anteriores, se ha descrito la presencia de MPO en exudado periapical de dientes con PAA y absceso apical agudo (AAA) (Cabrera 2012).

El tratamiento endodóntico pretende eliminar la mayor cantidad de microorganismos de los canales radiculares y a la vez darles forma adecuada para que posteriormente puedan ser obturados de forma definitiva. Se utilizan pastas como medicación intracanal entre sesiones para lograr la desinfección y evitar la

reinfección de los tejidos y la contaminación de los canales radiculares que ya han sido preparados quimio-mecánicamente (Weiger, Rosendahl et al. 2000). Sin embargo, aún existe controversia respecto al uso de agentes antimicrobianos como medicación entre sesiones del tratamiento con respecto a hacer tratamientos endodónticos en una sola sesión ya que algunos estudios han determinado que no hay diferencia estadísticamente significativa en la reparación de dientes con PAA tratados en una o dos sesiones (Molander, Warfvinge et al. 2007).

Las pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  son las más utilizadas para lograr la desinfección del canal radicular, son llamadas pastas alcalinas por su elevado pH (12,5-12,8) debido a que su principal componente es el polvo de  $\text{Ca(OH)}_2$  el cual se considera una base fuerte. La acción principal del  $\text{Ca(OH)}_2$  se debe a su disociación iónica en  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{OH}^-$ , teniendo efectos en tejidos vitales y microorganismos e induciendo el depósito de tejidos duros (Fava and Saunders 1999; Yassen and Platt 2013).

En estudios anteriores se ha determinado que la utilización de  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicación del sistema de canales radiculares en dientes con patologías apicales o bien entre sesiones de la terapia endodóntica, tiene efecto en la reducción de algunos mediadores de la inflamación como las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) (Paula-Silva, da Silva et al. 2010).

Aún no se ha estudiado si existe variación en los niveles de MPO en dientes con PAA que han sido medicados entre sesiones del tratamiento endodóntico con  $\text{Ca(OH)}_2$ . Por lo tanto, el objetivo de este estudio será comparar los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con diagnóstico de PAA antes y después de la medicación intracanal con  $\text{Ca(OH)}_2$ .



## MARCO TEÓRICO

### **Patologías periapicales de origen endodóntico:**

El tejido periapical normal está compuesto por cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar. Cuando se instalan procesos infecciosos en el sistema de canales radiculares se pierden las condiciones de normalidad y se desencadenan fenómenos inflamatorios como respuesta a la agresión microbiana, dando origen a las patologías periapicales (Glickman 2009).

Los microorganismos pueden alcanzar la cámara pulpar por diferentes rutas, tales como: brechas en los tejidos duros del diente, lesiones cariosas, cracks en la estructura dental resultantes de traumas o procedimientos odontológicos (Nair 1997). Sin embargo, también han sido aisladas bacterias desde pulpas dentales necróticas en dientes con coronas aparentemente intactas (Gomes, Pinheiro et al. 2004), lo que podría desencadenarse a partir de la infección por microorganismos provenientes del surco gingivodentario o saco periodontal que alcanzarían la pulpa a través de vasos sanguíneos del periodonto. Se han estudiado otras vías de infección pulpar como la anacoresis (a través de la circulación sanguínea general) y a través de túbulos dentinarios expuestos a nivel de la raíz del diente debido a gaps en la estructura del cemento dental, así como cracks microscópicos en coronas que parecen intactas y que sirven de portal de ingreso para los microorganismos (Grossman 1967).

Una vez que la pulpa ha sido infectada, los microorganismos y sus productos pueden avanzar por los canales radiculares y alcanzar los tejidos periapicales. Se conoce como Periodontitis Apical (PA) a la inflamación y destrucción de los tejidos perirradiculares causados por agentes etiológicos de origen endodóntico. Una vez que los microorganismos alcanzan la pulpa dental y la infectan, avanzan hasta el sistema de canales radiculares los cuales proveen un hábitat selectivo para el establecimiento de una flora microbiana mixta, predominantemente anaerobia (Nair 2004).

De acuerdo al consenso de la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) las patologías periapicales se dividen en cinco entidades: Absceso Apical Agudo (AAA), Absceso Apical Crónico (AAC), Osteítis Condensante, Periodontitis Apical Sintomática (PAS) y Periodontitis Apical Asintomática (PAA) (Glickman 2009).

### **Periodontitis Apical Asintomática (PAA):**

La PAA corresponde a la inflamación y destrucción del periodonto apical de origen infeccioso. Se caracteriza por la ausencia de sintomatología dolorosa, y radiográficamente se aprecia como una radiolucidez periapical (Gutmann, Baumgartner et al. 2009)

Los factores microbiológicos que causan la infección de los canales radiculares y el daño posterior a los tejidos periapicales, son fundamentales y participan en la iniciación, desarrollo y persistencia de la PAA (Ørstavik and Pitt Ford 1998).

Como consecuencia de la necrosis pulpar, el ambiente del sistema de canales radiculares se transforma en un hábitat favorable para el establecimiento de una flora microbiana mixta, dominada principalmente por anaerobios. Las especies que han sido aisladas con mayor frecuencia de los canales radiculares corresponden a los géneros *Porphyromonas*, *Treponema*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Campylobacter* y *Peptoestreptococci* (Jacinto, Gomes et al. 2003; Siqueira Jr and Rôças 2007).

Los canales radiculares infectados constituyen la fuente principal de agentes microbianos para la irritación persistente sobre los tejidos periapicales. En etapas más tardías de la infección, las bacterias se organizan en biofilms adheridos a las paredes de los canales (Ramachandran Nair 1987), nuevas especies microbianas pueden sumarse al proceso infeccioso y la microbiota endodóntica se vuelve más organizada estructural y espacialmente. A través del foramen apical o foraminas, las bacterias y sus productos pueden alcanzar el

ligamento periodontal, causar daño y desencadenar el proceso inflamatorio periapical (Siqueira Jr and Rôças 2007).

Dentro de los factores bacterianos que pueden causar daño directo sobre los tejidos del hospedero (células y/o matriz intercelular del tejido conectivo), se encuentran productos secretados como enzimas, exotoxinas y productos metabólicos finales. Además, componentes estructurales bacterianos como ácido lipoteicoico, peptidoglicán, flagelos, fimbrias, DNA, exopolisacáridos, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana, entre otros; pueden estimular la activación de la respuesta inmune del hospedero (Siqueira Jr and Rôças 2007) (Figdor and Sundqvist 2007).

Si la presencia de los irritantes microbianos persiste en el tiempo, la lesión puede hacerse crónica sin causar síntomas clínicos marcados para el paciente. Se genera un balance dinámico entre los agentes irritativos exógenos y la respuesta inmune del hospedero, la cual, al no ser capaz de eliminar completamente la infección, monta una respuesta defensiva adyacente al foramen apical formando una barrera circunscrita que previene efectivamente la diseminación futura de la infección (Marton and Kiss 2000; Siqueira 2002).

La reabsorción de hueso alveolar y destrucción de tejidos periapicales alrededor de las raíces del diente afectado, da paso a la formación de una lesión periapical (LPA) que radiográficamente se observa como un área radiolúcida. Las LPA podrían representar una barrera defensiva para evitar la invasión bacteriana de tejidos extraradiculares (Marton and Kiss 2000; Siqueira Jr and Rôças 2007).

Las LPA pueden corresponder a un granuloma periapical (GP) o a un quiste radicular inflamatorio (QRI) y su diagnóstico diferencial es netamente histopatológico (Gutmann, Baumgartner et al. 2009).

El GP corresponde a tejido de granulación rodeado por una cápsula de tejido conectivo fibroso. Se genera una vez que la inflamación se ha vuelto crónica, donde ocurre proliferación de nuevas células, fibras y vasos sanguíneos con el objetivo de reparar la lesión, formándose nuevo tejido conocido como tejido

de granulación. Contiene células inflamatorias como polimorfonucleares neutrófilos (PMN), macrófagos (Mø), linfocitos B (LB) y linfocitos T (LT). Es común encontrar células de restos epiteliales de Malassez, las cuales tienen capacidad latente para proliferar (Carrillo García, Vera Sempere et al. 2007).

El QRI corresponde a una lesión inflamatoria crónica con una cavidad patológica cerrada, revestida de epitelio plano pluriestratificado no queratinizado total o parcialmente. Además presenta tejido conectivo fibroso subyacente y células inflamatorias, principalmente Mø y pequeños vasos sanguíneos. Se puede formar a partir de las células de los restos epiteliales de Malassez que son estimuladas como resultado de la inflamación, antígenos bacterianos, mediadores metabólicos y celulares y factores de crecimiento epidermal (Nair 2004; Carrillo García, Vera Sempere et al. 2007).

La destrucción auto inducida de los tejidos impide la diseminación de la infección, por lo tanto la lesión puede permanecer asintomática de manera indefinida mientras se prolongue el balance dinámico entre la respuesta inmune del hospedero y los agentes irritantes externos (Marton and Kiss 2000; Ingle and Bakland 2002).

### **Aspectos inmunológicos de la PAA:**

La interacción entre los irritantes microbianos y las células defensivas del hospedero resulta en la liberación de una serie de mediadores de la inflamación, que viajan a través del sistema de canales radiculares hasta llegar al periápice y son capaces de iniciar reacciones inmunológicas en los tejidos periapicales, que resultan en la formación de lesiones inflamatorias periapicales. Estas reacciones incluyen respuesta inmune mediada por células (LT y citoquinas) y respuesta inmune humoral a cargo de LB, mediada por anticuerpos (Winter and Harris 1993; Rosa de Sá, Garcia Santos Pimenta et al. 2003).

Durante la inflamación aguda de los tejidos perirradiculares, ocurre dilatación arterial que resulta en un aumento del flujo sanguíneo en el sitio de la infección. Aumenta la permeabilidad vascular, lo que permite que se concentre un infiltrado inflamatorio rico en leucocitos, predominantemente PMNs que migran al tejido afectado junto con MO y Mø (Nekoofar, Namazikhah et al. 2009).

Los PMNs y Mø secretarán citoquinas proinflamatorias las cuales aumentarán la respuesta vascular local, la reabsorción ósea osteoclástica y la degradación de matriz extracelular (MEC) (Gazivoda, Dzopalic et al. 2009).

Las citoquinas corresponden a proteínas solubles que son secretadas de forma transitoria por una gran variedad de células durante la producción de un estímulo. Ellas participan en la proliferación y diferenciación celular, en la actividad microbicida, en la reacción inflamatoria, en la respuesta inmune específica y no específica y en la producción de anticuerpos (Palomo I 2009). Dentro de ellas, encontramos las citoquinas proinflamatorias, encargadas de promover la inflamación en los tejidos y activar la reabsorción ósea; y las citoquinas inmunorreguladoras importantes para los procesos de reparación de los tejidos y regulación negativa de la respuesta inflamatoria (Gazivoda, Dzopalic et al. 2009).

Se ha determinado la presencia de citoquinas proinflamatorias como IL1- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en exudado periapical de dientes con PAA, las cuales participarían de la estimulación de reabsorción ósea durante la formación de LPA (Ataoğlu, Üngör et al. 2002). También ha sido descrita la presencia de IL-6 en estas lesiones, quien estimularía la expresión de proteínas de fase aguda, manteniendo el proceso de reabsorción ósea en LPAs y contribuyendo a la activación de LT y a la proliferación y diferenciación de LB (Radics, Kiss et al. 2003; Rosa de Sá, Garcia Santos Pimenta et al. 2003).

La reabsorción ósea que se genera alrededor de las raíces del diente afectado en la PAA es un proceso de múltiples pasos, donde participan las células osteoclásticas encargadas de la degradación de la matriz ósea orgánica e inorgánica. Se ha determinado la presencia del ligando del receptor activador del

factor nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL) en LPA, quien es expresado por osteoblastos, fibroblastos y LT activados y que juega un rol fundamental en la regulación fisiológica y patológica de la osteoclastogénesis y osteoclastoactivación. Al unirse a RANK en la superficie de preosteoclastos y osteoclastos permite su maduración, activándose el proceso de reabsorción ósea, dando origen a una LPA (Menezes, Bramante et al. 2006; Vernal, Dezerega et al. 2006).

Si los mecanismos de defensa del hospedero son incapaces de erradicar la infección, se generan LPA crónicas. Muchos estudios han descrito el infiltrado inflamatorio de LPA crónicas, los cuales han demostrado que se trata de un infiltrado mixto compuesto de LT, LB, PMNs, MO, Mø, células plasmáticas, células NK y eosinófilos. El objetivo de ellas es restringir la infección y crear una barrera que impida su diseminación al resto de los tejidos (Stashenko, Teles et al. 1998). Las citoquinas inmunoreguladoras (IL-10 y TGF- $\beta$ ) controlan los mecanismos proinflamatorios durante el paso de un estado agudo a crónico, con el fin de evitar la excesiva destrucción de tejidos (Čolić, Gazivoda et al. 2009) y su presencia ha sido descrita en estas lesiones.

El infiltrado inflamatorio constituye aproximadamente el 50% de las células presentes en los GP y el resto corresponde a células no inflamatorias del tejido conectivo como fibroblastos, endotelio vascular, epitelio en proliferación, osteoblastos y osteoclastos. Además, han sido identificadas células T-helper y T-supresoras en muchos estudios donde se ha reportado que las células T-supresoras se encuentran en mayor cantidad con respecto a las T-helper en LPA crónicas, lo cual se ha asociado a que las células T-supresoras podrían servir para moderar la inmunoreactividad excesiva en LPA (Stashenko, Teles et al. 1998).

Es por lo anterior que la PAA puede permanecer sin cambios radiográficos y asintomática durante largos períodos de tiempo. Sin embargo, puede ocurrir también una reagudización de este proceso si los microorganismos o sus productos ubicados al interior del sistema de canales radiculares logran alcanzar nuevamente los tejidos periapicales (Ørstavik and Pitt Ford 1998; Nair 2004).

**Polimorfonuclear Neutrófilo (PMN):**

Los PMNs son leucocitos polimorfonucleares, componentes esenciales del sistema inmune innato. Constituyen un 50-70% del total de células de la serie blanca, por lo que son las principales células fagocíticas encontradas en sangre periférica. Son considerados la primera línea de defensa contra infecciones bacterianas y fúngicas junto con las barreras naturales de la inmunidad innata (Barbieri Petrelli, Flores Guillén et al. 2005).

Poseen una vida media corta, generalmente circulan en el torrente sanguíneo entre 8-20 horas, y si no son reclutados en algún sitio de inflamación, mueren por apoptosis (John I. Ingle 2008). Son producidos en la médula ósea a partir de células madre mieloides pluripotenciales, por medio del proceso de "fagocitopoyesis" (Barbieri Petrelli, Flores Guillén et al. 2005).

Junto con los basófilos y eosinófilos, constituyen la denominada serie granulocítica, un grupo celular con núcleos multilobulados y numerosos gránulos citoplasmáticos, dentro de los cuales encontramos los gránulos primarios o azurófilos (que son los de mayor tamaño), gránulos secundarios o específicos (de menor tamaño pero los más abundantes) y gránulos terciarios o secretores (Van Dyke and Hoop 1990; Dios, Hermida et al. 2002; Palomo I 2009).

Los gránulos primarios son formados durante la fase promielocítica del desarrollo del neutrófilo, y contienen: hidrolasas ácidas, proteasas neutras, defensinas, proteínas catiónicas, lisozimas y MPO. Los gránulos secundarios son formados durante la etapa mielocítica, y contienen: lisozima, lactoferrina y colagenasa (MMP-8 y MMP-9). Mientras que los gránulos terciarios son un subconjunto único de gránulos secundarios que se secretan más fácilmente frente a la estimulación de la célula (Van Dyke and Hoop 1990; Gullberg, Andersson et al. 1997; Palomo I 2009; Marcaccini, Meschiari et al. 2010).

Los PMNs migran al sitio de la infección, abandonando el torrente sanguíneo en respuesta a señales moleculares. Dentro de las células defensivas, los neutrófilos son los primeros en llegar al tejido afectado, seguidos por los Mø y

linfocitos. Para que el PMN llegue desde el capilar sanguíneo hasta la lesión, deben transcurrir una serie de etapas:

1. Marginación: contacto de los PMNs con las paredes endoteliales.
2. Adherencia al endotelio: producto de la interacción entre glucoproteínas superficiales de los neutrófilos y sus receptores en células endoteliales.
3. Diapédesis: migración a través del endotelio mediante la activación de proteínas contráctiles (actina y miosina) y la emisión de pseudópodos del PMN, debido al fenómeno de quimiotaxis.
4. Fagocitosis y muerte celular: PMNs reconocen moléculas específicas en la superficie del agente infeccioso (opsoninas), lo que les permite invaginarlo y destruirlo. En esta etapa actúan enzimas lisosomales que son liberadas en el fagosoma para degradar al microorganismo u otras partículas extrañas. La destrucción del microorganismo se puede producir mediante un mecanismo óxido-dependiente, o bien, óxido-independiente, los cuales generalmente participan en forma sinérgica (Barbieri Petrelli, Flores Guillén et al. 2005; John I. Ingle 2008).

Una vez que el PMN ha fagocitado al cuerpo extraño, se desencadenan una serie de reacciones enzimáticas complejas que requieren un consumo de gran cantidad de oxígeno. Como consecuencia de dicho proceso metabólico, se generan formas reducidas de oxígeno molecular con actividad germicida como anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) (Dios, Hermida et al. 2002).

La mieloperoxidasa (MPO) proveniente de los gránulos primarios de los PMNs, facilita la reacción del  $H_2O_2$  con el anión  $Cl^-$  produciendo ácido hipocloroso (HClO), el cual tiene una potente acción citotóxica junto con los radicales libres de oxígeno (Dios, Hermida et al. 2002).

Las mismas enzimas y agentes que son liberados dentro del fagosoma, pueden ser secretados al espacio extracelular, lo cual contribuye a la destrucción



de bacterias ubicadas en dicho espacio pero también implica un potencial daño a células y tejidos adyacentes del hospedero (Van Dyke and Hoop 1990). En la degranulación de los PMNs también se liberan enzimas proteolíticas como la elastasa, que puede hidrolizar proteínas de la matriz extracelular como elastina, fibronectina y colágeno tipo III y IV. Así como también la colagenasa que es capaz de degradar colágeno tisular (Barbieri Petrelli, Flores Guillén et al. 2005).

Una vez que el neutrófilo ha cumplido su función, muere por apoptosis y es eliminado por Mø para evitar que se libere su contenido citotóxico al medio extracelular. La apoptosis o muerte celular programada juega un papel fundamental en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune del hospedero, así como también en la producción de daño tisular, pues se ha observado que la alteración de este mecanismo se asocia con la aparición de enfermedades inflamatorias tanto agudas como crónicas. En situaciones donde se retrasa el fenómeno de apoptosis de los PMNs, aumentan las posibilidades de destrucción y liberación de sus productos tóxicos al espacio extracelular con el consiguiente daño tisular (Gamonal, Sanz et al. 2003; Barbieri Petrelli, Flores Guillén et al. 2005).

Los PMNs pueden influir en el desarrollo de las enfermedades periodontales al estar disminuidos en número y/o función o bien, al producir daño en los tejidos del hospedero por medio de sus radicales de oxígeno y enzimas proteolíticas (Barbieri Petrelli, Flores Guillén et al. 2005). Por lo anterior, también podrían estar involucrados en el desarrollo de patologías periapicales.

### **Mieloperoxidasa (MPO) y Metaloproteinasas (MMPs) en PAA:**

La MPO figura predominantemente en la acción antimicrobiana de los PMNs, células dominantes en el sistema inmune innato y en la inflamación aguda. El reclutamiento y activación de los PMNs en respuesta a mediadores de la inflamación como LPS bacteriano, citoquinas y factores del complemento, lleva a la adhesión de dichas células a las paredes endoteliales para posteriormente

desencadenar todo el proceso que tiene por finalidad la eliminación de los patógenos en los tejidos afectados (Lau, Mollnau et al. 2005).

Para destruir y degradar microorganismos, los PMNs los ingieren dentro de fagosomas donde se lleva a cabo la liberación de enzimas contenidas en sus gránulos citoplasmáticos. La MPO es una enzima que se encuentra localizada a nivel de los lisosomas ubicados en los gránulos primarios o azurófilos de los PMNs y constituye el 2-5% de las proteínas del neutrófilo (García Morales, Pereira Roche et al. 1998; Lanza 1998; Lau, Mollnau et al. 2005; Hansson, Olsson et al. 2006).

La MPO o peróxido de hidrógeno óxidoreductasa, corresponde a una glicoproteína tetramérica constituida por cuatro subunidades, formando dos homodímeros. Es una proteína fuertemente catiónica, con un pH óptimo de 5 (García Morales, Pereira Roche et al. 1998).

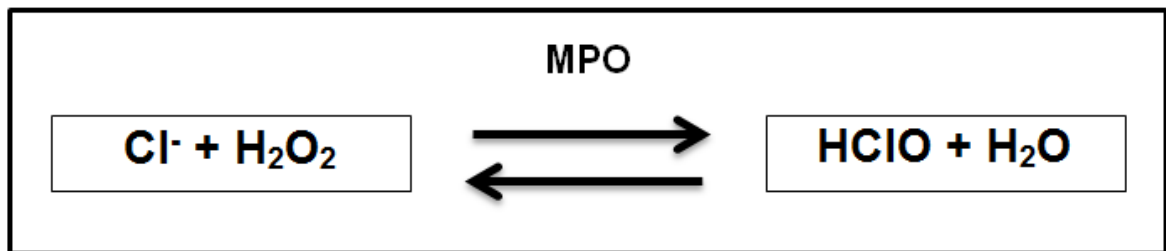
Se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, en algunos fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial y semen) y en diversos tejidos (corazón, riñón, piel, hígado y placenta). Sus fuentes fundamentales son los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y algunos subtipos de macrófagos tisulares, sin embargo, la fuente principal la constituyen los PMNs (Roman, Wendland et al. 2008).

En enfermedades infecciosas e inflamatorias se ha observado el incremento de la actividad de la MPO, lo cual se asocia a un aumento del riesgo al estrés oxidativo. Ocurre un aumento significativo de la actividad de la MPO en directa proporción al número de PMNs infiltrados en el tejido, por lo cual su actividad se puede utilizar como índice de migración leucocitaria y por tanto, de estrés oxidativo (García Morales, Pereira Roche et al. 1998; Lanza 1998; Marcaccini, Amato et al. 2010).

En los sitios de inflamación, MPO reacciona con el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) proveniente de las células fagocitarias activadas al contacto con cuerpos extraños, y forma un complejo enzima-sustrato con fuerte capacidad oxidativa. Dicho complejo se combina con un haluro, generalmente  $Cl^-$ , se oxida y forma

ácido hipocloroso (HClO) (García Morales, Pereira Roche et al. 1998; Klebanoff 2005).

**Figura 1. Reacción mediada por Mieloperoxidasa.**



La MPO y el  $H_2O_2$  también pueden ser liberados al exterior del PMN, elevando el potencial de daño extracelular debido a la producción de HClO (Klebanoff 2005).

El HClO es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra agentes infecciosos, pero también puede actuar sobre células del hospedero inactivando  $\alpha$ -antiproteinasas, entrecruzamientos de proteínas y reacción con ácidos grasos saturados para formar clorhidrinas, lo cual puede desestabilizar las membranas celulares. Es por ello que el HClO puede causar gran parte del daño mediado por neutrófilos en enfermedades inflamatorias (García Morales, Pereira Roche et al. 1998).

Por otra parte, las MMPs son una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc y calcio que funcionan a pH neutro. Son las responsables de la degradación de la mayoría de los componentes de la membrana basal y MEC como el colágeno, fibronectina, laminina, gelatinina y proteoglicanos (Birkedal-Hansen 1993). Son expresadas por diversos tipos celulares, dentro de los cuales se encuentran los queratinocitos, células mesenquimales, células endoteliales y leucocitos. Las MMPs se clasifican de acuerdo a su especificidad de sustrato y estructura en: colagenasas (MMP-1, -8, -13 y -14), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromelisininas (MMP-3, -10 y -11), MMPs asociadas a membrana y otras MMPs

(Leeman, Curran et al. 2002; Wahlgren, Salo et al. 2002; Hernández, Martínez et al. 2007; Paula-Silva, da Silva et al. 2010).

En periodontitis crónica, agresiva y en patologías periapicales se ha observado que la acción sinérgica de MMPs de la familia de las colagenasas y de las gelatinasas resulta en la hidrólisis del colágeno tipo I, principal componente de los tejidos periodontales, por lo cual la acción de dichas MMPs representa un paso esencial durante la progresión de la lesión periodontal. También se ha determinado que las MMP-13, -14, -9 y -2 corresponden a las principales MMPs expresadas por el tejido óseo durante procesos patológicos osteolíticos, como lo que sucede en la PAA durante la formación de las lesiones periapicales (LPA) (Hernández, Martínez et al. 2007; Mundi Burgos, Dezerega Piwonka et al. 2011).

Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) tienen que ver con la regeneración del tejido conectivo, mediante la inhibición de la actividad colagenolítica de las MMPs (Hernández, Martínez et al. 2007). Un desequilibrio entre la actividad proteolítica de las MMPs y la actividad de los TIMPs se relaciona con daño en los tejidos durante la inflamación. Un mecanismo importante para controlar la interacción de los TIMPs con MMPs corresponde al HClO, un potente oxidante producido por la MPO de los PMNs. El HClO inactiva al TIMP-1 mediante la oxidación de la cisteína N-terminal (Wang, Rosen et al. 2007).

Además se ha descrito que la MPO puede producir la activación oxidativa de colagenasas y gelatinasas latentes, además de la inactivación de TIMP-1, lo cual también se asociaría a daño sobre los tejidos (Emingil, Afacan et al. 2010).

Por lo tanto, la MPO en PAA contribuiría a los mecanismos de defensa del hospedero contra la infección, pero también podría contribuir con la producción de daño tisular en la generación de LPAs (García Morales, Pereira Roche et al. 1998; Klebanoff 2005).

### **Hidróxido de Calcio en el tratamiento de PAA:**

La PAA no tiene auto sanación, por lo tanto requiere de un tratamiento que permita eliminar o reducir la población microbiana y así impedir la reinfección de los canales radiculares y tejidos subyacentes. Esto se obtiene mediante la terapia endodóntica, que consiste en una efectiva desinfección, conformación y sellado hermético de los canales, lo que permite la curación de los tejidos periapicales y recuperar el sistema de inserción periodontal (Ørstavik and Pitt Ford 1998; Nair, Henry et al. 2005; Lin and Rosenberg 2011; Aranda 2012).

Si bien el tratamiento endodóntico pretende eliminar completamente los microorganismos del sistema de canales radiculares, estudios han demostrado que la instrumentación e irrigación de los canales reduce significativamente el número de microorganismos, pero no los erradica totalmente. Es por eso que se recomienda la utilización de pastas antibacterianas como medicación intracanal entre sesiones para evitar la reinfección de los tejidos, la contaminación de los canales radiculares que ya han sido instrumentados y combatir a la microbiota persistente dentro de ellos (Weiger, Rosendahl et al. 2000; Molander, Warfvinge et al. 2007).

Las pastas de hidróxido de calcio son las más utilizadas para dicho fin, son llamadas pastas alcalinas por su elevado pH (12,5-12,8) debido a que su principal componente es el polvo de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) el cual se considera una base fuerte. La acción principal del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se debe a su disociación iónica en  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{OH}^-$ , teniendo efectos en tejidos vitales, propiedades antibacterianas e induciendo el depósito de tejidos duros. Sus efectos letales sobre células bacterianas se deben probablemente a la denaturación proteica, al daño en el DNA y en las membranas citoplasmáticas. Tiene un amplio rango de actividad antimicrobiana contra patógenos endodónticos comunes, pero es menos efectivo contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. El *Enterococcus faecalis* es una bacteria asociada a infecciones apicales primarias así como persistentes ya que pueden invadir los túbulos dentinarios y tienen la habilidad de sobrevivir y

tamponar el alto pH producido por el  $\text{Ca(OH)}_2$  (Fava and Saunders 1999; Desai and Chandler 2009; Mohammadi and Dummer 2011; Yassen and Platt 2013).

El polvo de  $\text{Ca(OH)}_2$  puede mezclarse con distintos vehículos, de esa forma se obtendrá una pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  o pasta alcalina, que dependiendo del tipo de vehículo utilizado y de otras sustancias que pueden agregarse (como elementos de contraste radiográfico, antibióticos, entre otros), tendrá diferentes propiedades como consistencia, fluidez, viscosidad, etc (Fava and Saunders 1999).

Hay 3 tipos de vehículos utilizados: acuosos, viscosos y oleosos. Dentro de los acuosos encontramos agua, suero, agua destilada, solución de anestésico dental con o sin vasoconstrictor, solución de detergente aniónico, metilcelulosa, entre otros. En las pastas con vehículo acuoso los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{OH}^-$  son rápidamente liberados, presentan un alto grado de solubilidad cuando la pasta permanece en contacto con tejidos y fluidos por lo que el canal radicular queda vacío en poco tiempo, retrasando el proceso de reparación (Fava and Saunders 1999). Una de las marcas comerciales corresponde a UltraCal® XS (Ultradent, USA). Es una pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  utilizada para el relleno temporal de los canales radiculares entre sesiones del tratamiento endodóntico. Es radiopaca y de elevado pH (12,5), posee un vehículo acuoso de metilcelulosa y fluye de forma adecuada a través de una fina punta. Tiene propiedades antimicrobianas debido a su elevado pH y estimula la formación de dentina secundaria (Andolfatto, da Silva et al. 2012).

Dentro de los vehículos viscosos encontramos glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, etc. En estas pastas los iones son liberados más lentamente y presentan baja solubilidad en comparación a las pastas con vehículo acuoso. La pasta se mantiene en el sitio deseado por más tiempo, prolongando su acción (Fava and Saunders 1999).

Los vehículos oleosos como el aceite de oliva, camphor, metacresil acetato, ácidos grasos, PMCFAs, etc. tienen un uso restringido a situaciones que requieran un proceso de disociación iónica muy lenta (Fava and Saunders 1999).

En estudios anteriores se ha determinado que la utilización de  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicación del sistema de canales radiculares en dientes con patologías apicales o bien entre sesiones de la terapia endodóntica, tiene efecto en la reducción de algunos mediadores de la inflamación como las MMPs, específicamente MMP-8 medida en exudado periapical de dientes necróticos (Paula-Silva, da Silva et al. 2010).

Sin embargo, aún existe controversia respecto al uso de agentes antimicrobianos como medicación entre sesiones del tratamiento con respecto a hacer tratamientos endodónticos en una sola sesión. Algunos estudios han determinado que no hay diferencia estadísticamente significativa en la reparación de dientes con PAA tratados en una o dos sesiones, y que la decisión depende más bien de otros factores como por ejemplo del diagnóstico preoperatorio, la habilidad del tratante para conseguir el control de la infección, la anatomía de los canales radiculares, posibles complicaciones del procedimiento y factores subjetivos como signos y síntomas específicos de cada paciente (Molander, Warfvinge et al. 2007; Paredes-Vieyra and Enriquez 2012; Vera, Siqueira Jr et al. 2012).

A la fecha no se han realizado estudios que establezcan una relación entre los niveles de MPO y la utilización de medicación como el  $\text{Ca(OH)}_2$  en el tratamiento endodóntico. Por lo tanto el propósito de este estudio será determinar los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con PAA antes y después de la medicación intracanal con  $\text{Ca(OH)}_2$  para así asociar dichas variables y contribuir con el conocimiento actual sobre la etiopatogenia y tratamiento de la PAA.

## **HIPÓTESIS**

Los niveles de mieloperoxidasa en exudado periapical de dientes con periodontitis apical asintomática disminuyen después de la medicación intracanal con hidróxido de calcio.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comparar los niveles de mieloperoxidasa en exudado periapical de dientes con diagnóstico de periodontitis apical asintomática antes y después de la medicación intracanal con hidróxido de calcio.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar y comparar la concentración de proteínas totales (CPT) presente en exudado periapical de dientes con PAA antes y después de la medicación con hidróxido de calcio.
2. Determinar los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con PAA antes y después de la medicación con hidróxido de calcio.
3. Comparar los niveles de MPO antes y después de la medicación con hidróxido de calcio.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo de estudio

El estudio realizado corresponde a un estudio pre-experimental y se encuentra financiado por el proyecto FONDECYT 1120138, y como parte de dicho proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (**Anexo 1**).

### Selección de Pacientes

Se seleccionaron 15 pacientes con diagnóstico clínico de PAA en dientes unirradiculares con indicación de endodoncia en la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, previa firma de consentimiento informado (**Anexo 2**), el cual fue explicado por los investigadores y se entregó una copia a los participantes del estudio para su lectura.

El diagnóstico fue realizado mediante anamnesis, examen radiológico y tests de sensibilidad pulpar, el que fue registrado en una ficha clínica 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<sup>®</sup> Coltene Whaledent y calor probado con transpoliisopreno) y que al examen radiográfico se observara destrucción ósea apical en relación al diente en cuestión (imagen radiográfica compatible con QR o GP) (Gutmann 2009).

Se excluyeron del presente estudio, mujeres embarazadas o en terapia hormonal de reemplazo, y aquellos pacientes que recibieron medicación de antibióticos, corticoides o antiinflamatorios en los últimos 3 meses o que hubieran presentado enfermedades autoinmunes y/o periodontales.

### **Obtención de las muestras**

A cada paciente que acudió a terapia endodóntica con diagnóstico clínico de PAA en diente unicanalicular, se le tomó muestra de exudado periapical antes de la preparación quimio-mecánica; para ello, bajo aislación absoluta y unitaria y previa desinfección del dique de goma, clamps y diente en cuestión, se realizó la cavidad de acceso sin uso de agua o irrigante. Luego, se introdujo una punta de papel estéril n°20 (Dentsplay, Maillefer, Ballaigues, Suiza) al interior del canal a la longitud aparente del diente por un tiempo de 30 segundos (Shimauchi H. y col., 1996), dicho procedimiento se realizó tres veces por canal. En caso de observarse sangre en las puntas de papel, éstas fueron eliminadas. Las tres puntas de papel por diente fueron guardadas en un tubo eppendorf a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su elución y análisis. El mismo procedimiento se repitió en la segunda cita del paciente, dos semanas después; período durante el cual el canal se mantuvo medicado con una pasta de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (UltraCal® XS, Ultradent, South Jordan, Utah USA). Bajo aislación unitaria y absoluta se retiró el doble sellado endodóntico y luego el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  fue eliminado utilizando dos jeringas monoject de irrigación con suero, es decir 5,6 cc de suero. Posteriormente se repitió el procedimiento de toma de muestra de la primera sesión.

### **Procesamiento de las muestras**

Las muestras de exudado periapical fueron eluidas desde las puntas de papel, utilizando un buffer de elución Tris- HCl pH 7,5 (0,5 M), NaCl (2 M),  $\text{CaCl}_2$  (250mM), Tritón x-100 (25%) con inhibidor de proteasa libre de EDTA (complete Mini, EDTA-free, REF11836170001, LOT12910200, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), agregando 40  $\mu\text{l}$  por punta de papel, es decir, 120  $\mu\text{l}$  por tubo. Posteriormente se agitaron mediante vortex por 30 segundos y se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Luego, los tubos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se recuperó el sobrenadante y se repitió el procedimiento,

rescatando un volumen final de 240 µl aproximadamente por tubo. Los eluidos fueron conservados a -80°C hasta su utilización.

### **Cuantificación de proteínas totales**

A cada muestra se le realizó cuantificación de proteínas totales (ug/ml) mediante el método del ácido bicinconínico (Micro BCA™, Pierce®, Rockford, USA), según instrucciones del fabricante. Este método interpreta la cantidad de proteínas presentes, mediante la intensidad del color medida en el espectrofotómetro, para esto, la concentración se ajustó en una curva con albúmina sérica de bovino (BSA).

### **Determinación de niveles de MPO**

Para determinar los niveles de MPO se realizó el test de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Para esto se utilizó un kit comercial de acuerdo a las indicaciones del fabricante (MPO ELISA Kit. For the *in vitro* determination of Myeloperoxidase (MPO) in serum and plasma. K6631A, Immunodiagnostik AG, Alemania).

El Kit estaba compuesto por una placa de microtitulación conformada por 96 pocillos previamente recubiertos por el anticuerpo anti-humano específico para MPO. Los estándares, controles y las muestras de eluido de exudado periapical provenientes de dientes con PAA se añadieron a cada pocillo de la placa de microtitulación. La MPO presente en las muestras se unió al anticuerpo de captura inmovilizado.

Luego fue agregado un anticuerpo de detección anti-humano MPO conjugado con biotina (anticuerpo secundario biotinilado) a cada pocillo, seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa, produciendo tres capas conformadas por anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Más tarde, se agregó tetrametilbencidina

(TMB) a cada pocillo como un sustrato colorímetro para la MPO. La reacción provocó un cambio de color a azul, proporcional a la cantidad de MPO presente en la muestra.

Finalmente se agregó una solución ácida de detención (STOP) y la reacción viró a un color amarillo. La intensidad del color se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. La concentración de MPO en las muestras se determinó mediante una curva de absorbancia v/s concentración, confeccionada con los valores de los estándares.

Los niveles de MPO fueron normalizados por sitio (MPO ng/ml) y por CPT, sin embargo, el resultado del ELISA se consideró para discusión expresado en cantidades absolutas de MPO por sitio. Coincidimos con Golub y cols. (1997) en que de manera similar como ocurre con las muestras de fluido gingival crevicular, el método más sensible para calcular los niveles de moléculas presentes en exudado periapical es la expresión de cantidades absolutas bajo un tiempo de colección de la muestra estandarizado (30 segundos), debido al pequeño volumen de muestra recolectada y a que el muestreo representa que el total o la mayor parte del exudado es removido del interior del canal en estudio (Golub, Lee et al. 1997; Dezerega, Pozo et al. 2010)

### **Análisis estadístico de los datos**

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad PRISM 5.0.

Las características de los pacientes a los cuales se les tomó muestras de exudado periapical fueron analizadas considerando el promedio  $\pm$  desviación estándar.

Para analizar la distribución de normalidad de los datos se aplicó el test de Shapiro-Wilk.

La distribución de los datos en la CPT no fue normal, por lo que se utilizó el test Mann Whitney para determinar si las diferencias observadas en las muestras eran estadísticamente significativas.

La distribución de los datos no fue normal para cuantificación de MPO en las muestras a través de ELISA. Por lo tanto se utilizó el test Mann Whitney para determinar si las diferencias observadas en las muestras eran estadísticamente significativas.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Se seleccionaron 15 pacientes con diagnóstico de PAA de los cuales se obtuvieron muestras de exudado periapical pre y post medicación intracanal con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Del total de pacientes del estudio, 8 eran mujeres y 7 hombres correspondiendo al 53,3% y 46,7% respectivamente. La edad promedio de los pacientes fue de  $41,53 \pm 1,86$  años.

**Tabla 1. Características de los pacientes seleccionados.**

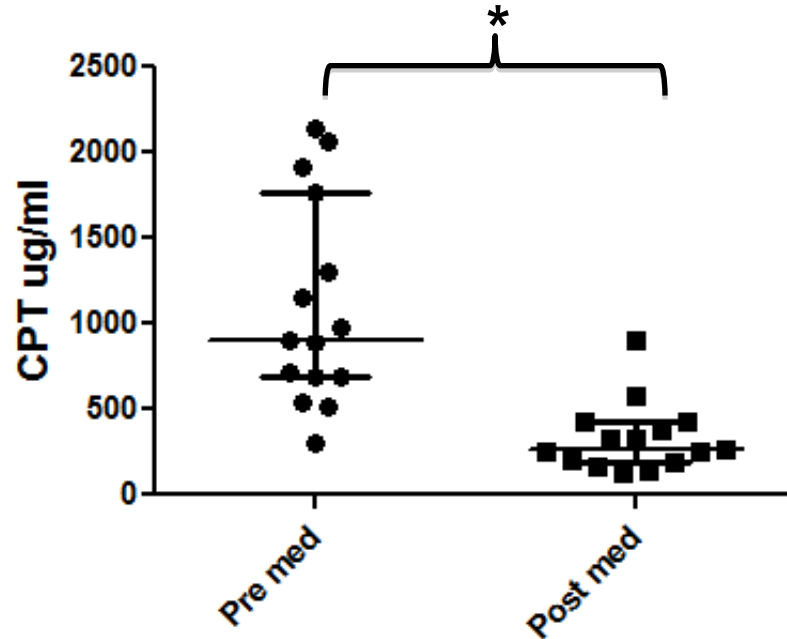
Diagnóstico	PAA
Tamaño de muestra	N=15
Edad (años)*	$41,53 \pm 1,86$
Mujeres	N=8
Hombres	N=7

\* Expresado como promedio  $\pm$  desviación estándar.

### Concentración de Proteínas Totales

Los datos correspondientes a la CPT (ug/ml) de las muestras analizadas se muestran en la **Figura 2**.

En ella se observa que la CPT (ug/ml) obtenida del exudado periapical de dientes con PAA pre medicación fue significativamente mayor que los datos correspondientes a las muestras post medicación con  $\text{Ca(OH)}_2$  (905.9 (1068) versus 270 (239.5) ug/ml,  $P < 0,0001$ , Test Mann-Whitney).



**Figura 2: Concentración de proteínas totales en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (mediana  $\pm$  rango intercuartil)** La CPT obtenida de eluidos provenientes de exudado periapical de dientes con PAA pre medicación con  $\text{Ca(OH)}_2$  fue significativamente mayor que la de dientes con PAA post medicación. \* $p < 0,0001$  (test Mann Whitney). La línea horizontal en cada columna del gráfico representa la mediana de la CPT para cada grupo estudiado. La línea superior e inferior a la mediana corresponde al rango intercuartil.







## DISCUSIÓN

La PAA se establece a partir del flujo constante de bacterias y sus productos a través del foramen apical, lo que induce inflamación, activación e interacción coordinada de células inmuno-inflamatorias en la región periapical. La movilización de mecanismos defensivos del hospedero previene la diseminación de la infección, sin embargo estos mecanismos también pueden destruir componentes normales de los tejidos e inducir reabsorción ósea, por tanto, el balance dinámico entre mediadores pro y antiinflamatorios permitirá que la PAA se mantenga asintomática por un tiempo indefinido hasta que el equilibrio se perturbe (Marton and Kiss 2000; Menezes, Garlet et al. 2008).

La respuesta del hospedero en la PAA involucra la producción de una serie de mediadores proinflamatorios que participan en los procesos de iniciación y mantención de la inflamación, produciendo reabsorción ósea junto con la formación de tejido de granulación infiltrado por LT y B, células plasmáticas, Mø, mastocitos y PMN (Matsuo, Ebisu et al. 1992; Metzger 2000; Garrido Flores, Ordenes Vitali et al. 2011).

Los PMN constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune innato o inespecífico contra infecciones bacterianas y fúngicas, seguidos por los Mø y linfocitos (Rojas 2003; Barbieri Petrelli, Flores Guillén et al. 2005). Poseen un citoplasma rico en gránulos que aparecen durante la fase de maduración, por lo que presentan funciones secretoras además de fagocitar y eliminar microorganismos (Van Dyke and Hoop 1990).

En los gránulos primarios o azurófilos de los PMN se encuentra la enzima MPO que es capaz de catalizar la conversión de  $H_2O_2$  y  $Cl^-$  a HClO, que es un poderoso agente antioxidante que contribuye a la defensa contra microorganismos cuando es liberado dentro del fagosoma del PMN gracias a su potente actividad antimicrobiana (García Morales, Pereira Roche et al. 1998; Klebanoff 2005).

La MPO y  $H_2O_2$  también pueden ser liberados al exterior del PMN, donde reaccionarán con  $Cl^-$  generando HClO el cual puede provocar daño a los tejidos adyacentes y contribuir con la patogénesis de la enfermedad. Además, a partir de esta reacción se forman una serie de radicales libres y otras sustancias oxidativas con potente acción antimicrobiana que también pueden dañar tejidos del huésped (Hoy, Leininger-Muller et al. 2002; Klebanoff 2005; Aranda 2012).

Se ha demostrado la acción de MPO como participante central de la relación entre inflamación y enfermedad cardiovascular, estando implicada en la patogénesis de diversas enfermedades como hipercolesterolemia familiar, aterosclerosis, síndrome coronario agudo, hepatitis crónica, cirrosis hepática, enfermedades neurológicas degenerativas. Como denominador común en todas las patologías anteriormente mencionadas, se encuentra el daño oxidativo que generan los radicales libres y sustancias oxidativas producidas a partir de la reacción de MPO con  $H_2O_2$  (Pecoits-Filho, Stenvinkel et al. 2003; Malle, Marsche et al. 2006; Roman, Wendland et al. 2008; Puntoni, Sbrana et al. 2011). También se han descrito niveles elevados de MPO en enfermedades orales como periodontitis crónica y agresiva. En fluido gingival crevicular de sitios con gingivitis y periodontitis, mediante métodos inmunológicos se ha demostrado mayores cantidades/sitio de MPO al aumentar la gravedad de la inflamación gingival y periodontal y una disminución de estos niveles después de realizado el tratamiento (Cao and Smith 1989; Marcaccini, Amato et al. 2010).

En el presente estudio se demostró la presencia de MPO en exudado periapical de dientes con PAA, concordante a los resultados obtenidos en estudios anteriores donde se ha establecido la presencia de MPO en exudado periapical de dientes con PAA y AAA (Cabrera 2012).

El tratamiento de la PAA se basa en la terapia endodóntica, la cual tiene como objetivo reducir la carga de microorganismos contenidos dentro del sistema de canales radiculares a niveles compatibles con la recuperación y cicatrización de los tejidos perirradiculares; y también, prevenir la recolonización microbiana de los canales ya tratados (Vera, Siqueira Jr et al. 2012).

El  $\text{Ca(OH)}_2$  es una sustancia fuertemente alcalina, con un pH de 12,5 aproximadamente. Tiene propiedades antibacterianas y la habilidad de inducir la reparación y estimular la formación de tejido mineralizado (Foreman and Barnes 1990; Barekatin, Hasheminia et al. 2012). Su principal beneficio como medicación intracanal entre sesiones de un tratamiento endodóntico reside en su efecto bactericida debido a que la mayoría de los microorganismos situados en los canales radiculares son incapaces de sobrevivir en el ambiente altamente alcalino que provee el  $\text{Ca(OH)}_2$  (Heithersay 1975; Kennedy and Hussey 2007).

En los resultados de éste estudio, se determinó mediante ELISA que los niveles de MPO en dientes con PAA después de la preparación quimio-mecánica y medicación con  $\text{Ca(OH)}_2$  disminuyeron significativamente en comparación a los niveles pre medicación. Otros autores han estudiado el efecto de  $\text{Ca(OH)}_2$  sobre diferentes mediadores de la inflamación como MMP-8, quien es expresado por PMN, fibroblastos de la pulpa dental, odontoblastos, células epiteliales inflamadas y células plasmáticas.  $\text{Ca(OH)}_2$  disminuye significativamente los niveles de MMP-8, quien está asociado a mayor destrucción de tejidos pulpaes y periapicales durante el desarrollo de PAA (Wahlgren, Salo et al. 2002).

Del mismo modo, los resultados del presente trabajo indican que hubo disminución estadísticamente significativa de CPT después de la preparación quimio-mecánica y medicación con  $\text{Ca(OH)}_2$ , lo cual es esperable debido a que luego de dichos procedimientos disminuye el infiltrado inflamatorio en los tejidos periapicales, disminuyendo así el recuento de proteínas totales en comparación a los niveles pre tratamiento (Tanomaru Filho, Leonardo et al. 2002; Tanomaru, Leonardo et al. 2003).

Si bien los resultados del presente estudio mostraron una disminución significativa de los niveles de MPO y CPT después de la preparación quimio-mecánica y medicación con  $\text{Ca(OH)}_2$  de dientes con diagnóstico de PAA, no está claro si dicha disminución se produjo debido a la utilización de medicación de  $\text{Ca(OH)}_2$ , a la irrigación con hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ) al 5,25%, a la

preparación mecánica de los canales radiculares, o bien al conjunto de dichas acciones.

Dado que el  $\text{Ca(OH)}_2$  tiene una potente acción bactericida al igual que el NaOCl, ambos podrían estar asociados a la disminución de la carga microbiana al interior del sistema de canales radiculares, por lo que también disminuirían la inflamación y por tanto habría menor presencia de PMNs y otras células propias del proceso inflamatorio, disminuyendo así la liberación de moléculas y mediadores proinflamatorios como lo es la MPO (Shuping, Ørstavik et al. 2000; de Almeida GOMES, Ferraz et al. 2002).

El efecto de la irrigación de los canales radiculares ha sido ampliamente estudiado. En la actualidad, el NaOCl constituye el irrigante más popular en endodoncia, debido a que es un agente antimicrobiano de amplio espectro efectivo contra bacterias, bacteriófagos, virus, esporas y levaduras (Byström and Sundqvist 1983). La eficacia antimicrobiana del NaOCl al 5,25% se debe a su alto pH (11 a 12) y a su habilidad para oxidar e hidrolizar proteínas celulares, rompiendo cadenas peptídicas lo que resulta en la disolución de proteínas. Además es efectivo en la remoción de restos pulpares contenidos en los canales radiculares y tiene la capacidad de disolver tejido orgánico (Pashley, Birdsong et al. 1985; Heling and Chandler 1998; Izu, Thomas et al. 2004).

Se ha visto en estudios anteriores, que si bien la preparación mecánica junto con la irrigación con NaOCl reducen significativamente la población microbiana intracanal, la adición de medicación como  $\text{Ca(OH)}_2$  reduce aún más la carga microbiana (Shuping, Ørstavik et al. 2000). La utilización de pastas como medicación intracanal entre sesiones del tratamiento endodóntico sigue siendo tema de discusión, en algunos estudios no se han observado diferencias significativas entre dientes tratados en una sesión y dientes tratados en dos sesiones incluyendo la utilización de  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicación. Sin embargo, se ha observado que microorganismos remanentes luego de la instrumentación e irrigación, pueden ser eliminados o prevenida su multiplicación introduciendo pastas como el  $\text{Ca(OH)}_2$  entre sesiones del tratamiento (Peters and Wesselink

2002; Sunde, Olsen et al. 2002). No hay reportes de trabajos de investigación previos donde se estudien los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con PAA sometidos a terapia endodóntica con utilización de medicación entre sesiones del tratamiento.

A partir de los resultados de este estudio, podríamos sugerir entonces que el  $\text{Ca(OH)}_2$  podría participar de la reducción de los niveles MPO en exudado periapical de dientes con PAA, lo cual tendría algún grado de contribución en el proceso de reparación de los tejidos periapicales. La reparación es un fenómeno que se continúa con la inflamación sin un límite preciso, no hay reparación sin inflamación y viceversa (Altare 2010). En un estudio que determinó el efecto de irrigantes y medicación intracanal de  $\text{Ca(OH)}_2$  en la reparación de tejidos periapicales en dientes con LPA, se observó que había mejor reparación histológica en los grupos donde se había utilizado dicha medicación (Tanomaru Filho, Leonardo et al. 2002).

Pese a los resultados obtenidos, se requieren nuevos estudios con mayor número de pacientes y que permitan determinar si la disminución de la MPO se debe a la irrigación con distintas sustancias, a la preparación mecánica de los canales radiculares, a la utilización de medicación intracanal o bien, a la acción en conjunto de dichos procedimientos. Actualmente existe mucha controversia sobre la utilidad y justificación del uso de medicación intracanal, por lo tanto sería de gran ayuda para el quehacer endodóntico tener nuevos estudios sobre la efectividad del uso de otras pastas como medicación o  $\text{Ca(OH)}_2$  en otras presentaciones y medir otros mediadores de inflamación para complementar el conocimiento actual.

## CONCLUSIONES

Del presente trabajo de investigación se pueden concluir los siguientes puntos:

1. Se puede detectar la presencia de MPO en exudado periapical de dientes con diagnóstico de PAA.
2. La CPT y los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con PAA previo a la medicación intracanal con  $\text{Ca(OH)}_2$  son significativamente mayores con respecto a los niveles detectados posterior a dicha medicación.
3. Se ha visto que MPO tiene un rol importante en la etiopatogenia de la PAA y que la preparación quimio-mecánica junto con la medicación intracanal con  $\text{Ca(OH)}_2$  se asocian con reducción de CPT y MPO en dientes con diagnóstico de PAA, por lo tanto el  $\text{Ca(OH)}_2$  podría ser útil en el tratamiento de la PAA favoreciendo la reparación de los tejidos periapicales.
4. El  $\text{Ca(OH)}_2$  también podría actuar sobre otras células y mediadores, por lo tanto se sugiere realizar más estudios en el futuro que permitan complementar el conocimiento actual.
5. Se sugiere complementar el estudio aumentando el tamaño muestral e identificando por separado las distintas variables que pudieran ejercer algún efecto en la disminución de CPT y MPO luego del tratamiento endodóntico.
6. Mediante el presente estudio se pudo confirmar la hipótesis de que los niveles de MPO en exudado periapical de dientes con PAA disminuyen después de la medicación intracanal con  $\text{Ca(OH)}_2$ , sin embargo no está claro si la disminución se debe al  $\text{Ca(OH)}_2$ , a la instrumentación biomecánica, a la irrigación o al conjunto de dichos procedimientos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altare, L. (2010). "Reparación apical y periapical post tratamiento endodontico."

Andolfatto, C., G. F. da Silva, et al. (2012). "Biocompatibility of Intracanal Medications Based on Calcium Hydroxide." ISRN Dentistry **2012**.

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.

Ataoglu, T., M. Üngör, et al. (2002). "Interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  levels in periapical exudates." International endodontic journal **35**(2): 181-185.

Barbieri Petrelli, G., J. Flores Guillén, et al. (2005). "El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal." Avances en Periodoncia e Implantología Oral **17**(1): 11-16.

Barekatin, B., S. M. Hasheminia, et al. (2012). "The effect of calcium hydroxide placement on pH and calcium concentration in periapical environment: An in vitro study." Indian Journal of Dental Research **23**(2): 226.

Birkedal-Hansen, H. (1993). "Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases\*." Journal of periodontology **64**(5s): 474-484.

Byström, A. and G. Sundqvist (1983). "Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology **55**(3): 307-312.

Cabrera, V. (2012). Niveles de mieloperoxidasa (MPO) en exudado periapical de dientes con periodontitis apical asintomática (PAA) y absceso apical agudo (AAA). Trabajo de investigación requisito para optar al título de Cirujano Dentista.

Cao, C. and Q. Smith (1989). "Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites." Journal of clinical periodontology **16**(1): 17-20.

Carrillo García, C., F. Vera Sempere, et al. (2007). "The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects." Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet) **12**(8): 585-590.



Čolić, M., D. Gazivoda, et al. (2009). "Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions." Molecular immunology **47**(1): 101-113.

de Almeida GOMES, B. P. F., C. C. R. Ferraz, et al. (2002). "In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms." Braz Dent J **13**: 3.

Desai, S. and N. Chandler (2009). "Calcium Hydroxide–Based Root Canal Sealers: A Review." Journal of Endodontics **35**(4): 475-480.

Dezerega, A., P. Pozo, et al. (2010). "Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis." Journal of periodontology **81**(2): 267-276.

Dios, P. D., A. O. Hermida, et al. (2002). "Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos." Med Oral **7**: 206-221.

Emingil, G., B. Afacan, et al. (2010). "GCF and serum myeloperoxidase and matrix metalloproteinase-13 levels in renal transplant patients." Archives of Oral Biology **55**(10): 719-727.

Fava, L. and W. Saunders (1999). "Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications." International endodontic journal **32**(4): 257-282.

Figdor, D. and G. Sundqvist (2007). "A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora." Australian dental journal **52**(1): S38.

Foreman, P. and I. Barnes (1990). "A review of calcium hydroxide." International endodontic journal **23**(6): 283-297.

Gamonal, J., M. Sanz, et al. (2003). "Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients." Journal of clinical periodontology **30**(7): 616-623.

García Morales, O. H., N. Pereira Roche, et al. (1998). "Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa." Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas **17**(3): 190-197.

Garrido Flores, M., T. Ordenes Vitali, et al. (2011). "Asociación entre niveles de TNF- $\alpha$  en fluido crevicular gingival de dientes con periodontitis apical asintomática." Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral **4**(3): 130-133.

Gazivoda, D., T. Dzopalic, et al. (2009). "Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture." Journal of oral pathology & medicine **38**(7): 605-611.

Glickman, G. N. (2009). "AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: background and perspectives." Journal of Endodontics **35**(12): 1619-1620.

Golub, L., H.-M. Lee, et al. (1997). "A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis." Inflammation Research **46**(8): 310-319.

Gomes, B., E. Pinheiro, et al. (2004). "Microbiological examination of infected dental root canals." Oral microbiology and immunology **19**(2): 71-76.

Grossman, L. I. (1967). "Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth." Journal of dental research **46**(3): 551-553.

Gullberg, U., E. Andersson, et al. (1997). "Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development." European journal of haematology **58**(3): 137-153.

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

Gutmann, J. L., J. C. Baumgartner, et al. (2009). "Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states." Journal of Endodontics **35**(12): 1658-1674.

Hansson, M., I. Olsson, et al. (2006). "Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase." Archives of biochemistry and biophysics **445**(2): 214-224.

Heithersay, G. S. (1975). "Calcium Hydroxide in the Treatment of Pulpless Teeth with Associated Pathology\*." International endodontic journal **8**(2): 74-93.

Heling, I. and N. Chandler (1998). "Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules." International endodontic journal **31**(1): 8-14.

Hernández, M., B. Martínez, et al. (2007). "MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis." Journal of clinical periodontology **34**(9): 729-735.

Hoy, A., B. Leininger-Muller, et al. (2002). "Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases." Clinical chemistry and laboratory medicine **40**(1): 2-8.

Ingle, J. I. and L. K. Bakland (2002). Endodontics, Pmph Bc Decker.

Izu, K., S. Thomas, et al. (2004). "Effectiveness of sodium hypochlorite in preventing inoculation of periapical tissues with contaminated patency files." Journal of Endodontics **30**(2): 92-94.

Jacinto, R., B. Gomes, et al. (2003). "Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria." Oral microbiology and immunology **18**(5): 285-292.

John I. Ingle, L. K. B., J. Craig Baumgartner (2008). Ingle's ENDODONTICS 6. Hamilton, BC Decker Inc.

Katebzadeh, N., A. Sigurdsson, et al. (2000). "Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study." International endodontic journal **33**(1): 60-65.

Kennedy, J. and D. Hussey (2007). "The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **103**(4): 560-569.

Klebanoff, S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." Journal of leukocyte biology **77**(5): 598-625.

Lanza, F. (1998). "Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency." Journal of molecular medicine **76**(10): 676-681.

Lau, D., H. Mollnau, et al. (2005). "Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(2): 431-436.

Leeman, M. F., S. Curran, et al. (2002). "The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13." Critical reviews in biochemistry and molecular biology **37**(3): 149-166.

Lin, L. and P. Rosenberg (2011). "Repair and regeneration in endodontics." International endodontic journal **44**(10): 889-906.

- Malle, E., G. Marsche, et al. (2006). "Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins." Archives of biochemistry and biophysics **445**(2): 245-255.
- Marcaccini, A. M., P. A. Amato, et al. (2010). "Myeloperoxidase activity is increased in gingival crevicular fluid and whole saliva after fixed orthodontic appliance activation." American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics **138**(5): 613-616.
- Marcaccini, A. M., C. A. Meschiari, et al. (2010). "Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy." Journal of clinical periodontology **37**(2): 180-190.
- Marton, I. and C. Kiss (1993). "Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions." International endodontic journal **26**(2): 131-136.
- Marton, I. and C. Kiss (2000). "Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis." Oral microbiology and immunology **15**(3): 139-150.
- Matsuo, T., S. Ebisu, et al. (1992). "Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth." Journal of Endodontics **18**(10): 497-500.
- Menezes, R., C. M. Bramante, et al. (2006). "Receptor activator NFkB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **102**(3): 404-409.
- Menezes, R., T. P. Garlet, et al. (2008). "The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis." Journal of Endodontics **34**(12): 1480-1484.
- Metzger, Z. (2000). "Macrophages in periapical lesions." Dental Traumatology **16**(1): 1-8.
- Mohammadi, Z. and P. M. H. Dummer (2011). "Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology." International endodontic journal **44**(8): 697-730.
- Molander, A., J. Warfvinge, et al. (2007). "Clinical and radiographic evaluation of one-and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial." Journal of Endodontics **33**(10): 1145-1148.

Mundi Burgos, V., A. Dezerega Piwonka, et al. (2011). "Inmunodetección de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)-2,-9,-13 y-14 en lesiones apicales asociadas con periodontitis apical asintomática." Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral **4**(1): 17-21.

Nair, P. (1997). "Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response." Periodontology 2000 **13**(1): 121-148.

Nair, P. (2004). "Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine **15**(6): 348-381.

Nair, P., S. Henry, et al. (2005). "Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **99**(2): 231-252.

Nekoofar, M., M. Namazikhah, et al. (2009). "pH of pus collected from periapical abscesses." International endodontic journal **42**(6): 534-538.

Ørstavik, D. and T. Pitt Ford (1998). "Apical periodontitis: microbial infection and host responses." Essential Endodontology. Oxford: Blackwell Science: 1-8.

Palomo I, F. A., Sepúlveda C, Rossemblatt M, Vergara U. (2009). Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica. Talca, Chile., Universidad de Talca. 211-219.

Paredes-Vieyra, J. and F. J. J. Enriquez (2012). "Success rate of single-versus two-visit root canal treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial." Journal of Endodontics.

Pashley, E., N. Birdsong, et al. (1985). "Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue." Journal of Endodontics **11**(12): 525-528.

Paula-Silva, F. W. G., L. A. B. da Silva, et al. (2010). "Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment." Journal of Endodontics **36**(2): 231-237.

Pecoits-Filho, R., P. Stenvinkel, et al. (2003). "A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients." Kidney International **63**: S172-S176.

Peters, L. and P. Wesselink (2002). "Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms." International endodontic journal **35**(8): 660-667.

Puntoni, M., F. Sbrana, et al. (2011). "Myeloperoxidase modulation by LDL apheresis in Familial Hypercholesterolemia." Lipids in health and disease **10**(1): 185.

Radics, T., C. Kiss, et al. (2003). "Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth." Oral microbiology and immunology **18**(1): 9-13.

Ramachandran Nair, P. (1987). "Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions." Journal of Endodontics **13**(1): 29-39.

Rojas, W. I. (2003). "Corporación para Investigaciones Biológicas." Medellin, Colombia.

Roman, R. M., A. E. Wendland, et al. (2008). "Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice." Arquivos Brasileiros de Cardiologia **91**(1): e12-e19.

Rosa de Sá, A., F. J. Garcia Santos Pimenta, et al. (2003). "Immunolocalization of interleukin 4, interleukin 6, and lymphotoxin  $\alpha$  in dental granulomas." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **96**(3): 356-360.

Shuping, G. B., D. Ørstavik, et al. (2000). "Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications." Journal of Endodontics **26**(12): 751-755.

Siqueira, J. F. (2002). "Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **94**(3): 281-293.

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

Stashenko, P., R. Teles, et al. (1998). "Periapical inflammatory responses and their modulation." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine **9**(4): 498-521.

Sunde, P. T., I. Olsen, et al. (2002). "Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy." Journal of Endodontics **28**(4): 304-310.

Tanomaru Filho, M., M. R. Leonardo, et al. (2002). "Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion." Journal of Endodontics **28**(4): 295-299.

Tanomaru, J., M. Leonardo, et al. (2003). "Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS." International endodontic journal **36**(11): 733-739.

Van Dyke, T. E. and G. A. Hoop (1990). "Neutrophil function and oral disease." Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists **1**(2): 117.

Vera, J., J. F. Siqueira Jr, et al. (2012). "One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study." Journal of Endodontics **38**(8): 1040-1052.

Vernal, R., A. Dezerega, et al. (2006). "RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction." Oral diseases **12**(3): 283-289.

Wahlgren, J., T. Salo, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates." International endodontic journal **35**(11): 897-904.

Wang, Y., H. Rosen, et al. (2007). "Myeloperoxidase Inactivates TIMP-1 by Oxidizing Its N-terminal Cysteine Residue AN OXIDATIVE MECHANISM FOR REGULATING PROTEOLYSIS DURING INFLAMMATION." Journal of Biological Chemistry **282**(44): 31826-31834.





Weiger, R., R. Rosendahl, et al. (2000). "Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions." International endodontic journal **33**(3): 219-226.

Winter, G. and W. J. Harris (1993). "Humanized antibodies." Trends in Pharmacological Sciences **14**(5): 139-143.

Yassen, G. and J. Platt (2013). "The effect of nonsetting calcium hydroxide on root fracture and mechanical properties of radicular dentine: a systematic review." International endodontic journal **46**(2): 112-118.

## ANEXOS

Anexo 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación

 <p>UNIVERSIDAD DE CHILE Facultad de Odontología COMITÉ DE ÉTICA</p>	30/07/2011
<b>ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN</b>	
<p>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.</p>	
<p>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.</p>	
<p>En consecuencia, el Comité Ético Científico del Servicio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, <u>Aprueba por unanimidad de sus miembros</u> 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.</p>	
<p>Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si fuera necesario.</p>	
 <p><b>Prof. Dr. Juan Cortes A</b> Presidente CEC-FOUCH</p>	
<p>c/C.: Investigador Principal. Y Secretaría C.E.C.</p>	
	



## Anexo 2: Formulario de Consentimiento Informado

Ed. 30/07/2011

### DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

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

Versión 1, pacientes 18 años o más

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

**Procedimiento:** Se incluirán pacientes con diagnóstico de diente con Periodontitis Apical Asintomática y controles sin el problema dental, ninguno con enfermedades generales.

**Cuando esté indicado,** el especialista en endodoncia le realizará el tratamiento de

23/04/2012  
COMITÉ ASESOR  
DE BIOÉTICA  
FONDECYT

Ed. 30/07/2011

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

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

El total de muestras y datos obtenidos serán registrados e identificados por el investigador responsable mediante códigos para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales y los códigos servirán para mantener oculta la identidad de los participantes. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, sólo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

**Ventajas:** Como ventajas de participar en el presente estudio, las personas podrán acceder a tratamiento endodóntico de costo reducido, estudio radiográfico asociado y análisis de perfil lipídico (riesgo cardiovascular) y hemoglobina glicosilada (riesgo de diabetes) gratuitos y se informará a aquellos que tengan niveles alterados.

**Investigador Responsable:**

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



Ed. 30/07/2011

**FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES ADULTOS**

**Investigador responsable:** Dra. Marcela Hernández Ríos: Marcela Hernández Ríos;  
Depto. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Fono: 9781808;  
email: [mhermandezrios@gmail.com](mailto:mhermandezrios@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: .....



**Anexo 3: Ficha Clínica**

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