



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE PATOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**“RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y ENDOTOXEMIA EN INFECCIÓN
ENDODÓNTICA CON *PORPHYROMONAS ENDODONTALIS* Y
PORPHYROMONAS GINGIVALIS EN PERIODONTITIS APICAL
ASINTOMÁTICA”**

Valeska Gissel Fariña Espinosa

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

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marcela Hernández Ríos

TUTORES ASOCIADOS

**Dra. Denisse Bravo Rodríguez
Macarena Valdés**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1120138
Santiago - Chile
2015**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE PATOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**“RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y ENDOTOXEMIA EN INFECCIÓN
ENDODÓNTICA CON *PORPHYROMONAS ENDODONTALIS* Y
PORPHYROMONAS GINGIVALIS EN PERIODONTITIS APICAL
ASINTOMÁTICA”**

Valeska Gissel Fariña Espinosa

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

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marcela Hernández Ríos

TUTORES ASOCIADOS

**Dra. Denisse Bravo Rodríguez
Macarena Valdés**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1120138
Santiago - Chile
2015**

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

Contenido	Página
MARCO TEÓRICO	1
- Enfermedades periodontales	1
- Enfermedad periodontal y relación con otras enfermedades sistémicas	2
- Periodontitis apical y marginal	3
- Etiología periodontitis apical	5
- Factores de virulencia de patógenos endodónticos	8
- LPS y respuesta inmune	8
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXOS	32
Anexo 1:	32
Anexo 2	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla nº1: <i>Prevalencia bacterias en canales apicales en dientes con PAA y abscesos apicales</i>	6
Tabla nº2: <i>Factores de riesgo cardiovasculares en pacientes con PAA y controles</i>	16
Tabla nº3: <i>Frecuencias de detección de P. gingivalis y P. endodontalis en canales radiculares de pacientes con PAA</i>	18
Tabla nº4: <i>Niveles de endotoxinas y anticuerpos IgG e IgA contra P. endodontalis y P. gingivalis en suero de pacientes controles y PAA</i>	18
Tabla nº5: <i>Niveles de LPS y anticuerpos IgG e IgA en pacientes con PAA según detección de P. endodontalis en canales radiculares</i>	19

LISTA DE ABREVIACIONES**ABREVIACIÓN****SIGNIFICADO**

PA	Periodontitis Apical
PC	Periodontitis Crónica
PAA	Periodontitis Apical Asintomática
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG E-2	Prostaglandina E-2
IL	Interleuquina
LPS	Lipopolisacárido
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
Ig	Inmunoglobulina
RTF	Líquido de transporte reducido
HbG	Hemoglobina glicosilada

RESUMEN:

Introducción: La periodontitis apical asintomática (PAA) corresponde a una patología de etiología polimicrobiana que resulta en la destrucción del periodonto apical debido a una reacción inflamatoria crónica. Existe evidencia creciente de que infecciones crónicas en la cavidad oral pueden producir diseminación de productos bacterianos e inflamatorios a la circulación general y activación del sistema inmune con posible inducción de efectos sistémicos adversos. El potencial efecto sistémico asociado a PAA y en especial, a la infección endodóntica por *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis* aún no ha sido investigado. El objetivo de este estudio fue determinar la respuesta inmune humoral y endotoxemia en pacientes con PAA en infección endodóntica con *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis* versus pacientes controles sanos.

Material y métodos: Se incluyeron 17 pacientes con diagnóstico de PAA de entre 18 a 34 años de edad, sin enfermedades o factores de riesgo de ECV y 24 controles sanos. Se tomaron muestras de suero a todos los pacientes del estudio y muestras de canales radiculares a los individuos con PAA. Se realizó identificación de aislados de *P. endodontalis* y *P. gingivalis* mediante cultivos bacterianos específicos, PCR y secuenciación. Se midió concentración de endotoxinas en suero mediante ensayo comercial Limulus Amebocyte Lysate y niveles de anticuerpos IgG e IgA contra las bacterias anteriormente mencionadas por ensayo ELISA multiserotipo. Los datos fueron analizados mediante el software stata v12. Se determinó significancia estadística con un $p < 0.05$.

Resultados: En pacientes con PAA se detectó *P. gingivalis* en el 11.76% y *P. endodontalis* en el 29.4% de las muestras. Se observó un aumento de niveles de LPS en suero de pacientes con PAA respecto a controles, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Se encontraron diferencias significativas en niveles de endotoxinas ($p=0.002$) y anticuerpos IgG ($p=0.0047$) en pacientes con

PAA en los que se detectó *P. endodontalis* versus los que no presentaban la bacteria.

Conclusiones: Las especies bacterianas *P. endodontalis* y *P. gingivalis* fueron identificadas en canales radiculares de individuos afectados por PAA. En pacientes con PAA existe una tendencia a presentar niveles séricos mayores de endotoxinas y anticuerpos IgG e IgA anti *P. endodontalis* y *P. gingivalis* versus individuos sanos, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Existen niveles significativamente mayores de anticuerpos IgG anti *P. endodontalis* en pacientes con PAA con infección endodóntica por este patógeno versus pacientes con PAA en los que no se identificó la bacteria.

1.

MARCO TEÓRICO

1.1 ENFERMEDADES PERIODONTALES

Las enfermedades periodontales corresponden a una serie de afecciones de etiología polimicrobiana que afectan a los tejidos de soporte del diente; hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento y encía (international international workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. Papers. Oak brook, illinois, october 30-november 2, 1999)Se producen por una reacción inmune inflamatoria exacerbada en los tejidos periodontales como respuesta al cambio en la organización de las comunidades bacterianas (Choi and Seymour 2010). El estado de inflamación crónica por parte del hospedero, provoca la destrucción de estos tejidos de soporte, lo que eventualmente concluye con la pérdida del diente, contribuyendo así al desdentamiento parcial o total (Armitage 2004; Choi and Seymour 2010).

Dentro de las enfermedades que afectan a los tejidos periodontales, la Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y la Periodontitis Marginal, presentan una alta prevalencia en la población adulta. En un meta-análisis del año 2012, se describió que la prevalencia de dientes con PAA era muy alta (aproximadamente un 5% de todos los dientes medidos, con un rango que iba desde el 0.5% a un 13,9%) (Pak et al. 2012). Por otra parte, se ha descrito que la prevalencia de Periodontitis Marginal en Chile es de un 90.89% en pacientes entre los 35 a 44 años (Gamonal et al. 1998).

Existe amplia evidencia a nivel mundial que sugiere que las infecciones crónicas de origen dental pueden ser factores de riesgo de distintas condiciones sistémicas de alta morbilidad y mortalidad. La inflamación es el principal componente que liga la presencia de enfermedades orales con afecciones sistémicas. La presencia de infecciones crónicas locales puede contribuir a un estado de inflamación sistémica de bajo grado, producto de la diseminación de agentes infecciosos y mediadores pro-inflamatorios provenientes del ambiente oral (Moutsopoulos and Madianos 2006). Dicho estado inflamatorio permanente, a su vez, juega un importante papel en el progreso de diversas condiciones de diferente etiología, como por ejemplo

enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis, infarto) (Hansson 2005), diabetes y complicaciones asociadas al embarazo (parto prematuro) (Llambés et al. 2015; Offenbacher 2004).

1.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL Y RELACIÓN CON OTRAS ENFERMEDADES SISTÉMICAS

Dada la naturaleza de las enfermedades periodontales como una enfermedad crónica infecciosa, su contribución en el desarrollo de inflamación sistémica de bajo grado y ciertas enfermedades ha sido el tópico de muchas investigaciones. En este ámbito, se ha descrito que pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 presentan una prevalencia significativamente mayor de PAA que pacientes sanos (Bender and Bender 2003; Marotta et al. 2012). Por otra parte, también se ha encontrado una relación entre PAA y enfermedad coronaria. En un estudio de Costa (2014), se encontró que pacientes con PAA evidenciada radiográficamente, presentaban 2.79 veces más riesgo de desarrollar una enfermedad coronaria. En otro estudio, esta condición, junto a la pérdida de dientes y la Periodontitis Crónica (PC), también se asoció positivamente con la enfermedad coronaria (Pasqualini et al. 2012). Además, en una investigación en que se asoció PAA con aterosclerosis, se demostró que pacientes con al menos una lesión periapical, tenían un volumen de carga aterosclerótica significativamente mayor que en pacientes sin lesiones (Petersen et al. 2014).

Por su parte, la PC es una de las infecciones dentales que se ha asociado con niveles elevados de colesterol LDL y/o triglicéridos y niveles bajos de colesterol HDL, así como también a niveles elevados de marcadores de inflamación sistémica (Buhlin et al. 2003), los que se relacionan directamente con la patogénesis de enfermedades cardiovasculares (Cutler et al. 1999).

1.3 PERIODONTITIS APICAL Y MARGINAL

La periodontitis apical (PA) se define, según la Asociación Americana de Endodoncia, como la inflamación y destrucción del periodonto apical de origen pulpar que se asocia con un área radiolúcida periapical en ausencia de sintomatología clínica (Glickman et al. 2009).

La evidencia actual indica que la PAA presenta un origen infeccioso bacteriano, en el cual conviven una serie de comunidades bacterianas mixtas en el sistema de canales radiculares, que finalmente conforman un biofilm fuertemente adherido a las superficies radiculares (Siqueira and Rôças)

La infección de los canales radiculares, está precedida por la infección, inflamación y posterior necrosis de la pulpa dental. A su vez, la afectación de la pulpa dental, es consecuente a la colonización por microflora oral autógena. Dicha colonización se produce cuando existe ruptura de los tejidos duros del diente, ya sea, por caries dental, procedimientos clínicos o fracturas inducidas por trauma (Nair 2004). Cuando el proceso inflamatorio en la pulpa dental llega al sistema de canales radiculares, el ambiente endodóntico, que presenta en su porción apical menor tensión de oxígeno y mayor cantidad de proteínas y glicoproteínas (Figdor and Sundqvist 2007); provee de un hábitat selectivo para el establecimiento de una flora mixta, predominantemente anaeróbica (Rocas et al. 2010).

Esta comunidad polimicrobiana que coloniza los canales radiculares posee distintas propiedades biológicas y patogénicas, entre ellas, antigenicidad, actividad mitogénica, quimiotaxis, histólisis enzimática y la activación de las células inmunes del hospedero. Son finalmente los tejidos del hospedero los que terminan por producir una serie de respuestas tisulares con el fin de confinar y limitar el esparcimiento de los elementos infecciosos (Nair 2004). En este proceso inflamatorio se liberan mediadores, como metaloproteinasas, que degradan los tejidos periapicales, produciendo la formación de diferentes tipos histológicos de lesiones, denominadas comúnmente como lesiones periapicales (Bhalla et al. 2014; Rechenberg et al. 2014).

Por su parte, la PC, es una enfermedad inflamatoria crónica que caracteriza por un cambio en la organización de las comunidades microbianas subgingivales, en el cual existe una modificación en la abundancia relativa de ciertas especies bacterianas respecto a su abundancia en un estado de salud. Dicho fenómeno es conocido como disbiosis. Además, las comunidades microbianas mixtas pueden establecer interacciones de competitividad o cooperación, lo cual favorece el establecimiento de la enfermedad. De esta manera, las comunidades polimicrobianas pueden establecer relaciones de sinergismo, definido como el aumento de la capacidad de las bacterias para colonizar/persistir o aumentar los síntomas de una enfermedad en presencia de otras bacterias. En este sinergismo, diferentes miembros o combinaciones específicas de genes cumplen distintos roles para converger en la formación y estabilización de una microbiota patógena (Hajishengallis and Lamont 2012).

El grupo de bacterias que se ha asociado más fuertemente a esta enfermedad y específicamente a su severidad, han sido descritas como el “Complejo rojo”, grupo en el que se incluyen *Porphyromonas (P.) gingivalis*, *Tannerella (T.) forsythia* y *Treponema (T.) denticola* (Socransky and Haffajee 2005).

Dicha microbiota mixta interactúa con los tejidos del hospedero a través de distintos factores de virulencia produciendo así el aumento de mediadores inflamatorios y metaloproteinasas (Hernández et al. 2010; Silva et al. 2008), los que median la degradación de colágeno y matriz extracelular, así como la reabsorción ósea. De esta manera es la respuesta inflamatoria permanente del hospedero la que causa la destrucción de los tejidos de soporte del diente.

Ambas patologías, PAA y PC, presentan similitudes considerables (Segura-Egea et al. 2012):

1. Ambas son enfermedades crónicas infecciosas de la cavidad oral (Armitage, 2004)
2. En cuanto a su etiopatogenia, ambas condiciones se inician gracias a la presencia de comunidades polimicrobianas, en la cual prevalecen las bacterias anaerobias Gram-negativo que presentan complejas interacciones entre sí al establecerse en biofilms (Hajishengallis 2014; Rôças et al. 2014).

3. Ambas condiciones producen niveles elevados de marcadores pro-inflamatorios locales y sistémicos. A nivel local, se han detectado mediadores inflamatorios en fluido gingival crevicular de pacientes con enfermedad periodontal (AlRowis et al. 2014) y en tejidos periapicales de dientes afectados endodónticamente (Caplan et al. 2006). En un meta-análisis de (Gomes et al. 2013), se estableció que niveles séricos de Proteína C-reactiva, Interleuquina (IL)-1, IL-2, IL-6, Inmunoglobulina (Ig) A, IgG, y IgM se encontraban aumentados en pacientes con PAA respecto a pacientes sanos.

1.4 ETIOLOGIA PERIODONTITIS APICAL

Se han realizado muchos estudios para establecer cuáles son las bacterias que componen la compleja comunidad bacteriana que se encuentra en el sistema de canales radiculares y que inicia la PA. Tradicionalmente, se ha estudiado mediante técnicas de cultivo bacteriano, y en la actualidad, mediante métodos de secuenciación masiva del ARNr 16s (Siqueira et al. 2007). La introducción de las técnicas moleculares biológicas independientes de cultivo ha aumentado el conocimiento de la diversidad bacteriana en las infecciones endodónticas (Siqueira and Rôças 2005a; 2005b)

Se ha encontrado una alta prevalencia de bacterias como *Olsenella uli* (76.5%), *Prevotella baroniae* (71%), *Porphyromonas (P.) endodontalis* (65%), *Fusobacterium nucleatum* (53%), *Tannarella (T.) forsythia* (47%) y *Porphyromonas (P.) gingivalis* (36%) ((Rocas et al. 2010; Rôças et al. 2006; Siqueira et al. 2008) en canales radiculares de dientes afectados con PAA.

En otro estudio, que investigó la presencia de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *Prevotella (P.) intermedia* y *Prevotella (P.) nigrescens* por método de cultivo y PCR en dientes con infección endodóntica primaria, encontró que *P. gingivalis* era muy difícil de aislar mediante cultivo (1%), en cambio se detectó en un 38% de las muestras al ser analizadas mediante PCR. Para *P. endodontalis* ocurrió algo similar, ya que no fue detectada por cultivo pero si por PCR en un 25% de las muestras. La identificación por PCR también mostró altos niveles de detección para *P. intermedia* (33%) y *P. nigricens* (22%) (Gomes et al. 2005).

Por otra parte, en muestras de abscesos apicales de pacientes brasileños, se ha

encontrado prevalencia de *Treponema (T.) denticola* (73% de los casos), *P. endodontalis* (70%) y *T. forsythia* (57%) (Rocas et al. 2010; Rôças et al. 2006). En otra investigación, que buscaba la prevalencia de las bacterias componentes del complejo rojo, se encontró que al menos un miembro del complejo rojo estaba presente en el 84% de los casos estudiados. *T. denticola*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* fueron detectadas en un 65.6%, 43,7% y 40,6% de los casos, respectivamente (Ozbek and Ozbek 2010).

Tabla n°1: Prevalencia bacterias en canales apicales en dientes con PAA y abscesos apicales

Estudio	Especies detectadas y prevalencia (%)	Muestras	Gen target
Gomes et al, 2005	<i>P. gingivalis</i> (38%) <i>P. intermedia</i> (33%) <i>P. endodontalis</i> (25%) <i>P. nigrescens</i> (22%)	Canal endodóntico en infección endodóntica primaria	ADNr 16s
Rocas et al, 2006	<i>T. denticola</i> (73%) <i>P. endodontalis</i> (70%) <i>T. forsythia</i> (57%)	Absceso apical Pacientes brasileños	ARNr 16s
Siqueira et al, 2008	<i>P. gingivalis</i> (36%)	Canales PAA	ARNr 16s
	<i>P. gingivalis</i> (46%)	Canales PAS	
	<i>P. gingivalis</i> (67%)	Absceso apical	
Rocas et al, 2010	<i>O. uli</i> (76,5%) <i>P. baroniae</i> (71%) <i>F. nucleatum</i> (53%) <i>P. endodontalis</i> (65%) <i>T. forsythia</i> (47%)	Fragmentos dientes extraídos	ARNr 16s
Ozbek y Ozbek, 2010	<i>T. denticola</i> (65.6%) <i>P. gingivalis</i> (43.7%) <i>T. forsythia</i> (40.6%)	Abscesos apicales	ARNr 16s

Dentro de todas estas especies bacterianas, merecen especial atención las del género *Porphyromonas*. Varios estudios han mostrado que *P. gingivalis* y *P. endodontalis* están presentes y se asocian con el desarrollo de infecciones endodónticas sintomáticas y asintomáticas (Baumgartner et al. 2004; Rocas et al. 2010; Siqueira et al. 2008). Es así como *P. gingivalis* y *P. endodontalis* se encuentran presentes en infecciones endodónticas entre un 36 a un 44% y 25 a 65% respectivamente (Rocas et al. 2010; Rôças et al. 2006; Siqueira et al. 2008).

P. gingivalis se ha posicionado como un patógeno clave en la progresión y severidad de diferentes tipos de enfermedades periodontales (Mysak et al. 2014). Se ha demostrado que esta bacteria puede invadir los tejidos periodontales y evadir los mecanismos de defensa del hospedero, para lo cual utiliza un pool de factores de virulencia que causan una desregulación de la respuesta inmune innata e inflamatoria (Bostanci and Belibasakis 2012).

P. gingivalis se adhiere a la superficie de las células del hospedero y posteriormente se incorpora intracelularmente mediante canales lipídicos en fagosomas primarios. Además activa la autofagia celular para proporcionarse un nicho donde poder reproducirse mientras suprime la apoptosis celular. Es así como la bacteria utiliza proteínas de la célula huésped obtenidas por autofagia para sobrevivir y replicarse dentro de la misma célula huésped (Bélanger et al. 2006). Por otra parte, también se ha demostrado que induce la producción de muchos mediadores inflamatorios, entre los que se encuentran Prostaglandina E-2 (PG E-2), Interleuquina (IL) -1 y -6 (Garrison and Nichols 1989; Takada et al. 1991). Además se ha demostrado que presenta una correlación positiva con lipoproteínas pro-aterogénicas (VLDL-IDL) en suero de pacientes con periodontitis marginal (Kallio et al. 2008).

Por su parte, *P. endodontalis* se presenta una elevada prevalencia en las infecciones endodónticas primarias y tendría un rol predominante en el desarrollo de la enfermedad (Rocas et al. 2010; Rôças et al. 2006).

1.5 FACTORES DE VIRULENCIA DE PATÓGENOS ENDODÓNTICOS

Las bacterias que componen la microbiota endodóntica, predominantemente, bacterias anaerobias Gram-negativo, interactúan con el hospedero a través de distintos factores de virulencia, entre ellos los más importantes son lipopolisacárido (LPS), antígeno K o cápsula, gingipaínas y fimbria (Botta et al. 1994). Dichos factores de virulencia están involucrados en el reconocimiento por parte de las células hospederas, en su internalización y en el desencadenamiento de señales intracelulares que modulan la respuesta celular (Laheij et al. 2015) Particularmente, el LPS es un glicolípido que ocupa la mayor parte de la superficie de las bacterias Gram-negativo. Al ser el mayor constituyente de la superficie bacteriana, es la primera línea de contacto con las células del hospedero y por lo tanto corresponde al antígeno más importante de éstas bacterias (Raetz and Whitfield 2002).

El LPS está compuesto de tres dominios estructurales distintos: Antígeno-O, Core y Lípido A. Lípido A o endotoxina, corresponde al componente más bioactivo de LPS. Su estructura difiere ampliamente entre distintas especies bacterianas Gram-negativo, dependiendo de las diferencias en la composición de los ácidos grasos, número de sitios de fosforilación y de los grupos sustitutos anclados a los residuos de fosfatos (Dixon and Darveau 2005).

En este contexto, se ha descrito que LPS de *P. endodontalis* y *P. gingivalis* junto a *P. intermedia* son capaces de producir la estimulación de IL-8 en cultivos sanguíneos de pacientes con numerosas lesiones endodónticas (Matsushita et al. 1999). Actualmente, no se han establecido las posibles consecuencias sistémicas de la infección por *P. endodontalis* en pacientes con PAA.

1.6 LPS Y RESPUESTA INMUNE

A pesar de que las infecciones periapicales causan un número de respuestas tisulares locales con el propósito de confinar la diseminación de la infección, la

periodontitis apical no es solamente un fenómeno local. En los últimos años, la hipótesis de que las infecciones de origen dental podrían tener un rol en el desarrollo de diferentes enfermedades sistémicas, especialmente aterosclerosis, han sido respaldadas por un número creciente de investigaciones (Cotti et al. 2011b; Cotti and Mercurio 2015).

Un estudio epidemiológico longitudinal realizado en hombres menores de 40 años demostró una relación entre la aparición de nuevas lesiones de origen endodóntico y el tiempo desde el diagnóstico de enfermedad coronaria, en éste hubo una prevalencia significativamente mayor de enfermedad coronaria en pacientes que autorreportaron historia de tratamiento endodóntico en relación con aquellos que no reportaron tratamiento (Caplan et al. 2009).

En línea con lo anterior, recientemente se reportó una asociación entre disfunción endotelial temprana, niveles séricos de IL-1, IL-2, IL-6 y dimetilarginina asimétrica ADMA y PA (Cotti et al. 2011a; Cotti et al. 2011b)

De modo similar, se reportó que los pacientes que habían sufrido enfermedad coronaria presentaban una mayor prevalencia de PA que controles sanos; así también presentaban mayor cantidad de dientes perdidos, caries, restauraciones en mal estado, tratamientos endodónticos y PC (Pasqualini et al. 2012). Posteriormente, en un estudio que asoció la presencia de PA y aterosclerosis en tomografías computarizadas, se encontró que los pacientes con al menos una lesión apical presentaban una mayor carga aterosclerótica que pacientes sin lesiones y también que, a mayor presencia de lesiones apicales, existía mayor probabilidad de detectar lesiones ateroscleróticas cuantificables y carga aterosclerótica mayor (Petersen et al. 2014).

En variadas investigaciones se ha propuesto que patógenos de la cavidad oral y sus productos (Beck et al. 2000), así como los mediadores inflamatorios resultantes de la reacción inmune-inflamatoria, podrían pasar a través de los tejidos periodontales inflamados y altamente vascularizados, hacia circulación general, causando de esta manera una respuesta a nivel sistémico (Segura-Egea et al. 2015; van der Waal et al. 2015).

La presencia de LPS, proveniente de bacterias anaeróbicas Gram-negativo causantes de PAA, es reconocido por el sistema inmune innato a través del receptor TLR4 (Toll-like receptor 4) que está presente en muchos tipos de células incluyendo macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Aderem and Ulevitch 2000).

La activación de TLR4 por el Lípido A desencadena la biosíntesis de diversas citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α (Tumor Necrosis Factor), IL 1- β IL-6, IL-8 y PG E-2 (Dinarello 1991; Rôças et al. 2014), colaborando de esta manera con la respuesta inmune inflamatoria por parte del hospedero. Dichas citoquinas, pueden ser liberadas en la circulación sistémica (Doyle et al. 2007), induciendo o perpetuando así niveles inflamatorios sistémicos elevados (Caplan et al. 2006).

Por otra parte, la presencia de patógenos endodónticos, también induce la respuesta sistémica humoral del hospedero, a través de la elevación de los anticuerpos séricos. Se ha demostrado que en pacientes con periodontitis rápidamente progresiva, los niveles séricos de anticuerpos IgG e IgA reactivos a *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* y anticuerpos IgA contra *P. intermedia* fueron significativamente mayores respecto a controles sanos (Albandar et al. 2001).

Específicamente en cuanto a la PA, se realizó una revisión sistemática y meta-análisis, para evaluar la relación entre esta enfermedad y su capacidad para modificar niveles sistémicos de marcadores de inflamación. Dicho estudio concluyó que existe evidencia que sugiere que la presencia de PA está asociada al aumento de niveles elevados de inflamación sistémica en humanos. El meta-análisis sugiere específicamente que los niveles de IgA, IgG e IgM en suero se encuentran aumentados en individuos con PA al compararlos con controles sanos (Gomes et al. 2013). Por otra parte, también se ha evidenciado que LPS de bacterias patógenas endodónticas, especialmente *P. gingivalis*, inducen una respuesta aumentada de IgG en suero de pacientes con alta cantidad de lesiones endodónticas, constatando que de esta forma que esta bacteria es capaz de inducir una respuesta inmune humoral del hospedero (Matsushita et al. 1999).

Tomando en consideración que PAA está asociada con desórdenes muy parecidos a los que se asocian con PC, la medicina “endodóntica” debería desarrollarse en el mismo patrón que la medicina “periodontal”: evaluando la asociación entre enfermedades sistémicas y endodónticas (Segura-Egea et al. 2015).

Si bien se ha descrito endotoxemia y aumento de anticuerpos séricos en pacientes infectados con *P. gingivalis* en Periodontitis Marginal, no existe evidencia respecto del potencial efecto sistémico asociado a PAA y en especial, a la infección endodóntica por *P. endodontalis*. Es necesario entonces, estudiar el rol de la PAA como posible factor de riesgo de otras enfermedades y particularmente cuando existe infección endodóntica por *P. endodontalis*.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

En sujetos con periodontitis apical asintomática y particularmente con infección por *P. endodontalis* y *P.gingivalis*, existen mayores niveles séricos de LPS. Esto induce la respuesta inmune humoral del hospedero generando niveles mayores de anticuerpos específicos contra *P. endodontalis* y *P. gingivalis* en pacientes con Periodontitis Apical Asintomática versus sujetos voluntarios sanos.

3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la respuesta inmune humoral y endotoxemia en pacientes con periodontitis apical asintomática en infección endodóntica con *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis* versus pacientes controles sanos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Identificar *P. endodontalis* y *P. gingivalis* en el biofilm endodóntico de pacientes con PAA

- Determinar concentración sérica de endotoxina en pacientes con PAA y controles.
- Determinar niveles séricos de anticuerpos IgG e IgA contra *P. endodontalis* y *P. gingivalis* en pacientes con PAA y controles.

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1 TIPO DE ESTUDIO: Estudio transversal

5.2 SELECCIÓN DE PACIENTES:

Los individuos fueron reclutados entre los pacientes que consultan espontáneamente en el Servicio de Diagnóstico de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se incluyeron 17 individuos entre 18 a 34 años de edad con diagnóstico de PAA y 24 voluntarios sanos. La PAA se definió como la presencia de un diente asintomático con pulpa necrótica (según test de sensibilidad pulpar) asociado a una zona radiolúcida periapical evidenciada radiográficamente, en la que puede o no haber una alteración de la sensibilidad o existir una ligera sensibilidad a la percusión o palpación (Gutmann et al. 2009).

Como criterios de exclusión se consideraron:

- Pacientes con cualquier enfermedad sistémica. Pacientes hipertensos (Presión arterial \geq 89/139 mm Hg)(National High Blood Pressure Education, 2004)
- Pacientes que presenten periodontitis marginal (periodontitis crónica y periodontitis agresiva), definidos los criterios de exclusión: Pérdida de inserción clínica (\geq 2 mm), aumento de profundidad de sondaje (\geq 3 mm) y sangrado al sondaje en más del 10% de los sitios de sondeo en el examen (Dezerega et al. 2012)

- Pacientes con indicación de endodoncia por causas distintas de PAA.
- Pacientes con índice de masa corporal $\geq 31,9 \text{ Kg/m}^2$.
- Pacientes con tratamiento antibiótico o antiinflamatorio durante los 3 meses previos al examen clínico.

Todos los protocolos y los procedimientos fueron aprobados por las directrices del Comité de Ética de la Universidad de Chile y de acuerdo con las normas éticas de la Declaración de Helsinki (Dezerega et al. 2012) y todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de ingresar al estudio.

5.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los participantes del estudio fueron evaluados en primera instancia por un periodoncista, el cual realizó un examen periodontal completo, sondeando en todas las piezas dentarias en 6 sitios (mesiovestibular, vestibular, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual). Se registró posición gingival, profundidad del sondaje y pérdida del nivel de inserción clínica, para valorar la presencia o ausencia de saco periodontal. Posteriormente, los pacientes fueron evaluados por un endodoncista quien determinó la presencia de uno o más dientes con diagnóstico de PAA (casos) o ausencia de PAA (controles) mediante examen clínico y radiografía periapical total. Los pacientes participaron de dos sesiones de destartraje supra y sub gingival e instrucción de higiene oral en dos sesiones consecutivas (1 vez por semana). Los pacientes con diagnóstico de PAA recibieron tratamiento endodóntico correspondiente.

Los antecedentes demográficos, hábito tabáquico, factores modificables de riesgo cardiovascular (presión arterial, hábito tabáquico, IMC, colesterol HDL, colesterol no HDL, hemoglobina glicosilada) se registraron en una ficha clínica formulada para el estudio (McMahan et al. 2005)

También se controló la presión sanguínea utilizando esfigmomanómetro digital RILESTER mod. N° 1725-145 ®, donde pacientes con valores mayores a

89/139 mm Hg fueron excluidos del estudio.

5.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

5.4.1 MUESTRAS DE CANALES RADICULARES

La obtención de muestras de canales radiculares en pacientes con PAA se realizó mediante condiciones asépticas estrictas durante el tratamiento endodóntico. Luego de la aislación del diente con dique de goma, se procedió a eliminar la placa supragingival con una cureta estéril (Hu-Friedy®). Se realizó desinfección del dique de goma, clamp y alrededores con alcohol desnaturalizado de 70°. Las restauraciones y/o caries fueron removidas con fresas estériles de alta y baja velocidad. Luego de completar el acceso endodóntico y la desinfección de la cámara pulpar con hipoclorito de sodio al 5%, se posicionaron tres conos de papel estériles puestos consecutivamente en el canal a aproximadamente 1 mm del ápice, basado en las radiografías diagnósticas con el fin de absorber los fluidos del canal. En el caso de canales radiculares secos, se introdujo una pequeña cantidad de solución salina estéril. Los conos de papel estériles fueron transferidos asépticamente en tubos contenedores de 500 µl de líquido de transporte reducido (RTF) (Siqueira et al. 2007).

5.4.2 MUESTRAS DE SUERO

En pacientes con PAA y voluntarios sanos se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena ante-cubital por personal paramédico calificado, se realizó análisis de HbG y perfil lipídico en laboratorio clínico del Hospital de la Universidad de Chile y posteriormente se extrajo el suero para la realización de los ensayos correspondientes.

6. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS *P. ENDODONTALIS* Y *P. GINGIVALIS*

La presencia de *P. endodontalis* y *P. gingivalis* en el biofilm endodóntico se identificó mediante PCR, cultivos bacterianos específicos y caracterización lipídica.

Los aislados de *P. endodontalis* y *P. gingivalis* fueron obtenidos de muestras dispersadas por mezcla, las que posteriormente fueron puestas en placas suplementadas con 5 mg/mL de agar sangre hemin-menadiona, las que fueron cultivadas de forma anaeróbica a 37°C por 7 a 14 días. Se tomaron ocho colonias por cada muestra y se confirmó la presencia por amplificación del gen ARNr 16s mediante PCR y secuenciación.

7. NIVELES DE ENDOTOXINAS EN SUERO

La concentración total de LPS o endotoxinas en suero se midió mediante ensayo comercial Limulus Amebocyte Lysate®, según indicaciones del fabricante, en muestras de suero diluídas 1:4 vol/vol en agua libre de endotoxinas (HyCult biotechnology b.v.). Dicho ensayo se basa en la activación de una proenzima sensible a la presencia y concentración de endotoxina. La enzima activada, a su vez, cataliza la división del substrato cromogénico del ensayo, el que puede ser medido espectrofotométricamente. (HyCult biotechnology b.v.). Dado que la absorbancia de las muestras está en directa relación con la cantidad de endotoxinas, la concentración total de endotoxinas se calcula mediante una curva estándar.

8. NIVELES DE ANTICUERPOS IgG E IgA EN SUERO

Los niveles de anticuerpos IgG e IgA anti *P. endodontalis* y *P. gingivalis* se determinaron desde suero congelado (-20°C) por ensayo de ELISA multiserotipo según se ha descrito en estudios previos (Pussinen et al. 2002). Dicho ensayo se basa en la detección de un antígeno específico de la bacteria por un anticuerpo enlazado a una enzima, capaz de generar un producto detectable como cambio de color, que se puede medir mediante espectrofotometría. En este caso los antígenos utilizados comprenden una mezcla de cepas, representando tres serotipos para *P. gingivalis* ATCC 33277 (serotipo a), W50 (serotipo b) y OMGS 434 (serotipo c) y un serotipo ATCC 35406 para *P. endodontalis*.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias entre grupos con PAA y controles se evaluaron con test t no pareado y Mann-Whitney para el análisis bivariado, y regresión lineal múltiple. Los datos fueron analizados mediante el software Stata v12. Se determinó significancia estadística con un $p < 0.05$.

10. RESULTADOS

Características demográficas y clínicas de los grupos de estudio

Se incluyeron 17 pacientes con diagnóstico de PAA y 24 individuos sanos. En la tabla n°2 se observan las características demográficas y clínicas de los grupos al inicio del estudio. En el grupo de individuos controles la edad promedio fue de 25.17 ± 3.19 y para los pacientes con PAA 25.69 ± 4.14 . La distribución por género fue de un 45.8% de mujeres para el grupo de controles y 35.2% para el grupo con PAA. No hubo variación estadísticamente significativa entre los grupos de estudio en ninguna de las características demográficas (edad, género, nivel educacional). Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de hábito tabáquico entre los pacientes controles versus pacientes con PAA ($p = 0.027$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los demás factores clásicos de riesgo cardiovascular modificables como: presión arterial, índice de masa corporal (IMC); colesterol de alta densidad (C. HDL), colesterol de baja densidad (C. LDL) triglicéridos y hemoglobina glicosilada (HbG) entre los grupos de estudio. (Tabla N° 2)

Tabla n°2: Factores de riesgo cardiovasculares en pacientes con PAA y controles

Variable	Controles (n=24)	PAA (n=17)	p
Edad (años)	25.17±3.19	25.69±4.14	0.33
Género (% mujeres)	11 (45.8%)	6 (35.2%)	0.41
Nivel educacional	3	3	0.07
Tabaquismo (% fumadores)	11 (45.8%)	2 (11.76%)	0.027*
P. Diastólica (mm Hg)	72.26±10.08	74.38±8.75	0.25
P. Sistólica (mm Hg)	124.17±13.49	120.94±8.11	0.8
IMC	24.28±2.99	25.5±3.59	0.12
COPD	9(1)	9(3)	0.18
C. total (mg/dL)	167.4±34.77	175.38±25.82	0.22
C.HDL(mg/dL)	60.59±20.03	54.13±16.93	0.85
C. LDL (mg/dL)	87.9±25.37	99.59±24.07	0.08
Triglicéridos(mg/dL)	81.5(78)	86.5(48)	0.75
HBg(%)	5.14±0.167	5.18±0.29	0.29

Datos expresados como promedios ± desviación estándar o mediana (rango intercuartil); con excepción de género, nivel educacional y tabaquismo que fueron expresados como frecuencias absolutas (%). n = número de individuos; IMC: Índice de masa corporal; COPD: Número de dientes cariados, obturados y perdidos; HBg: Hemoglobina glicosilada. *p<0.05.

Detección de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* en canales radiculares de pacientes con PAA

La detección de especies bacterianas *P. gingivalis* y *P. endodontalis* en canales radiculares de pacientes con PAA se muestra en la tabla n°3. En ella se evidencia la detección de *P. gingivalis* en 2 muestras (11.76%) y *P. endodontalis* en 5 muestras (29.4%) de un total de 17 casos con PAA

Tabla n°3: Frecuencias de detección de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* en canales radiculares de pacientes con PAA

Variable	Detección en casos con PAA (n=17)
<i>P. gingivalis</i>	2 (11.7%)
<i>P. endodontalis</i>	5 (29.4%)

Datos expresados como frecuencias absolutas (porcentajes)

Niveles de endotoxinas y anticuerpos IgG e IgA contra *P. endodontalis* y *P. gingivalis* en suero pacientes PAA y controles

Los niveles totales de LPS (EU/ml) o endotoxinas y anticuerpos IgG e IgA contra *P. endodontalis* y *P. gingivalis* en suero de pacientes con y sin PAA se presentan en la tabla n°4. Se observó un aumento de niveles de LPS en suero de pacientes con PAA respecto a controles, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Se observaron niveles mayores de anticuerpos IgG e IgA contra las bacterias estudiadas en pacientes con PAA, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

Tabla n° 4: Niveles de endotoxinas y anticuerpos IgG e IgA contra *P. endodontalis* y *P. gingivalis* en suero de pacientes controles y PAA

Variable	Controles (n=24)	PAA (n=17)	p
LPS (Eu/ml)	2.02(0.89)	2.14(1.62)	0.57
IgA <i>P. endodontalis</i> (EU)	1.16(1.05)	1.45(2.18)	0.61
IgG <i>P. endodontalis</i> (EU)	4.19±2.2	4.23± 2.3	0.48
IgA <i>P. gingivalis</i> (EU)	3.17(3.89)	3.38(3.75)	0.75
IgG <i>P. gingivalis</i> (EU)	7.07±3.33	7.69±3.01	0.27

Datos expresados como promedios ± desviación estándar o mediana (rango intercuartil); n = número de individuos; Ig: Inmunoglobulina; EU:Unidades estándar

Niveles de endotoxinas y anticuerpos séricos en pacientes con PAA según detección de *P. endodontalis* en canales radiculares de pacientes con PAA

Los niveles de LPS y anticuerpos séricos en pacientes con PAA según detección de *P. endodontalis* en canales radiculares se presentan en la tabla n°5. Los pacientes en los que no se detectó *P. endodontalis* presentaron significativamente mayores niveles totales de endotoxina (EU/ml) en suero versus pacientes en los que sí se detectó la bacteria ($p=0.002$).

Además se encontraron niveles significativamente mayores de anticuerpos IgG contra *P. endodontalis* en suero de pacientes que presentaban la bacteria (5.69 ± 1.43) versus los que no la presentaban (3.53 ± 2.46) ($p = 0,047$).

Tabla n°5: Niveles de LPS y anticuerpos IgG e IgA en pacientes con PAA según detección de *P. endodontalis* en canales radiculares

Variable	Pe ausente (n=12)	Pe presente (n=5)	p
LPS (EU/ml)	6.69(18.17)	1.87(0.23)	0.002*
Pe IgA (EU)	1.31(1.32)	3.08(1.63)	0.61
Pe IgG (EU)	3.53±2.46	5.69±1.43	0.047*

Datos expresados como promedios \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartil)

EU: Unidades estándar; Pe: *Porphyromonas endodontalis*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*; Ig:

Inmunoglobulina; n: número de individuos

11. DISCUSIÓN

La inflamación sistémica juega un rol importante en el desarrollo de diferentes enfermedades, como las enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y parto prematuro al nacer (Segura-Egea et al. 2012; van der Waal et al. 2015). La relación entre infecciones de origen endodóntico e inflamación sistémica es biológicamente factible, considerando que la enfermedad se inicia por un

desbalance en la microbiota presente en los canales radiculares, que se inclina por el sobrecrecimiento de bacterias anaerobias Gram-negativo (Rocas et al. 2010). Dichas bacterias presentan un glicolípido único en su superficie, conocido como endotoxina o LPS, que es un potente activador del sistema inmune innato, pues produce la estimulación de la proteína de superficie TLR4 (Toll-like receptor 4) en diferentes tipos de células, tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Aderem and Ulevitch 2000), determinando la liberación de mediadores pro-inflamatorios a nivel local y sistémico en un proceso conocido como endotoxemia (Doyle et al. 2007). La endotoxemia, por su parte induce o perpetúa los niveles inflamatorios sistémicos elevados, los cuales se asocian al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Caplan et al. 2006).

En el presente estudio, se hipotetizó que pacientes con PAA, particularmente infectados con *P. endodontalis* y *P. gingivalis*, tendrían mayores niveles de endotoxemia y en consecuencia se induciría la respuesta inmune humoral del hospedero, determinando así una mayor la producción de anticuerpos IgG e IgA contra *P. endodontalis* y *P. gingivalis* en suero. Se encontró que no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a niveles de LPS y anticuerpos séricos entre pacientes con y sin PAA, pero sí hubo diferencias en niveles de LPS y anticuerpo IgG anti *P. endodontalis* en pacientes con PAA con infección endodóntica por *P. endodontalis*

Para determinar la presencia de las bacterias estudiadas en canales radiculares de pacientes con PAA se realizaron cultivos bacterianos específicos y se confirmó la presencia de las especies estudiadas por amplificación del gen ARNr 16s mediante PCR y secuenciación. En pacientes con PAA, se detectaron ambas bacterias de estudio en canales radiculares, en donde *P. endodontalis* fue detectada en el 29.4% y *P. gingivalis* en el 11.7% de los casos. Si bien se pudo confirmar la presencia de ambas bacterias en la microbiota intracanal, la frecuencia de detección fue menor de la esperada. En estudios similares, en donde se tomaron también muestras de canales radiculares en pacientes con PAA, *P. endodontalis* se había aislado en el 25% a 70% de los casos y *P.*

gingivalis en un 38% y 36% (Gomes et al. 2005; Rocas et al. 2010; Siqueira et al. 2008). Para PAA, la prevalencia de *P. gingivalis* alcanzó el 46%, mientras que en otros estudios realizados en abscesos apicales, la frecuencia de detección de las bacterias fue de un 70% para *P. endodontalis* y de un 43.7% a 67% para *P. gingivalis* (Ozbek and Ozbek 2010; Rôças et al. 2006; Siqueira et al. 2008).

La endotoxemia puede ser determinada directamente por la concentración de LPS en suero o por métodos indirectos determinantes de endotoxemia, como concentraciones elevadas de proteína de unión de LPS (LBP), CD14 soluble y anticuerpos contra LPS de bacterias específicas (Pussinen et al. 2007). . Para la determinación de la endotoxemia se utilizó un ensayo que mide la concentración total de endotoxinas en suero (LAL) y para comprobar la respuesta inmune humoral de los participantes se determinaron los niveles de anticuerpos IgG e IgA en suero frente a la exposición de *P. endodontalis* y *P. gingivalis*. Aunque en los resultados del estudio no se encontró una asociación entre niveles de endotoxemia o de anticuerpos IgG e IgA contra *P. endodontalis* y *P. gingivalis* y PAA, sí se observó que los pacientes con PAA tendían a presentar niveles mayores, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados son contradictorios con los de otro estudio similar, en el que se investigó la respuesta inmunológica de pacientes con diferentes números de lesiones apicales frente a LPS de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. endodontalis* y *F. nucleatum*; en este estudio la inclusión se realizó por la presencia de Periodontitis Apical evidenciada radiográficamente, pero no se especificó el método de diagnóstico clínico. Se encontró que existían niveles mayores de IgG contra *P. gingivalis* para el grupo de pacientes con numerosas lesiones apicales, versus pacientes con pocas o ninguna lesión (Matsushita et al. 1999). Además, en un metaanálisis reciente se reportaron significativamente mayores niveles de IgA, IgG, y IgM inespecíficas en pacientes con PA respecto a pacientes sanos, con la diferencia que este estudio incluyó todos los tipos de periodontitis apical, y no solamente la del tipo asintomática (Gomes et al. 2013).

Nuestros resultados podrían explicarse sobre la base de que la respuesta inmune

humoral es específica, y por tanto no estaría asociada necesariamente a la presencia o no de la enfermedad, sino a la presencia de los patógenos específicos. Es por esto que, en el presente estudio analizamos endotoxemia y niveles de anticuerpos específicos anti *P. endodontalis* en los pacientes sobre la base de la detección de *P. endodontalis* en los canales radiculares de los dientes con PAA. En este análisis sí se encontraron diferencias significativas en los niveles de endotoxemia y anticuerpos IgG contra *P. endodontalis*. En cuanto a los niveles de endotoxinas, controversialmente se encontraron niveles menores en pacientes que presentaron infección por *P. endodontalis* versus pacientes que no presentaban la bacteria. Esto se debería, en parte, a que en ausencia de un método de determinación específico de concentraciones séricas de LPS derivado de los patógenos endodónticos en cuestión, se utiliza comúnmente el ensayo inespecífico de Limulus amoebocyte lysate (LAL), el cual mide las concentraciones totales y por lo tanto, es sensible a endotoxinas que derivan de diferentes especies de bacterias Gram-negativo en todo el organismo, y no sólo de los patógenos endodónticos. Por esta razón, los resultados son difíciles de interpretar, considerando que los niveles de endotoxemia corresponden a la sumatoria de todas las endotoxinas que se encuentran en circulación y que pueden provenir de otras bacterias anaerobias Gram-negativo como *Chlamydia pneumoniae*, *Escherichia Coli* y *Helicobacter pylori*, causantes de otras infecciones crónicas. Respecto de los niveles de anticuerpos anti *P. endodontalis* en suero de pacientes con PAA, se encontró niveles significativamente mayores de anticuerpos IgG (EU) (5.69 ± 1.43) en pacientes infectados por *P. endodontalis* versus aquellos pacientes en los que no se detectó (3.53 ± 2.46) ($p=0.047$). En línea con nuestros resultados, en otro estudio se determinó la presencia de dos bacterias periodontopatógenas en saliva, *A. Actinomycescomitans* y *P. gingivalis*, en pacientes con y sin periodontitis marginal y se asoció con niveles de anticuerpos específicos IgG e IgA en suero contra estas bacterias. En dicho estudio se demostró que los niveles de anticuerpos IgG e IgA se asociaron significativamente con la presencia de los patógenos correspondientes; en cambio, sólo se encontró una débil asociación con respecto a la presencia o

número de dientes con periodontitis (Pussinen et al. 2011). Por lo tanto, para ambos estudios el mayor determinante de la respuesta inmune humoral fue la presencia de las bacterias patógenas específicas en la cavidad oral (ya sea en saliva o en los canales radiculares) y no necesariamente la presencia o ausencia de la enfermedad (PC o PAA). Dentro de las fortalezas de este estudio se pueden mencionar que los participantes de ambos grupos de estudio presentaban características clínicas y sociodemográficas similares al inicio del mismo. Dentro de los factores de riesgo cardiovascular clásico, el hábito tabáquico fue el único parámetro que no tuvo distribución homogénea entre los grupos de estudio; sin embargo fue mayor en el grupo control.

Dentro de las limitaciones del estudio se encuentran el limitado tamaño de la muestra, que se debe principalmente a los criterios de inclusión y exclusión, con el objetivo de controlar potenciales confundentes. Entre ellos se cuentan la ausencia de enfermedades sistémicas de alta prevalencia, como hipertensión arterial y diabetes, las cuales presentan una prevalencia de un 13% y 3,8% en la población chilena respectivamente, para el grupo comprendido entre los 25 a 44 años de edad. Por otra parte también fueron excluidos pacientes con factores de riesgo cardiovascular como sobrepeso, el cual en nuestro país presenta una altísima prevalencia, pues afecta al 67,4% de la población entre 25 y 44 años de edad (Ministerio de salud. Encuesta nacional de salud 2009-2010) y la presencia de periodontitis marginales (Gamonal et al. 1998).

Si bien los resultados de este estudio no reflejaron una diferencia significativa en los niveles de endotoxemia y respuesta inmune humoral entre pacientes con PAA y con controles sanos, existió una tendencia de los pacientes con PAA a presentar niveles mayores. Por tanto, no podemos descartar que estos parámetros varíen en individuos con PAA. Por otra parte, a pesar de la baja frecuencia de detección de *P. endodontalis* en pacientes con PAA (n=5), se encontraron niveles significativamente mayores de IgG anti *P. endodontalis* en los pacientes infectados, lo que sugiere este patógeno es capaz de inducir una respuesta inmune humoral. De este modo, la respuesta

inflamatoria sistémica y eventualmente el cardiovascular asociado a PAA (Segura-Egea et al. 2015), podría explicarse más bien por la presencia de patógenos específicos con mayor virulencia y no a mera presencia de la enfermedad.

12. CONCLUSIONES:

1. Las especies bacterianas *P. endodontalis* y *P. gingivalis* fueron identificadas en canales radiculares de individuos afectados por PAA.
2. En pacientes con PAA existe una tendencia a presentar niveles séricos mayores de endotoxinas y anticuerpos IgG e IgA anti *P. endodontalis* y *P. gingivalis* versus individuos sanos, pero sin diferencias estadísticamente significativas.
3. Existen niveles significativamente mayores de anticuerpos IgG anti *P. endodontalis* en pacientes con PAA con infección endodóntica por este patógeno versus pacientes con PAA en los que no se identificó la bacteria.

BIBLIOGRAFÍA

- 1999 international international workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. Papers. Oak brook, illinois, october 30-november 2, 1999. 1999. *Ann Periodontol.* 4(1):i, 1-112.
- Aderem A, Ulevitch RJ. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 406(6797):782-787.
- Albandar JM, DeNardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn DM. 2001. Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 72(11):1463-1469.
- AlRowis R, AlMoharib HS, AlMubarak A, Bhaskardoss J, Preethanath RS, Anil S. 2014. Oral fluid-based biomarkers in periodontal disease - part 2. Gingival crevicular fluid. *J Int Oral Health.* 6(5):126-135.
- Armitage GC. 2004. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 34:9-21.
- Baumgartner JC, Siqueira JF, Jr., Xia T, Rocas IN. 2004. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod.* 30(3):141-144.
- Beck JD, Slade G, Offenbacher S. 2000. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. *Periodontol 2000.* 23:110-120.
- Bender IB, Bender AB. 2003. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod.* 29(6):383-389.
- Bhalla G, Astekar MS, Ramesh G, Kaur P, Sowmya GV. 2014. Collagenase-3 expression in periapical lesions: An immunohistochemical study. *Biotech Histochem.* 89(6):457-463.
- Bostanci N, Belibasakis GN. 2012. *Porphyromonas gingivalis*: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 333(1):1-9.
- Botta GA, Arzese A, Minisini R, Trani G. 1994. Role of structural and extracellular virulence factors in gram-negative anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis.* 18 Suppl 4:S260-264.
- Buhlin K, Gustafsson A, Pockley AG, Frostegard J, Klinge B. 2003. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. *Eur Heart J.*

- 24(23):2099-2107.
- Bélanger M, Rodrigues PH, Dunn WA, Progulsk-Fox A. 2006. Autophagy: A highway for porphyromonas gingivalis in endothelial cells. *Autophagy*. 2(3):165-170.
- Caplan DJ, Chasen JB, Krall EA, Cai J, Kang S, Garcia RI, Offenbacher S, Beck JD. 2006. Lesions of endodontic origin and risk of coronary heart disease. *J Dent Res*. 85(11):996-1000.
- Caplan DJ, Pankow JS, Cai J, Offenbacher S, Beck JD. 2009. The relationship between self-reported history of endodontic therapy and coronary heart disease in the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Dent Assoc*. 140(8):1004-1012.
- Choi JI, Seymour GJ. 2010. Vaccines against periodontitis: A forward-looking review. *J Periodontal Implant Sci*. 40(4):153-163.
- Cotti E, Dessì C, Piras A, Flore G, Deidda M, Madeddu C, Zedda A, Longu G, Mercurio G. 2011a. Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. *J Endod*. 37(12):1624-1629.
- Cotti E, Dessì C, Piras A, Mercurio G. 2011b. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. *Int J Cardiol*. 148(1):4-10.
- Cotti E, Mercurio G. 2015. Apical periodontitis and cardiovascular diseases: Previous findings and ongoing research. *Int Endod J*.
- Cutler CW, Shinedling EA, Nunn M, Jotwani R, Kim BO, Nares S, Iacopino AM. 1999. Association between periodontitis and hyperlipidemia: Cause or effect? *J Periodontol*. 70(12):1429-1434.
- Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, Garcia-Sesnich J, Ortega AV, Gamonal J, Hernandez M. 2012. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *J Inflamm (Lond)*. 9(1):8.
- Dinarello CA. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 77(8):1627-1652.
- Dixon DR, Darveau RP. 2005. Lipopolysaccharide heterogeneity: Innate host

- responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res.* 84(7):584-595.
- Doyle SL, Hodges JS, Pesun IJ, Baisden MK, Bowles WR. 2007. Factors affecting outcomes for single-tooth implants and endodontic restorations. *J Endod.* 33(4):399-402.
- Figdor D, Sundqvist G. 2007. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J.* 52(1 Suppl):S38-51.
- Gamonal JA, Lopez NJ, Aranda W. 1998. Periodontal conditions and treatment needs, by cpitn, in the 35-44 and 65-74 year-old population in santiago, chile. *Int Dent J.* 48(2):96-103.
- Garrison SW, Nichols FC. 1989. Lps-elicited secretory responses in monocytes: Altered release of pge2 but not il-1 beta in patients with adult periodontitis. *J Periodontal Res.* 24(2):88-95.
- Glickman GN, Bakland LK, Fouad AF, Hargreaves KM, Schwartz SA. 2009. Diagnostic terminology: Report of an online survey. *J Endod.* 35(12):1625-1633.
- Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *porphyromonas endodontalis*, *prevotella intermedia* and *prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by pcr. *Oral Microbiol Immunol.* 20(4):211-215.
- Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, Reynolds MA. 2013. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod.* 39(10):1205-1217.
- Gutmann JL, Baumgartner JC, Gluskin AH, Hartwell GR, Walton RE. 2009. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *J Endod.* 35(12):1658-1674.
- Hajishengallis G. 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 35(1):3-11.
- Hajishengallis G, Lamont RJ. 2012. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (psd) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 27(6):409-419.

- Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 352(16):1685-1695.
- Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mäntylä P, Rivera O, Dezerega A, Dutzan N, Sorsa T. 2010. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: A longitudinal study. *J Periodontol.* 81(11):1644-1652.
- Kallio KA, Buhlin K, Jauhiainen M, Keva R, Tuomainen AM, Klinge B, Gustafsson A, Pussinen PJ. 2008. Lipopolysaccharide associates with pro-atherogenic lipoproteins in periodontitis patients. *Innate Immun.* 14(4):247-253.
- Laheij AM, van Loveren C, Deng D, de Soet JJ. 2015. The impact of virulence factors of porphyromonas gingivalis on wound healing in vitro. *J Oral Microbiol.* 7:27543.
- Llambés F, Arias-Herrera S, Caffesse R. 2015. Relationship between diabetes and periodontal infection. *World J Diabetes.* 6(7):927-935.
- Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. 2012. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult brazilian population. *J Endod.* 38(3):297-300.
- Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. 1999. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod.* 25(12):795-799.
- McMahan CA, Gidding SS, Fayad ZA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC, Jr. 2005. Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. *Arch Intern Med.* 165(8):883-890.
- Ministerio de salud. Encuesta nacional de salud. 2009-2010.
- Moutsopoulos NM, Madianos PN. 2006. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: Paradigm of periodontal infections. *Ann N Y Acad Sci.* 1088:251-264.
- Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. 2014. Porphyromonas gingivalis: Major

- periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014:476068.
- Nair PN. 2004. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15(6):348-381.
- Offenbacher S. 2004. Maternal periodontal infections, prematurity, and growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 47(4):808-821; discussion 881-802.
- Ozbek SM, Ozbek A. 2010. Real-time polymerase chain reaction of "Red complex" (*porphyromonas gingivalis*, *tannerella forsythia*, and *treponema denticola*) in periradicular abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 110(5):670-674.
- Pak JG, Fayazi S, White SN. 2012. Prevalence of periapical radiolucency and root canal treatment: A systematic review of cross-sectional studies. *J Endod.* 38(9):1170-1176.
- Pasqualini D, Bergandi L, Palumbo L, Borraccino A, Dambra V, Alovisi M, Migliaretti G, Ferraro G, Ghigo D, Bergerone S et al. 2012. Association among oral health, apical periodontitis, cd14 polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. *J Endod.* 38(12):1570-1577.
- Petersen J, Glaßl EM, Nasser P, Crismani A, Luger AK, Schoenherr E, Bertl K, Glodny B. 2014. The association of chronic apical periodontitis and endodontic therapy with atherosclerosis. *Clin Oral Investig.* 18(7):1813-1823.
- Pussinen PJ, Könönen E, Paju S, Hyvärinen K, Gursoy UK, Huuonen S, Knuuttila M, Suominen AL. 2011. Periodontal pathogen carriage, rather than periodontitis, determines the serum antibody levels. *J Clin Periodontol.* 38(5):405-411.
- Pussinen PJ, Paju S, Mäntylä P, Sorsa T. 2007. Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: A review. *Curr Med Chem.* 14(22):2402-2412.
- Pussinen PJ, Vilkuna-Rautiainen T, Alfthan G, Mattila K, Asikainen S. 2002. Multiserotype enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic aid for periodontitis in large-scale studies. *J Clin Microbiol.* 40(2):512-518.
- Raetz CR, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 71:635-700.

- Rechenberg DK, Bostanci N, Zehnder M, Belibasakis GN. 2014. Periapical fluid rankl and il-8 are differentially regulated in pulpitis and apical periodontitis. *Cytokine*. 69(1):116-119.
- Rocas IN, Alves FR, Santos AL, Rosado AS, Siqueira JF, Jr. 2010. Apical root canal microbiota as determined by reverse-capture checkerboard analysis of cryogenically ground root samples from teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 36(10):1617-1621.
- Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF. 2006. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. *J Endod*. 32(12):1135-1138.
- Rôças IN, Siqueira JF, Del Aguila CA, Provenzano JC, Guilherme BP, Gonçalves LS. 2014. Polymorphism of the cd14 and tlr4 genes and post-treatment apical periodontitis. *J Endod*. 40(2):168-172.
- Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, López-López J, Martín-González J, Velasco-Ortega E, Sánchez-Domínguez B, López-Frías FJ. 2012. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 17(2):e356-361.
- Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. 2015. Endodontic medicine: Connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*.
- Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, Aravena O, Lastres P, Pozo P, Vernal R et al. 2008. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: Levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*. 35(3):206-214.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Silva MG. 2008. Prevalence and clonal analysis of porphyromonas gingivalis in primary endodontic infections. *J Endod*. 34(11):1332-1336.
- Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions in endodontic microbiology.
- Siqueira JF, Rôças IN. 2005a. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological

- diagnosis. *J Endod.* 31(6):411-423.
- Siqueira JF, Rôças IN. 2005b. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 31(7):488-498.
- Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SS, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. 2007. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16s rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol.* 22(4):266-271.
- Socransky SS, Haffajee AD. 2005. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 38:135-187.
- Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. 1991. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with bacteroides lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 59(1):295-301.
- van der Waal SV, Lappin DF, Crielaard W. 2015. Does apical periodontitis have systemic consequences? The need for well-planned and carefully conducted clinical studies. *Br Dent J.* 218(9):513-516.

ANEXOS Y APÉNDICES:

ANEXO 1

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: mherandezrios@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

.....

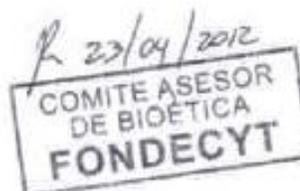
Ante cualquier duda puedo preguntar al Comité de Ética de la Facultad de Odontología cuyo presidente es el Dr. Juan Cortés; teléfono: 9781702 y su dirección es Facultad de Odontología de la U. de Chile, Edificio Administrativo, Oficina Vicedecanato, 4º piso, Sergio Livingston P. 943, Independencia.

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 2

ANNEX 1. CLINICAL RECORD

Name _____ Date _____ ID number _____

Gender	Female <input type="checkbox"/>		Male <input type="checkbox"/>	
Age (y)	<input type="text"/>			
Educational level	Básica incompleta (<8a) <input type="checkbox"/>	Básica completa <input type="checkbox"/>	Media completa <input type="checkbox"/>	Superior completa <input type="checkbox"/>
Systemic diseases	Current <input type="checkbox"/>	Former <input type="checkbox"/>	Specify _____	
Medical treatment last 6 months	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		
Periodontitis	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Gingivitis	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Current smoker	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>		
Non-HDL cholesterol (mg/dL)	<input type="text"/>			
HDL-cholesterol (mg/dL)	<input type="text"/>			
Blood pressure (mm/Hg)	<input type="text"/>			
Obesity (BMI) (kg/m ²)	<input type="text"/>			
Hyperglycemia (glucohemoglobin %)	<input type="text"/>			
N° of teeth with AAP	<input type="text"/>	N° of teeth with dentinal caries	<input type="text"/>	
Tooth number	<input type="text"/>	Rx lesion size (mm)	vertical <input type="checkbox"/>	horizontal <input type="checkbox"/>
Vitalometry	Positive <input type="checkbox"/>	Negative <input type="checkbox"/>	Percussion	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Control after treatment (1 week)			Date	<input type="text"/>
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
Rx filling	Adequate <input type="checkbox"/> Inadequate <input type="checkbox"/>			
Control after treatment (1 month)			Date	<input type="text"/>
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
Control after treatment 3 months			Date	<input type="text"/>
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
Lesion size (mm)	Vertical <input type="checkbox"/>	Horizontal	<input type="text"/>	
Control after treatment 6 months			Date	<input type="text"/>
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
Lesion size (mm)	Vertical <input type="checkbox"/>	Horizontal	<input type="text"/>	
Control after treatment 12 months			Date	<input type="text"/>
Asymptomatic	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
Lesion size (mm)	Vertical <input type="checkbox"/>	Horizontal	<input type="text"/>	