



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS
MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN
PERIODONTOLOGÍA**

**“INFLAMACIÓN SISTÉMICA E INFECCIÓN ENDODÓNTICA POR
Porphyromonas Endodontalis EN PACIENTES CON PERIODONTITIS APICAL
ASINTOMÁTICA”**

Patricia Raquel Huaman Chipana

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Titular. Dra. Marcela Hernández

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asist. Dr. Mauricio Garrido

Prof. Asist. Dra. Denisse Bravo

ASESOR EXPERTO

Prof. Dra. Macarena Valdés (estadística)

Adscrito a PROYECTO FONDECYT 1120138 y 1160741

Santiago - Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata

Patricia Raquel Huaman Chipana

ha sido aprobado por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Periodontología en examen rendido el 31 de agosto del 2017.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Alejandro Escobar A.

Prof. Dra. Andrea Paula Lima

Prof. Dra. Patricia Palma Fluxá

Prof. Dra. Ana Ortega Pinto

DEDICATORIA

A mi mamita Adita Chipana Aquino, por todo su esfuerzo y sacrificio en toda esta etapa académica, por su amor incondicional, por su fortaleza y por orar siempre por mí.

A mi papito Leoncio Huaman Suárez, por darme ratos de serenidad, por sus sabios consejos, por su complicidad, por apoyarme en mis decisiones y recibirme siempre con emoción en el calor de hogar.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marcela Hernández Ríos, por toda su paciencia, impulso y apoyo constante no sólo en lo académico sino también en lo personal. Por su valioso tiempo y creer en mí en esta etapa de mi posgrado.

A mi familia, por darme amor, confianza e identidad.

A la Universidad de Chile, por ayudarme a cumplir un objetivo más, por todas las experiencias vividas en esta etapa formativa; a las personas maravillosas que conocí y que me brindaron su amistad y ratos para compartir.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	VIII
MARCO TEÓRICO.....	1
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	52
RESUMEN.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXO 1	73
ANEXO 2.....	74
ANEXO 3.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Características demográficas y clínicas de los pacientes con PAA y controles	29
Tabla II. Perfil lipídico e HbG en pacientes con PAA y controles	30
Tabla III . Niveles séricos de marcadores de inflamación sistémica, endotoxinas e IgG anti- <i>P. endodontalis</i> en pacientes con PAA y controles	32
Tabla IV. Asociación entre PAA y riesgo cardiovascular (hsCRP \geq 1) ajustada por tabaquismo, nivel educacional e índice COPD	33
Tabla V. Características demográficas y clínicas de los pacientes con PAA según detección de <i>P. endodontalis</i> en canales radiculares	35
Tabla VI. Perfil lipídico y HbG en pacientes con PAA según detección de <i>P. endodontalis</i> en canales radiculares	36
Tabla VII. Marcadores de inflamación sistémica, endotoxemia y anticuerpos séricos IgG anti- <i>P. endodontalis</i> en pacientes con PAA según detección de <i>P. endodontalis</i> ...	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura N° 1.** Identificación de *P. endodontalis* por ensayo de PCR.....26
- Figura N° 2.** Niveles séricos de marcadores de inflamación sistémica en pacientes con PAA en línea base, 1 semana, 1 mes post tratamiento endodóntico.41
- Figura N° 3.** Esquema simplificado de la posible relación entre PAA, *P. endodontalis*, moléculas de adhesión endotelial solubles (VCAM-1s) y disfunción endotelial.51

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

COPD	Dientes Cariados, Perdidos, Obturados
CRP	Proteína C reactiva
hsCRP	Proteína C reactiva de alta sensibilidad determinada por método turbidimétrico
CRP (m)	Proteína C reactiva determinada por método multiplex
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ENS	Encuesta Nacional de Salud
FCG	Fluido crevicular gingival
GPA	Granuloma periapical
HbG	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidad
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPA	Lesión periapical
LPS	Lipopolisacárido
MPO	Mieloperoxidasa

<i>P.</i>	<i>Porphyromonas</i>
PA	Periodontitis apical
PAA	Periodontitis apical asintomática
PC	Periodontitis crónica
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PMN	Polimorfonuclear
QRI	Quiste radicular inflamatorio
RANKL	Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear kB
RTF	Líquido de transporte reducido
s	soluble
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1

MARCO TEÓRICO

Generalidades

La Periodontitis apical (PA), se define como la destrucción del tejido periodontal apical producto del proceso inflamatorio, generalmente como resultado de la infección bacteriana del sistema de canales radiculares de la pulpa dental (1, 2). Los microorganismos, principalmente bacterias anaerobias Gram-negativo y sus toxinas, pueden sobrepasar la capacidad resolutive de los mecanismos de defensa del organismo. La lesión progresará a la cronicidad, provocando una respuesta inflamatoria sostenida que intentará localizar la infección y proteger al hospedero de la diseminación bacteriana, a expensas de los tejidos periapicales, dando origen a una lesión osteolítica periapical (cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar) (3, 4). Clínicamente, y como resultado de la pérdida de estructura ósea, estas lesiones periapicales (LPAs) se observan radiográficamente como un área radiolúcida que en ausencia de sintomatología se denomina periodontitis apical asintomática (PAA) (5).

Histológicamente, estas LPAs pueden corresponder en términos generales a un granuloma periapical (GPA) o un quiste radicular inflamatorio (QRI) (2, 6). El GPA está compuesto por tejido de granulación y puede progresar a QRI por la estimulación de los restos epiteliales de Malassez por el proceso inflamatorio periapical, originando una cavidad patológica delimitada por una membrana de tejido conjuntivo revestida por

epitelio (4). Sin embargo, dado que el balance entre los agentes infecciosos y la respuesta del hospedero es un proceso dinámico, las LPAs crónicas pueden reagudizarse en forma secundaria y presentarse como sintomáticas o abscesos apicales agudos (2, 5). Este equilibrio dinámico en el periápice, a favor o en contra de la defensa del hospedero, determina el cuadro clínico de las lesiones (4).

El manejo clínico de la PAA implica el control de la infección a través de la terapia endodóntica y comprende la instrumentación biomecánica, desinfección y obturación del sistema de canales radiculares del diente afectado (7). Por lo tanto, el objetivo final del tratamiento endodóntico es eliminar y/o reducir significativamente los microorganismos presentes en el sistema de canales radiculares y de este modo permitir su resolución (8). En la PAA, los mediadores inflamatorios locales, las bacterias y sus productos, podrían pasar desde el periodonto apical a la circulación general, provocando una inflamación sistémica de bajo grado (9). La inflamación crónica de bajo grado estaría asociada con un riesgo elevado para el desarrollo de condiciones sistémicas, que incluyen enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes mellitus, como se ha reportado de modo similar a otros procesos inflamatorios crónicos, como la periodontitis crónica marginal (PC) (10-13).

Porphyromonas endodontalis

El agente etiológico de la PAA es una biopelícula bacteriana con predominio de bacterias anaerobias Gram-negativo (3). Las bacterias anaerobias pigmentadas de negro

son las más prevalentes en canales infectados y abscesos en endodoncia (14, 15) y en especial, especies del género *Porphyromonas* (*P*), tales como *P. endodontalis* y *P. gingivalis*, además de especies de *Prevotella*, tales como *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* (16). Estudios recientes basados en reacción de cadena de polimerasa (PCR) independientes de cultivos han reportado una mayor incidencia de estas bacterias comparadas con estudios previos basados en cultivos microbiológicos. Entre ellas, *P. endodontalis* se considera un patógeno clave en PA debido a su alta incidencia en lesiones endodónticas y sus factores de virulencia (17-19).

Los factores de virulencia de bacterias endodontopatógenas pigmentadas de negro incluyen adhesinas (fimbrias), cápsulas, proteínas de membrana externa y lipopolisacárido (LPS), también conocido como endotoxina (15). Particularmente, el actual interés en el estudio de *P. endodontalis* estaría relacionado por su papel preponderante en la PA crónica y el alto potencial patogénico por su relación filogenética con *P. gingivalis*.

El LPS forma parte integral de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativo y se libera al medio extracelular durante la desintegración por muerte o lisis bacteriana, como también durante su multiplicación y crecimiento (4, 20). El LPS se compone de tres dominios estructurales, el lípido A (responsable de la actividad endotóxica), el oligosacárido de núcleo (O-S) y el antígeno O (O-PS) (21). El lípido A provoca la liberación de numerosas citoquinas pro-inflamatorias, activa la cascada del

complemento y la cascada de la coagulación (20). En línea con esto, la alteración del contenido estructural del lípido A del LPS de *P. gingivalis* puede representar un mecanismo por el cual este patógeno es capaz de adaptarse a los entornos locales y tener efectos significativos en el tipo de respuesta por parte del hospedero (22).

En dientes con PA, mayores niveles de endotoxinas estarían relacionados con una mayor área de destrucción ósea periapical (23). La endotoxina es uno de los principales factores de virulencia implicados en el desarrollo de la inflamación periapical (24). El LPS de *P. endodontalis* (ATCC 35406) tiene la capacidad de promover la expresión de ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) por los osteoblastos de ratón (25). En células osteoblásticas humanas, se ha descrito que la expresión de RANKL fue promovida en respuesta frente al estímulo con *P. endodontalis* (ATCC 27067) y a la interleuquina 1- α (IL-1 α). Además, se sugiere que las células osteoblásticas humanas, pueden contribuir con la orquestación de las células inmuno-inflamatorias del hospedero en PA (26).

Estudios recientes demuestran que la exposición de líneas celulares osteoblásticas de ratón frente al LPS de *P. endodontalis* (ATCC 35406) redujo la viabilidad celular, y promovió la osteoclastogénesis y la resorción ósea mediadas por la expresión de interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el modelo murino. Además, el hidróxido de calcio inhibió la osteoclastogénesis inducida por LPS de *P.*

endodontalis, a través de la reducción de la actividad de la vía del factor nuclear (NF) kB (27, 28).

Adicionalmente, se demostró que *P. endodontalis* es capaz de sintetizar varios lípidos complejos con actividad biológica, que incluyen la promoción de respuestas pro-inflamatorias y la osteoclastogénesis, así como la inhibición de los osteoblastos. Aunque la identidad de los lípidos bioactivos específicos todavía queda por establecerse (29).

Asimismo, se ha demostrado que, entre los principales patógenos endodónticos, *P. endodontalis* es el único capaz de invadir las células endoteliales y músculo liso de las arterias coronarias humanas y de inducir respuestas inmunes celulares y humorales. En consecuencia, éste patógeno puede representar un riesgo potencial para enfermedad y eventos adversos cardiovasculares (CVs), ya que tanto la bacteria como sus productos, podrían filtrarse desde los tejidos periapicales a la circulación sistémica (30) y contribuir a un mayor riesgo de ECV, tales como la aterosclerosis, a través de mecanismos que incluyen activación de las células inflamatorias, aumento del estrés oxidativo y la modificación del metabolismo de las lipoproteínas (31).

Los anticuerpos son considerados como marcadores específicos de exposición sistémica a las bacterias patógenas. En PC, los niveles de IgG se encuentran más elevados contra *P. gingivalis* (32) y esta exposición sistémica puede aumentar el riesgo de accidente cerebrovascular (33). Anticuerpos (IgG e IgA) anti-*P. gingivalis* se han asociado con aterogénesis temprana y eventos CVs futuros, determinada por el aumento del espesor

de las t nicas  tima y media de la carótida (34). Sin embargo, no existen estudios sobre la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos específicos *anti-P. endodontalis* y los potenciales efectos sistémicos en pacientes infectados.

Marcadores de inflamación sistémica y disfunción vascular endotelial en PAA

Actualmente, poco se ha investigado sobre la posible asociación entre la inflamación pulpar y/o PA crónica y ECV (9, 35). Las ECVs tienen su origen en una disfunción inflamatoria endotelial y son influenciadas por los factores clásicos de riesgo CV, tales como tabaquismo, diabetes, hipertensión, dislipidemia, género, edad, nivel educacional, el aumento de los niveles séricos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la disposición genética, entre otras, que están claramente establecidos. En PAA, la inflamación crónica jugaría un papel central en la patogénesis y progresión de la aterosclerosis, y al mismo tiempo promovería eventos CVs agudos, tales como la ruptura de las placas ateromatosas y la trombosis coronaria (10, 36, 37). Estudios epidemiológicos han establecido que las ECVs estarían asociadas con una mayor incidencia de LPAs de origen endodóntico en individuos menores de 40 años (38).

Los posibles mecanismos de asociación entre la PAA y las ECVs serían similares a los que subyacen entre PC y ECV, donde las infecciones endodónticas podrían tener una diseminación metastásica, que resulta en una bacteremia transitoria, una injuria metastásica por la circulación de toxinas microbianas orales y/o una inflamación

metastásica derivada de una respuesta inmune frente a los microorganismos orales (9, 39).

En PAA se produce un encuentro dinámico entre los factores microbianos y las defensas del hospedero en la interface entre la pulpa radicular infectada y el ligamento periodontal que resulta en la inflamación local, destrucción de los tejidos periapicales, incluyendo la resorción de los tejidos duros y la formación de una LPA (4). La respuesta del hospedero se produce a través de la estimulación de los receptores tipo Toll (TLRs), que son altamente expresados en varios tipos de células asociadas con lesiones endodónticas e incluyen a monocitos/macrófagos, granulocitos, fibroblastos de la pulpa, precursores de osteoblastos y células mesenquimales (40).

La activación leucocitaria conlleva fagocitosis, respuesta humoral y celular con la producción de mediadores inflamatorios, que incluyen citoquinas, tales como IL-6, interleuquina-8 (IL-8), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-1 β (IL-1 β), IL-1 α , TNF- α , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), óxido nítrico (NO), interferón (IFN), prostaglandinas, RANKL (41, 42), enzimas como la mieloperoxidasa (MPO) y activación de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (43). Las citoquinas juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmuno-inflamatoria dentro del microambiente periapical. El equilibrio de los mediadores pro y anti-inflamatorios determina la naturaleza estable o progresiva de las LPAs (44).

El LPS liberado por las bacterias endodónticas a los tejidos perirradiculares, puede estimular la liberación de citoquinas pro-inflamatorias tales como, IL-1 α y TNF- α por los neutrófilos (PMN) y monocitos/macrófagos. Éstas inician y potencian la cascada inflamatoria que conduce a la destrucción del tejido periapical (45). Asimismo, IL-1 α y TNF- α pueden estimular la secreción de IL-6, ambas pertenecen a las principales citoquinas pro-inflamatorias y sus efectos son sinérgicos (46).

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que influye en la respuesta inmune antígeno-específica y puede mediar la reacción inflamatoria del hospedero frente a la lesión o infección. La liberación de IL-6 es producida por una variedad de células inmunes, incluyendo monocitos, fibroblastos, linfocitos Th-2 y células B activadas (47). IL-6 actúa clásicamente por la unión al receptor IL-6 (IL-6R), restringido a la superficie celular de los hepatocitos, monocitos, macrófagos y linfocitos. IL-6 también actúa en otros tipos de células, mediante la unión a su receptor soluble (sIL-6R) (48). Localmente, IL-6 promueve el reclutamiento de PMN y monocitos, así como la evolución entre inflamación aguda a crónica, que a su vez puede conducir a establecer la PAA. IL-6 también induce la expresión y la activación de MMPs y estimula la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea local (41, 49). En PAA se ha descrito aumento de IL-6 tanto a nivel del RNAm como de la proteína secretada en los tejidos periapicales (41, 47, 50) y podría estar relacionada con el desarrollo y progresión de las LPAs, participando como regulador de la respuesta inflamatoria local (46, 51). Además, IL-6

puede ejercer efectos sistémicos, tales como estimular la hematopoyesis, crecimiento y diferenciación de células T y B, y la reacción de fase aguda (46). La IL-6 sería el principal inductor de la expresión de la proteína C reactiva (CRP) hepática y de la respuesta de fase aguda asociada (11, 52, 53).

Aunque la principal fuente de CRP es el hígado, también se ha reportado la síntesis extra hepática de CRP en tejidos perirradiculares. En línea con lo anterior, en un estudio reciente en PAA, se demostró que las LPAs expresaron mayores niveles de mRNA y de CRP que el ligamento periodontal sano. Estos resultados sugieren que la expresión de CRP estaría regulada en asociación con la síntesis de IL-6 *in situ* (51).

De este modo, la producción de IL-6 a nivel periapical podría inducir la síntesis, tanto local como sistémica de CRP, lo que determinaría un aumento en los niveles séricos de estos mediadores (9, 47). Por tanto, la respuesta inflamatoria crónica en PAA, podría sostenerse no sólo localmente, sino también en forma sistémica, contribuyendo a incrementar el riesgo de desarrollar patologías CVs, entre otras (54).

Un estudio sistemático y meta-análisis en PA asoció el aumento de los niveles séricos de los mediadores inflamatorios, tales como IL-6, CRP, IL-1, IL-2 y de inmunoglobulinas como IgA, IgG e IgM con inflamación sistémica, al compararlos con controles sanos (35). La CRP es un reactante de fase aguda que participa directamente en la respuesta del sistema inmune del hospedero mediante su incremento por eliminación de células apoptóticas, liberación de interleuquina-10 (IL-10) y mediante la unión a antígenos (55).

La CRP estaría asociada con una alteración de la vasorreactividad endotelial y puede aumentar la expresión de moléculas de adhesión celular en células endoteliales. Actualmente, la CRP es considerada como un biomarcador de inflamación sistémica de bajo grado y útil en PAA (13, 56). Niveles séricos de CRP <1, 1-3 y > 3 mg/L se usan para denotar bajo, medio y alto riesgo CV (57).

Además, CRP regula la expresión del ligando CD40 (CD40L) y de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). CD40L se ha localizado en placas ateroscleróticas y puede inducir el factor tisular, un potente pro-coagulante y de esta forma contribuir con procesos aterogénicos (58).

La activación de las células endoteliales induce una serie de cambios físico-químicos en las moléculas de adhesión celular, tales como la Selectina-E, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular-1 (VCAM-1), entre otras, que conllevarían a la disfunción endotelial (10, 13). Estas son proteínas de superficie, que normalmente se expresan en la membrana celular, y facilitan el reclutamiento, adherencia y diapédesis de los leucocitos a los sitios de inflamación (11, 59). El rodamiento transitorio de éstas a lo largo del endotelio está mediado por Selectinas (-E y -P) y la fuerza de unión de estas células al endotelio está mediada por ICAM-1 y VCAM-1 (60, 61). La disfunción endotelial, a su vez, se asocia con la secreción de estas moléculas en el plasma y por tanto la identificación de sus formas solubles (Selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1)s (60). Se han detectado como formas solubles circulantes en el

suero humano y otros fluidos corporales (61). Estas moléculas de adhesión celular se detectan con más frecuencia en lesiones ateroscleróticas humanas que en el tejido arterial sano (60, 62).

ICAM-1, también conocida como CD54, es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas. Es un factor crítico en la adhesión de monocitos, linfocitos y neutrófilos al endotelio activado de los vasos sanguíneos y es inducible en diversos tipos de células durante la inflamación (63). La forma soluble de ICAM-1 puede ser detectada en el fluido crevicular gingival (FCG) y es el resultado de la escisión proteolítica de la molécula unida a la membrana (64). Se ha sugerido que ICAM-1 soluble en FCG sería el reflejo del daño evidente en las células endoteliales (61). Niveles elevados de ICAM-1 soluble en suero, estarían asociados con enfermedades coronarias y formación de placas de ateroma (65).

Asimismo, Selectina-E, también conocida como molécula de adhesión endotelial-1 y CD62, es activada por la IL-1 y TNF- α (66), y puede ser un factor importante que relacione los procesos de formación y ruptura de aneurismas cerebrales, mediante la promoción de la inflamación y el debilitamiento de las paredes arteriales cerebrales (67). Por tanto, las concentraciones circulantes de moléculas de adhesión solubles (ICAM-1, VCAM-1, Selectina-E) son predictores de riesgo CV y útiles en PAA (60).

Durante la PAA se produce un incremento del estrés oxidativo, mayoritariamente por los leucocitos, activando la síntesis de MPO. Ésta es una enzima lisosomal tetramérica

glicosilada que se expresa principalmente en las células mieloides, tales como monocitos y neutrófilos y cataliza la producción de ácido hipocloroso (68, 69). MPO tendría participación en la apoptosis de neutrófilos y en la regulación de la inflamación (70). La actividad de la MPO puede derivar en la modificación irreversible de proteínas y lípidos e incrementar los niveles de LDL, que promueven la aterogénesis (71, 72) Por tanto, niveles elevados de MPO en suero estarían asociados con riesgo de aterosclerosis y con eventos adversos cardiovasculares mayores (MACE), tales como infarto al miocardio, entre otros, y por tanto tendría utilidad clínica como marcador de riesgo CV en PAA (68, 72).

Un meta-análisis realizado recientemente sugiere que la PA se asociaría con inflamación sistémica, principalmente de los niveles de IgG. Sin embargo, la evidencia no fue concluyente, dado que el número de estudios fue muy limitado, con escaso control de confundentes y los diagnósticos periapicales, muy heterogéneos, incluyendo cuadros periapicales agudos, crónicos, como también con y sin asociación a LPA (35). Dada la posible asociación entre las LPAs y el potencial riesgo CV, se requiere la realización de nuevos estudios con un mejor diseño metodológico.

El tratamiento como modificador de la respuesta inflamatoria sistémica

Sobre la base de una etiopatogenia común, los mecanismos que vinculan la PAA con eventos CVs pueden ser similares con aquellos que vinculan enfermedad periodontal y

ECV, donde una respuesta inflamatoria localizada a la infección bacteriana conduce a la liberación de citoquinas en circulación sistémica, con efectos vasculares posteriores (9).

El manejo clínico de la PAA implica el control de la infección por el tratamiento del canal radicular del diente afectado (7). En pacientes con infecciones odontogénicas, CRP sérica suele estar aumentada (73), y niveles elevados constituyen un predictor de riesgo CV (13). En infecciones odontogénicas agudas, la CRP alcanza niveles séricos >5 mg/ml y se reduce luego de una semana del drenaje quirúrgico y tratamiento antibiótico a <5 mg/ml en PA aguda (73).

En infecciones endodónticas primarias, se encontraron correlaciones positivas entre las endotoxinas de bacterias Gram-negativo con TNF- α e IL-1 β , y correlaciones negativas para IL-10. Además, el número de especies de bacterias Gram-negativo presentes en los canales radiculares se consideraron factores de riesgo para la gravedad de la infección endodóntica y estarían asociados con el tamaño de la lesión (74).

Asimismo, después de la preparación químico-mecánica en dientes con PA, se produce una reducción de endotoxinas en el canal radicular independientemente del tipo de irrigante utilizado. Además, a medida que aumenta el número de sesiones del tratamiento con medicación intracanal, mejora la reducción de la endotoxina y da lugar a una activación intracanal progresivamente menor de células inflamatorias como los macrófagos, que estimulados promovieron una menor síntesis de IL-1 β y TNF- α (75). Además, el hidróxido de calcio puede inhibir la osteoclastogénesis inducida por LPS de

P. endodontalis, a través de la reducción de la actividad de la vía del factor nuclear (NF) kB (27, 28).

Una revisión sistemática y meta-análisis sugiere que el tratamiento endodóntico conservador en PA podría reducir la inflamación sistémica al disminuir los niveles séricos de diferentes biomarcadores. Los resultados post-tratamiento no mostraron diferencias significativas entre diversos marcadores séricos, tales como CRP, IgA, IgE, IgG, e IgM por la heterogeneidad de los estudios. Actualmente, no existe evidencia concluyente que sostenga la reducción de mediadores inflamatorios sistémicos al tratamiento, ya que los estudios son insuficientes. Dada la posible asociación entre PAA y el potencial riesgo CV, es de suma importancia realizar más estudios al respecto (35).

HIPÓTESIS

1) La PAA cursa con una respuesta inflamatoria sistémica frente a la exposición por infección endodóntica, particularmente por *P. endodontalis*. 2) El tratamiento endodóntico conservador conduce a la resolución de la inflamación periapical y sistémica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de marcadores de inflamación sistémica, endotoxinas e IgG anti-*P. endodontalis* en suero de voluntarios sanos, y de pacientes con PAA con y sin infección endodóntica por *P. endodontalis*, en línea base y post terapia endodóntica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar la presencia de infección endodóntica por *P. endodontalis* en pacientes con PAA.
2. Determinar los niveles basales de MPO, IL-6, hsCRP, ICAM-1s, VCAM-1s y Selectina-Es, endotoxinas y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en el suero de voluntarios sanos, y de pacientes con PAA con y sin infección por *P. endodontalis*.
3. Comparar los niveles de marcadores de interés en el suero de los pacientes con PAA en línea base, versus una semana y 1 mes después del tratamiento endodóntico conservador.

MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO:

Estudio con componente transversal y longitudinal prospectivo.

SELECCIÓN DE SUJETOS DE ESTUDIO:

Se seleccionaron 25 sujetos con diagnóstico de PAA y 23 voluntarios sanos entre 18-40 años en las clínicas de diagnóstico y endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

La PAA se definió según los criterios diagnósticos previamente descritos (5), que incluyen la presencia de una o más lesiones periapicales detectadas por radiografía retroalveolar, por caries dental en dientes con determinación clínica de pulpa no vital en base a los siguientes criterios:

- Dientes que no respondan a los tests de diagnóstico pulpar (frío; prueba con cloruro de etilo, calor; prueba con transpoliisopreno)
- Dientes con respuesta normal o levemente aumentada a la percusión
- Presencia de destrucción ósea apical observada al examen radiográfico (imagen compatible con GPA o QRI).

Se excluyeron del presente estudio a:

- Pacientes con patología sistémica
- Pacientes con enfermedad periodontal marginal (gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva).
- Pacientes con indicación de endodoncia por causas distintas a PAA.
- Pacientes en tratamiento con antibiótico o anti-inflamatorios en los últimos 3 meses.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes hipertensos (presión arterial sistólica ≥ 139 mm Hg y presión arterial diastólica > 89 mm Hg) (76).
- Pacientes con índice de masa corporal (IMC) $\geq 29,9$ Kg/m².

Con este fin, se realizó una evaluación general que incluyó anamnesis, examen oral y físico por un especialista en endodoncia (MG) y exámenes de laboratorio clínico. Se registraron en una ficha clínica formulada para el estudio los antecedentes demográficos y factores clásicos de riesgo cardiovascular que incluyen edad, género, hábito tabáquico, colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad), colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad), IMC, hemoglobina glicosilada (HbG); e índice COPD (Anexo 3). El índice COPD individual resultado de la sumatoria de dientes permanentes cariados, obturados y perdidos por caries, fue realizado por el mismo evaluador (MG).

Todos los protocolos y los procedimientos fueron aprobados por las directrices del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile y de acuerdo con las normas éticas de la Declaración de Helsinki (Anexo 1). Todos los voluntarios del estudio firmaron un consentimiento informado en forma previa al ingreso al estudio (Anexo 2).

TOMA DE MUESTRAS EN SUERO:

Obtención de muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre periférica en tubos sin anticoagulante a través de la punción de la vena antero-cubital por personal capacitado de los voluntarios sanos y de los pacientes con PAA al inicio (antes del tratamiento), una semana y 1 mes después del tratamiento endodóntico conservador. Para obtener el suero se centrifugó a 240 g durante 20 minutos a 4°C. Parte de las muestras de suero se congelaron a -80°C en las dependencias del Laboratorio de Biología Periodontal para su posterior análisis. Otra parte de la muestra fue enviada directamente al laboratorio del Hospital Clínico de la Universidad de Chile para la determinación de hemoglobina glicosilada (HbG), perfil lipídico y CRP basal.

Determinación de los niveles de CRP basal, perfil lipídico y HbG

Los niveles de CRP basal, perfil lipídico y HbG se determinaron en el laboratorio del Hospital Clínico de la Universidad de Chile a través del método Turbidimétrico (VITROS® 5600 Integrated System, Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, Piscataway, NJ, EE.UU).

Determinación de MPO, IL-6, CRP, ICAM-1s, VCAM-1s, Selectina-Es y endotoxinas

Los niveles de los marcadores de inflamación sistémica se determinaron a través del kit de Multiplex/Magnetic Luminex® (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Los datos se adquirieron mediante una plataforma Luminex MAGPIX® y se analizaron con el software MILLIPLEX AnalystR (Viagene Tech, Carlisle, MA, EE.UU.). Este inmunoensayo cuantitativo se basa en el uso de microesferas magnéticas codificadas por colores con tintes fluorescentes, cada uno recubierto con un anticuerpo de captura específico. Después que el analito se une al anticuerpo de captura en suspensión, se añade un anticuerpo de detección biotinilado y se incuba con estreptavidina-ficoeritrina conjugado (Strep-PE), que representa la molécula informadora. A continuación, se permite que las microesferas pasen a través de un láser, que excita los colorantes internos que marcan las microesferas y un segundo láser mide la señal de (PE), el

colorante fluorescente en la molécula informadora. La intensidad de la señal correspondiente a la curva estándar viene dada por cada set de microesferas. Los datos se expresaron en ng/ml.

Los niveles de endotoxinas se determinaron a través del ensayo LAL (Limulus Amebocyte Lysate® (QLC-1000®, Lonza), según indicaciones del fabricante. Dicho ensayo se basa en la activación de una proenzima sensible a la presencia y concentración de endotoxinas. La enzima activada cataliza la división del substrato cromogénico del ensayo, el que puede ser medido espectrofotométricamente. Las muestras de suero fueron diluidas 1:4 vol/vol en agua libre de endotoxinas Milli-Q® para obtener un volumen final de 50 µL. En el ensayo se prepara una curva estándar con concentraciones de endotoxinas de 1,0; 0,5; 0,25 y 0,1 UE/mL y se realiza la medición espectrofotométrica de las muestras a 405 nm (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, Usa). La absorbancia está dada en relación directa con la cantidad de endotoxinas. La concentración de endotoxinas se calculó mediante la curva estándar. Los datos se expresaron como unidades de endotoxina (UE)/mL.

Determinación de los niveles de anticuerpos IgG anti- *P. endodontalis*

Los niveles de anticuerpos séricos de IgG anti-*P. endodontalis* se determinaron por ensayo ELISA según se ha descrito en estudios previos (77, 78). 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 por espectrofotometría. El antígeno para *P. endodontalis* fue el serotipo ATCC™ 35406®. El antígeno se preparó previo cultivo de la cepa en placas con agar *Brucella* con 5% sangre de caballo suplementado con hemina y vitamina K₁ por 5 días en medio anaeróbico a 37°C. Se verificó la pureza de los cultivos mediante el análisis morfológico de las colonias y tinción Gram. Los cultivos fueron colectados y fijados en 0,5 % de formalina-PBS durante toda la noche a 4°C y lavados 3 veces con PBS. La densidad de las suspensiones bacterianas en el tampón de antígeno (PBS, 0,5% de albúmina de suero bovino, 0,05% Tween 20) se ajustó en una absorbancia de 0,15 a 580 nm. Las microplacas (Ciniplate Uni; Labsystems, Helsinki, Finlandia) fueron cubiertas con la cepa y se incubaron a temperatura ambiente por 4 horas y posteriormente a un ambiente de 4°C para una incubación toda la noche. Las diluciones de suero para IgG anti-*P. endodontalis* fueron 1:100. La reacción antígeno-anticuerpo se visualizó utilizando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, en dilución 1:30.000, posteriormente se utilizó la solución sustrato preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante (OPD, Sigma, P9187) y se realizó la medición en espectrofotómetro a 492 nm (Spectrophotometer UV – 1601, Shimadzu).

MUESTRAS EN CANALES RADICULARES

Obtención de muestras endodónticas:

Se obtuvieron muestras del tercio apical del canal radicular al inicio del tratamiento bajo estrictas medidas de asepsia. Primero se realizó limpieza con piedra pómez. Luego de la aislación absoluta y unitaria del diente, se procedió a la desinfección del dique de goma, clamp y diente con agua oxigenada de 30 volúmenes por un minuto, luego hipoclorito de sodio al 5% por un minuto, posteriormente se inactivó el hipoclorito de sodio con tiosulfato de sodio al 10%. Se procedió a realizar la cavidad de acceso en dos etapas; en la primera etapa se eliminó caries sin acceder a cámara pulpar y se volvió a desinfectar usando el protocolo previamente especificado (H_2O_2 30%, NaOCl 5% y Tiosulfato de Sodio 10%) y se tomó una primera muestra de la cavidad posicionando un cono de papel por un minuto en una pared de dicha cavidad, esta muestra debió dar negativa para incluir dicho diente en el estudio.

Una vez logrado el acceso a cámara pulpar y canal se introdujeron tres conos de papel estériles en forma consecutiva durante un minuto 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 depositados en los canales radiculares fueron transferidos asépticamente en tubos contenedores con 1mL de medio de transporte

reducido (RTF) (79). Las muestras fueron mantenidas a 4°C y transportadas al laboratorio de microbiología para su procesamiento inmediato.

Extracción del ADN por “Boiling”

Las alícuotas de cada muestra (250 µL) se colocaron en tubos estériles libres de DNasa y RNasa. Las muestras fueron rotuladas y llevadas a calor con un termoblock (THOMAS CIENTIFICO) a 110 °C por 8 min. Posteriormente se refrigeraron a -20 °C por 8 min y centrifugaron a 20000 g por 5 min obteniendo un sobrenadante que se guardó en tubos nuevos a -20 °C para su procesamiento por PCR.

PCR para identificación de *P. endodontalis* en muestras endodónticas

La identificación de *P. endodontalis* de las muestras endodónticas se realizó por ensayo de PCR mediante amplificación del gen ARNr 16S según se ha descrito previamente. El ADN de la cepa de referencia (ATCC N° 35406) se usó como control positivo. Se utilizaron como partidores Fwd 5´ GCTGCAGCTCAACTGTAGT 3´ y Rev 5´ CCGCTTCATGTCACCATGT 3´ (80). La amplificación se realizó en 35 ciclos en un gradiente de entre 53°- 60° Celsius. Los tamaños de los amplicones fueron 672 pb y verificados por tinción de geles de agarosa Gel-Red bajo iluminación UV utilizando un sistema de imagen digital (KODAK Gel Logic 112), descrito previamente (81) .

Cultivos bacterianos e identificación de los aislados de *P. endodontalis*

Los aislados de *P. endodontalis* fueron obtenidos de muestras dispersadas por mezcla, las que posteriormente fueron sembradas en placas de agar sangre suplementadas con 5 mg/mL de agar sangre hemina-menadiona y cultivadas a 37°C en un sistema generador de atmósfera anaerobia (Oxoid®). Luego de incubar por 7 a 14 días se tomaron ocho colonias pigmentadas de negro por cada muestra y se sembraron cada una por separado en agar sangre hemina-menadiona incubándose en anaerobiosis durante 7 a 10 días a 37°C. Luego, las colonias fueron sometidas a prueba de fluorescencia, bajo luz ultravioleta y la adición de metanol (360nm), la cual debe ser negativo para *P. endodontalis* (82). A los aislados identificados fenotípicamente se les extrajo posteriormente el ADN utilizando un kit comercial (FAVORGEN ARNr 16S), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se determinó la cantidad de ADN extraído mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Spectrophotometer UV-11601, Shimadzu) (83). Se confirmó la presencia de *P. endodontalis* por PCR siguiendo la metodología de Ashimoto (84).

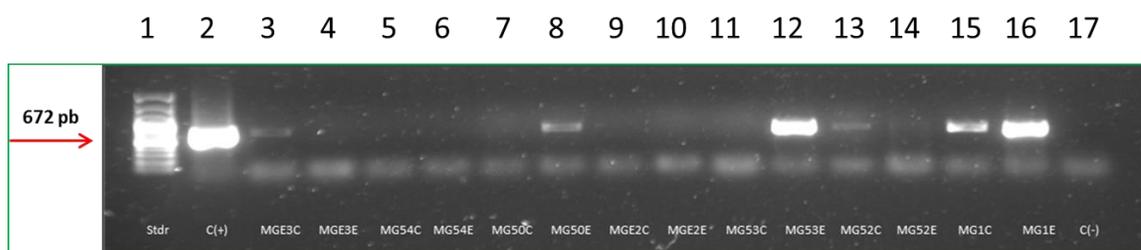


Figura N° 1. Identificación de *P. endodontalis* por ensayo de PCR

Electroforesis en gel de agarosa de PCR de las muestras endodónticas obtenidas por “boiling” para la identificación de ADN bacteriano de *P. endodontalis*. Los carriles 12 (MG53E) y 16 (MG1E) amplificaron a 672 pb y representan 2 pacientes distintos con periodontitis apical asintomática (E) y positivos para *P. endodontalis*. Std (estándar): Marcador de peso molecular de 100 pb (pares de bases). C (+): Control positivo (cepa ATCC 35406). C (-) Control negativo (agua nanopura).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se determinó utilizando el software STATAv11 (StataCorp, Collage Station, TX, EE.UU). Para la comparación entre los grupos con PAA y sanos y dependiendo de la normalidad de los datos (Prueba de Shapiro Wilk) se utilizó la Prueba T de Student pareada (comparaciones longitudinales) y no pareada (comparaciones en línea base) en el caso de que existiera distribución normal y prueba de Wilcoxon y Mann-Whitney, en el caso de que los valores se distribuyeran de manera no paramétrica para el análisis bivariado, y regresión logística múltiple. El número de pacientes se calculó por análisis de potencia estadística utilizando el programa estadístico Epiinfo 3.5.4, con un nivel de confianza del 95%, una potencia de 80% y un porcentaje estimado de exposición de 50% en el grupo enfermo en base a los valores previos de CRP (Marton y Kiss, 1992). Fueron necesarios para el estudio un mínimo de 14 sujetos por grupo. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. DETECCIÓN DE *P. Endodontalis* EN CANALES RADICULARES EN PACIENTES CON PAA

Se incluyeron un total de 48 individuos, 23 mujeres (47,92%) y 25 hombres (52,08%). La edad promedio fue de $25,98 \pm 4,42$ años. De éstos, 23 pacientes presentaron diagnóstico de PAA y 25 correspondieron a voluntarios sanos. A partir de los pacientes con PAA, se obtuvieron muestras de los canales radiculares y se identificó la presencia de *P. endodontalis* en 5 casos desde la muestra total por ensayo de PCR. La frecuencia de detección representa el 21,74% de los casos con PAA.

2. INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN PACIENTES CON PAA Y CONTROLES

2.1 Características demográficas y clínicas de los pacientes con PAA y controles

Las características demográficas (edad, género, nivel educacional), clínicas (presión arterial, IMC), hábito tabáquico, como factores clásicos de riesgo cardiovascular, e índice COPD de los pacientes con PAA y controles están registradas en la tabla I. En el grupo control la edad promedio fue $25,36 \pm 3,12$ y para los pacientes con PAA fue $26,65 \pm 5,50$ años. La distribución por género fue de un 52% de mujeres para el grupo control y de un 43,48% de mujeres para el grupo con PAA. El número de fumadores fue significativamente mayor en el grupo control versus el grupo con PAA ($p=0,01$). El

nivel educacional fue levemente mayor en el grupo control ($p=0,02$), mientras que el índice COPD fue levemente mayor en el grupo con PAA ($p=0,005$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las variables restantes (presión diastólica, presión sistólica e IMC) entre los grupos.

Tabla I. Características demográficas y clínicas de los pacientes con PAA y controles

Variable	Controles (n=25)	PAA (n=23)	<i>p</i>
Edad (años)	25,36 ± 3,12	26,65 ± 5,50	0,15
Género (% mujeres)	13 (52%)	10 (43,48%)	0,55
Nivel educacional	educación media completa	educación media completa	*0,02
Tabaquismo (% fumadores)	11 (44%)	3 (13,04%)	*0,01
P. diastólica (mm Hg)	72,0 ± 9,67	73,48 ± 7,48	0,29
P. sistólica (mm Hg)	122,24 ± 14,83	117,22 ± 10,18	0,09
IMC (kg/m²)	24,27 ± 2,86	25,03 ± 3,20	0,19
Índice COPD	9 (2)	10 (3)	*0,005

Los valores están expresados como promedios ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico) con excepción de género y tabaquismo que fueron expresados como frecuencias absolutas (%). PAA: Periodontitis apical asintomática. P. diastólica: Presión diastólica. P.

sistólica: Presión sistólica. IMC: Índice de Masa Corporal. COPD: Dientes permanentes cariados, obturados y perdidos por caries. * $p < 0,05$.

2.1.1. Perfil lipídico y HbG de los pacientes con PAA y controles

El perfil lipídico y la HbG en los pacientes con PAA y controles están representados en la tabla II. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo con PAA ($p > 0,05$). Sin embargo se observó una tendencia al aumento del colesterol LDL, radio LDL/HDL y triglicéridos en pacientes con PAA respecto de los controles. A pesar de estas diferencias, los valores en el grupo control y en el grupo con PAA se encontraron dentro de la normalidad (valores de referencia por análisis clínico).

Tabla II. Perfil lipídico e HbG en pacientes con PAA y controles

Variable	Controles (n= 25)	PAA (n= 23)	<i>p</i>
C. Total (mg/dL)	171,08 ± 31,98	169,13 ± 30,38	0,41
C. HDL (mg/dL)	57,64 ± 19,53	51,17 ± 15,34	0,10
C. LDL (mg/dL)	90,70 ± 25,34	97,69 ± 24,21	0,16
LDL/HDL (mg/dL)	1,78 ± 0,86	2,03 ± 0,59	0,13
Triglicéridos (mg/dL)	83 (78)	88 (52)	0,88
HbG (%)	5,14 ± 0,16	5,19 ± 0,26	0,23

Los valores están expresados como promedios \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartílico). PAA: Periodontitis apical asintomática. C. Total: Colesterol Total. HDL: Lipoproteína de alta densidad. LDL: Lipoproteína de baja densidad. HbG: Hemoglobina glicosilada.

2.2. Marcadores de inflamación sistémica, endotoxemia y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en suero de pacientes con PAA y sanos

Los niveles séricos de los marcadores de inflamación sistémica MPO, IL-6, CRP, ICAM-1s, VCAM-1s y Selectina-E soluble (s), endotoxinas y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en pacientes con PAA y controles se presentan en la tabla III.

Se observó una importante tendencia al aumento de los niveles séricos de la molécula de adhesión endotelial Selectina-Es en pacientes con PAA respecto de los controles. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, el valor p obtenido entre los grupos estuvo al límite de significancia estadística ($p=0,06$). Respecto de las otras moléculas de adhesión endotelial, se observó una tendencia al aumento en los niveles séricos de VCAM-1s en el grupo con PAA respecto del grupo control. También se observó una tendencia a presentar niveles mayores en PAA para MPO, hsCRP y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en pacientes con PAA versus los controles; sin embargo ninguna de las diferencias anteriores fue estadísticamente significativa. A pesar de esto, desde el punto de vista clínico hsCRP presentó niveles de riesgo cardiovascular moderado (1,5 mg/L) en pacientes con PAA versus pacientes sanos (0,96 mg/L).

Tabla III . Niveles séricos de marcadores de inflamación sistémica, endotoxinas e IgG anti-*P. endodontalis* en pacientes con PAA y controles

Variable	Controles (n= 25)	PAA (n=23)	<i>p</i>
MPO (ng/mL)	259,74 ± 112,14	285,16 ± 147,28	0,25
IL-6 (pg/mL)	26,70 (5,91)	26,70 (4,42)	0,50
hsCRP (mg/L)	0,96 (3,83)	1,5 (4,47)	0,32
CRP (m) (mg/L)	0,99 (4,49)	1,83 (4,65)	0,49
ICAM-1s (ng/mL)	1125,13 (563,45)	990,47 (455,56)	0,87
VCAM-1s (ng/mL)	753,39 ± 220,25	831,853 ± 224,72	0,11
Selectina-Es (ng/mL)	132,40 (49,5)	166,70 (110,3)	0,06
Endotoxina (UE/mL)	27,51 (41,61)	27,2 (32,24)	0,78
IgG <i>P. endodontalis</i> (UE)	4,34 (1,30)	5,41 (2,85)	0,10

Los valores están expresados como promedios ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico). PAA: Periodontitis apical asintomática. IL-6: Interleuquina-6. hsCRP: Proteína C reactiva de alta sensibilidad determinada por método turbidimétrico. CRP (m): Proteína C reactiva determinada por método multiplex. MPO: Mieloperoxidasa. ICAM-1s: Molécula de adhesión intercelular-1 soluble. VCAM-1s: Molécula de adhesión celular vascular-1 soluble. Selectina-Es: Selectina-E soluble. Ig: Inmunoglobulina. UE: unidades estándar.

2.3. Asociación entre PAA y niveles de hsCRP de riesgo CV

Para evaluar la relación entre PAA y niveles de riesgo CV medio y alto determinados mediante hsCRP sérica (≥ 1 mg/L) se desarrolló un modelo mediante regresión logística múltiple ajustado por tabaquismo, nivel educacional e índice COPD (tabla IV). Sin embargo, no se encontró asociación significativa ($p > 0,05$).

Tabla IV. Asociación entre PAA y riesgo cardiovascular (hsCRP ≥ 1) ajustada por tabaquismo, nivel educacional e índice COPD

hsCRP	OR	SE	valor <i>p</i>	95 % CI
PAA	3,68	2,73	0,08	0,86 – 15,79
Tabaquismo	0,96	0,68	0,95	0,24 – 3,83
Nivel educacional	1,82	1,44	0,44	0,39 – 8,62
Índice COPD	0,94	0,07	0,37	0,82 – 1,08

PAA: Periodontitis apical asintomática. hsCRP: Proteína C reactiva de alta sensibilidad determinada por método turbidimétrico. COPD: Dientes permanentes cariados, obturados y perdidos por caries. Valores ajustados de hsCRP de riesgo CV medio y alto (≥ 1 mg/L). OR: Odds Ratio. SE: Error estándar. CI: Intervalo de confianza. *p*: Nivel de significancia.

2.4. Características demográficas y clínicas de los pacientes con PAA con y sin infección endodóntica por *P. endodontalis*

Las características demográficas (edad, género, nivel educacional), clínicas (presión arterial, IMC), hábito tabáquico, como factores clásicos de riesgo cardiovascular e índice COPD de los pacientes con PAA según detección de *P. endodontalis* en canales radiculares se muestran en la tabla V.

En el grupo de pacientes en los que no se detectó *P. endodontalis* la edad promedio fue $26,78 \pm 6,12$ y para los pacientes en los que se detectó *P. endodontalis* fue $26,20 \pm 2,59$ años. La distribución por género fue de un 44,44% de mujeres para el grupo en los que no se detectó *P. endodontalis* y de un 40,0% de mujeres para el grupo en los que se detectó *P. endodontalis*. Con respecto al número de fumadores, se registraron 3 pacientes en el grupo en que no se detectó *P. endodontalis* y ninguno para el grupo de pacientes en los que se detectó *P. endodontalis*. El nivel educacional fue similar entre los grupos.

Respecto de las variables clínicas, la presión diastólica fue significativamente mayor en el grupo de pacientes en los que se detectó la presencia de *P. endodontalis* respecto del grupo en los que no se detectó ($p=0,004$). De hecho, los pacientes con *P. endodontalis* presentaron niveles de presión arterial sistólica y diastólica por sobre los 120 mm Hg y 80 mm Hg respectivamente, que los califican como prehipertensos. Las otras variables

clínicas (presión sistólica e IMC) tuvieron un mayor valor en el grupo en los que se detectó *P. endodontalis* respecto al grupo en los que no se detectó, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Finalmente el índice COPD fue mayor en el grupo en que no se detectó la bacteria respecto del grupo en el que sí se detectó. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grupos ($p>0,05$).

Tabla V. Características demográficas y clínicas de los pacientes con PAA según detección de *P. endodontalis* en canales radiculares

Variable	Pe ausente (n=18)	Pe presente (n=5)	<i>p</i>
Edad (años)	26,78 ± 6,12	26,20 ± 2,59	0,42
Género (% mujeres)	8 (44,44%)	2 (40,00%)	0,85
Tabaquismo (% fumadores)	3 (16,67%)	0 (0%)	0,32
Nivel educacional	educación media completa	educación media completa	0,44
P. diastólica (mm Hg)	71,44 ± 6,01	80,80 ± 8,29	*0,004
P. sistólica (mm Hg)	115,89 ± 9,22	122,00 ± 13,11	0,12
IMC (mg/m²)	24,52 ± 2,82	26,88 ± 4,15	0,07
Índice COPD	11 (3)	9 (1)	0,18

Los valores están expresados en promedios \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartílico) con excepción de género y tabaquismo que fueron expresados como frecuencias absolutas (%). PAA: Periodontitis apical asintomática. Pe: *Porphyromonas endodontalis*. P. diastólica: Presión diastólica. P. sistólica: Presión sistólica. IMC: Índice de masa corporal. COPD: Dientes permanentes cariados, obturados y perdidos por caries. * $p < 0,05$.

2.4.1. Perfil lipídico y HbG de los pacientes con PAA con y sin infección por *P. endodontalis*

El perfil lipídico y la HbG en pacientes con PAA según detección de *P. endodontalis* se muestran en la tabla VI. No se registró una variación estadísticamente significativa entre los pacientes con PAA en presencia o ausencia de *P. endodontalis* ($p > 0,05$). Los valores del perfil lipídico y HbG se encontraron dentro de la normalidad (valores de referencia por análisis clínico).

Tabla VI. Perfil lipídico y HbG en pacientes con PAA según detección de *P. endodontalis* en canales radiculares

Variable	Pe ausente (n=18)	Pe presente (n= 5)	<i>p</i>
C. Total (mg/dL)	171,11 \pm 31,35	162,00 \pm 28,58	0,28
C. HDL (mg/dL)	51,28 \pm 13,88	50,8 \pm 21,81	0,47
C. LDL (mg/dL)	99,42 \pm 24,28	91,44 \pm 25,63	0,26

LDL/HDL (mg/dL)	2,03 ± 0,55	2,01 ± 0,80	0,47
Triglicéridos (mg/dL)	95 (52)	85 (10)	0,62
HbG (%)	5,18 ± 0,23	5,20 ± 0,37	0,43

Los valores están expresados como promedios ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico). PAA: Periodontitis apical asintomática. Pe: *Porphyromonas endodontalis*. C total: Colesterol Total. HDL: Lipoproteína de alta densidad. LDL: Lipoproteína de baja densidad. HbG: Hemoglobina glicosilada.

2.5. Marcadores de inflamación sistémica, endotoxemia y anticuerpos séricos IgG anti-*P. endodontalis* en pacientes con PAA con y sin infección endodóntica por *P. endodontalis*

Los niveles séricos de los marcadores de inflamación sistémica MPO, IL-6, CRP, ICAM-1s, VCAM-1s y Selectina-Es, endotoxinas y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en pacientes con PAA con y sin infección endodóntica por *P. endodontalis* se muestran en la tabla VII.

Se encontró un aumento significativo en los niveles séricos de la molécula de adhesión endotelial VCAM-1s en los pacientes con PAA en los que se detectó *P. endodontalis* versus los pacientes en los que no se detectó ($p=0,02$). Las otras moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1s y Selectina-Es) registraron una leve tendencia al aumento en el grupo de pacientes con PAA en el que se detectó *P. endodontalis*, pero no presentó

significancia estadística. De modo similar, los niveles de IL-6 tendieron a aumentar en el grupo de pacientes en los que se detectó *P. endodontalis* respecto a los que no se detectó. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, el valor p se encontró al límite de la significancia estadística ($p=0.06$).

Los niveles de MPO, CRP y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* tendieron a ser menores en los pacientes en los que se detectó *P. endodontalis* versus los pacientes en los que no se detectó. Los niveles de endotoxinas fueron significativamente mayores en los pacientes en los que no se detectó *P. endodontalis* versus los pacientes en los que se detectó *P. endodontalis* ($p=0,02$).

Tabla VII. Marcadores de inflamación sistémica, endotoxemia y anticuerpos séricos IgG anti- *P. endodontalis* en pacientes con PAA según detección de *P. endodontalis*

Variable	Pe ausente (n=18)	Pe presente (n=5)	p
MPO (ng/mL)	285,24 ± 149,64	284,86 ± 155,32	0,49
IL-6 (pg/mL)	25,96 (2,94)	29,65 (4,46)	0,06
hsCRP (mg/L)	2,02 (4,35)	1,29 (1,23)	0,50
CRP (m) (mg/L)	2,00 (4,52)	1,83 (2,17)	0,88
ICAM-1s (ng/mL)	977,33 (289,25)	1370,77 (107,22)	0,10

VCAM-1s (ng/mL)	781,96 ± 202,92	1011,48 ± 226,29	*0,02
Selectina-Es (ng/mL)	161,5 (86,10)	166,7 (146,4)	0,94
Endotoxina (UE/mL)	29,72 (32,65)	14,91 (6,35)	*0,02
IgG <i>P. endodontalis</i> (UE)	5,48 (2,16)	4,37 (0,76)	0,23

Los valores están expresados como promedio ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico). PAA: Periodontitis apical asintomática. Pe: *Porphyromonas endodontalis*. IL-6: Interleuquina-6. hsCRP: Proteína C reactiva de alta sensibilidad determinada por método turbidimétrico. CRP (m): Proteína C reactiva determinada por método multiplex. MPO: Mieloperoxidasa. ICAM-1s: Molécula de adhesión intercelular-1 soluble. VCAM-1s: Molécula de adhesión celular vascular-1 soluble. Selectina-Es: Selectina-E soluble. Ig: Inmunoglobulina. EU: unidades estándar. * $p < 0,05$.

3. NIVELES SÉRICOS DE MARCADORES INFLAMATORIOS SISTÉMICOS EN PACIENTES CON PAA Y CONTROLES EN LINEA BASE Y POST TRATAMIENTO ENDODÓNTICO CONSERVADOR

Los niveles séricos de marcadores de inflamación sistémica MPO, CRP, ICAM-1s, VCAM-1s, Selectina-Es y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* de los pacientes con PAA al inicio, 1 semana y 1 mes post tratamiento endododóntico conservador se muestran en la figura N° 2.

Los datos revelan una reducción significativa de los niveles séricos de VCAM-1s en pacientes con PAA tras 1 semana ($642,38 \pm 173,71$, $n=18$; $p=0,008$) y 1 mes ($704,09 \pm 193,11$, $n=14$; $p=0,026$) post tratamiento endodóntico conservador en comparación con los niveles basales ($851,18 \pm 210,89$). Se observó una reducción significativa de los niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en pacientes con PAA 1 semana post tratamiento endodóntico conservador [$3,79$ ($2,39$), $n=17$; $p=0,02$] respecto de los niveles basales [$5,41$ ($2,85$)]. Asimismo, se observó una tendencia a la disminución al mes post tratamiento en comparación con los niveles basales [$4,73$ ($0,94$), $n=13$], pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre los niveles basales, 1 semana y 1 mes post tratamiento endodóntico para MPO, CRP, ICAM-1s y Selectina-Es ($p>0,05$).

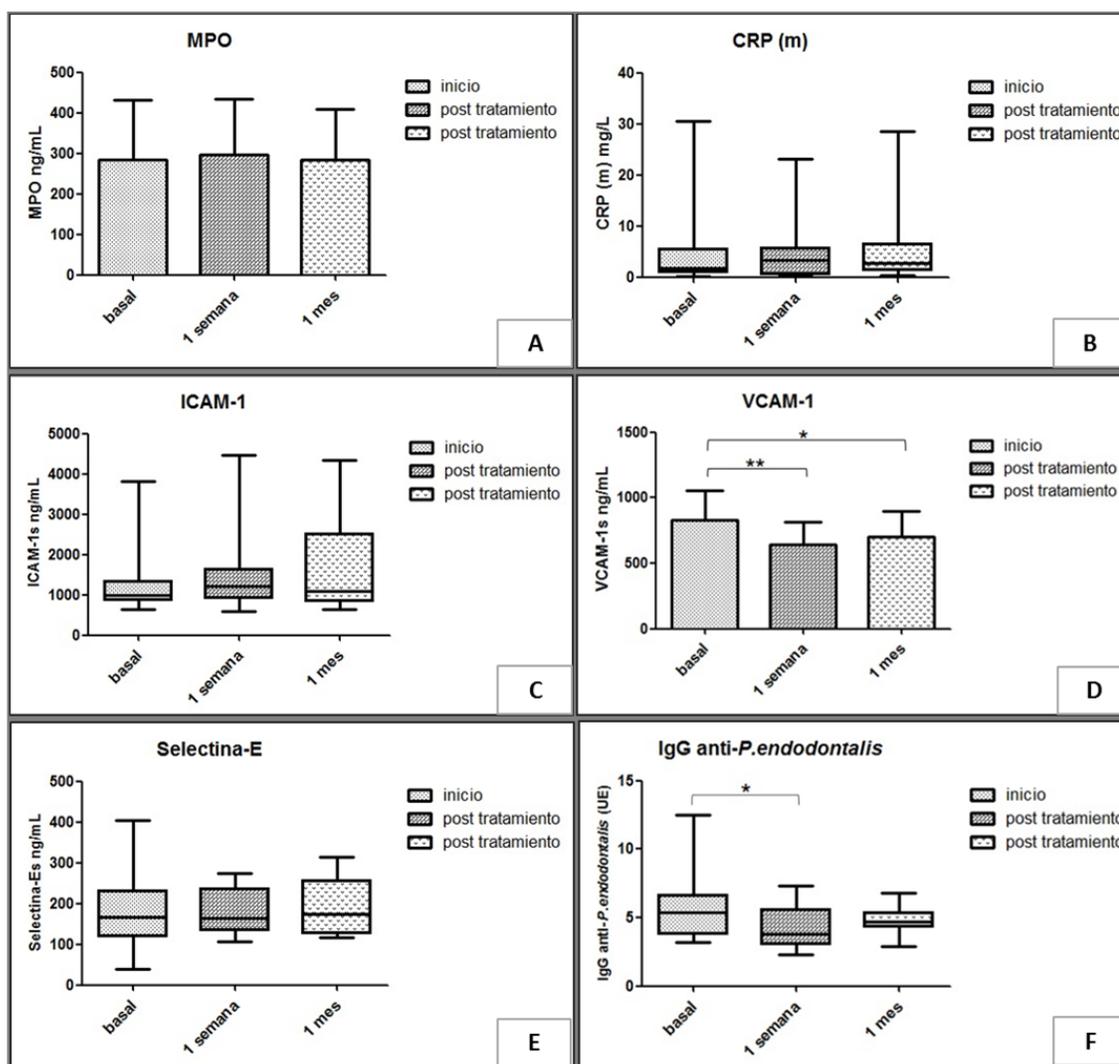


Figura N° 2. Niveles séricos de marcadores de inflamación sistémica en pacientes con PAA en línea base, 1 semana, 1 mes post tratamiento endodóntico.

A) Niveles de Mieloperoxidasa (MPO). B) Niveles de CRP(m) (Proteína C reactiva determinada por método multiplex). C) Niveles de ICAM-1s (Molécula de adhesión intercelular-1 soluble). D) Niveles de VCAM-1s (Molécula de adhesión celular vascular-1 soluble). E) Niveles de Selectina-Es (Selectina-E soluble). F) Niveles de anticuerpos IgG (Inmunoglobulina G) anti-*P.endodontalis*. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. A, D (test T pareado). B, C, E y F (Mann-Whitney).

DISCUSIÓN

La PAA se caracteriza por la formación de una lesión osteolítica periapical en ausencia de sintomatología clínica (5), producto de la respuesta inmuno inflamatoria crónica por contaminación microbiana del sistema de canales radiculares (4). El agente etiológico de la PAA es una biopelícula bacteriana con predominio de bacterias anaerobias Gram-negativo pigmentadas de negro, entre las que *P. endodontalis* juega un papel central debido a su elevada prevalencia y factores de virulencia (85). Estas bacterias, sus toxinas y productos pueden sobrepasar la capacidad resolutive de los mecanismos del hospedero, generando cambios inmunoinflamatorios locales que podrían cursar con una respuesta inflamatoria sistémica detectable en el suero (35).

Los pacientes con PAA, independientemente de la detección de *P. endodontalis*, presentaron riesgo CV medio en relación con los controles que presentaron riesgo CV bajo, determinados por los niveles séricos de hsPCR. El tratamiento endodóntico demostró una reducción significativa de los niveles séricos de VCAM-1s y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis*. Estos resultados, y particularmente la presencia de infección endodóntica por *P. endodontalis*, se asociarían con estadios iniciales de disfunción vascular endotelial y consecuentemente con aterogénesis (86).

Dentro de las características demográficas y clínicas asociadas con riesgo CV de los pacientes con PAA y controles, se observó una distribución similar para la edad y las

variables clínicas (presión diastólica, presión sistólica e IMC) entre los grupos. Estos resultados se encuentran en línea con lo esperado, dado que estas variables se controlaron por el diseño del estudio. El nivel educacional fue significativamente mayor en el grupo control respecto del grupo con PAA, mientras que el índice COPD fue significativamente mayor en el grupo con PAA respecto del grupo control. Datos publicados sugieren que el nivel socioeconómico representa un estilo de vida que puede influir en los patrones de comportamiento, repercutiendo indirectamente en la salud bucal del individuo (87). Respecto del hábito tabáquico, aunque éste se ha asociado con una mayor prevalencia de PA y como un posible factor de riesgo, los estudios no son concluyentes (88, 89).

Con respecto a los niveles séricos de marcadores de inflamación sistémica en pacientes con PAA versus los controles, los resultados de este estudio demostraron un aumento al límite de la significancia estadística para Selectina-Es comparado con controles sanos ($p=0,06$). Las formas solubles se deben a un proceso proteolítico que las libera del endotelio activado y representan una evidencia clara de activación y daño endotelial (90). Selectina-E soluble se ha asociado con la fisiopatología de enfermedades CVs y se encuentra aumentada en pacientes con angina inestable o infarto agudo de miocardio en comparación con los controles sanos (91, 92). Estas moléculas median la adhesión y la migración transendotelial de leucocitos como un paso crítico en la patogénesis de la aterosclerosis (62). Por tanto, el incremento de Selectina-Es en suero de pacientes con

PAA comparado con sujetos sanos se asociaría con daño endotelial y riesgo mayor de eventos CV futuros (67).

IL-6 está involucrada en la respuesta de fase aguda, cuyo efecto biológico determina la expresión y síntesis de CRP a nivel hepático (11). Además, IL-6 induce la síntesis local de CRP en fibroblastos de ligamento periodontal y LPAs en pacientes con PAA (51). Si bien no observamos una diferencia en los niveles de IL-6 en pacientes con PAA versus sanos, en este estudio se observó un aumento sérico de hsCRP en pacientes con PAA versus sanos (1,5 mg/L). Aunque éste no fue estadísticamente significativo, sí presenta relevancia clínica dado que se ha establecido que niveles séricos de hsCRP entre 1,0 y 3,0 mg/L representan un riesgo CV medio (57). Además, los pacientes con PAA mostraron una tendencia de 3,67 veces más probabilidad y/o riesgo de tener niveles de $hsCRP \geq 1$ mg/L que el grupo control, ajustados por factores de riesgo CV tales como el tabaquismo, nivel educacional e índice COPD ($p > 0,05$) (tabla IV).

La determinación de la endotoxemia (LPS) fue realizada por el ensayo LAL y la respuesta humoral fue evaluada por el nivel de anticuerpos IgG específicos frente a exposición por *P. endodontalis* sobre la base de la detección en los canales radiculares de los dientes con PAA. La endotoxemia no mostró variación en el grupo con PAA versus grupo control, mientras que los niveles de anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* tendieron a aumentar para el grupo con PAA versus los controles sanos ($p > 0,05$). La tendencia al aumento en los niveles de anticuerpos IgG fueron similares a los reportados

en un meta-análisis en PA (sintomática y asintomática) que evidenció mayores niveles séricos de anticuerpos IgG pero inespecíficos para pacientes con PA versus sujetos sanos (35). La presencia de *P. endodontalis* en pacientes con PAA se asociaría con una respuesta sistémica humoral que puede contribuir con la inflamación sistémica y riesgo CV (78).

Este estudio identificó la presencia de *P. endodontalis* en los pacientes con PAA en el 21,74% de los casos y se asoció con aumentos significativos de la presión diastólica y de los niveles séricos de moléculas de adhesión endotelial solubles, particularmente VCAM-1s en pacientes con PAA. *P. endodontalis* se ha identificado en diversos estudios como una especie bacteriana prevalente en canales infectados de dientes con PAA entre un 25 a 70% de los casos evaluados (16, 18, 85, 93). Al respecto, se han reportado diferentes tasas de detección de *P. endodontalis* en dientes asociados a lesiones endodónticas, que dependerían de factores relacionados con el hospedero y a la ubicación geográfica (93). La frecuencia de detección reportada en nuestro estudio es baja comparada con otros estudios y podría explicarse debido a que estos estudios fueron realizados en poblaciones distintas de la chilena y que el diseño de este estudio no está orientado a establecer la prevalencia de *P. endodontalis* en la población. Por otro lado, se han reportado menores frecuencias de detección para *P. endodontalis* en canales radiculares de individuos con PAA en comparación con PA sintomática (94).

En PAA, la infección endodóntica por *P. endodontalis* estimula los receptores específicos de las células inmunes (receptores tipo Toll) que desencadenan una compleja cascada de señalización intracelular que estimula la vía de señalización del factor nuclear (NF) κ B dando como resultado la sobreexpresión de moléculas de adhesión celular, citoquinas pro inflamatorias y otros mediadores de la inflamación (95). Los mecanismos osteoimmunológicos que vincularían la PAA con eventos CVs pueden ser similares con aquellos que vinculan la PC marginal con riesgo CV, probablemente a través de la bacteremia, endotoxemia y carga inflamatoria sistémica (78).

A pesar de la baja frecuencia con que *P. endodontalis* fue identificada en el presente estudio, se encontró un aumento significativo de los niveles séricos de VCAM-1s en pacientes con PAA infectados con *P. endodontalis* versus no infectados. VCAM-1 es expresada en el endotelio activado durante procesos inflamatorios como un ligando para las integrinas α 1 β 4 de leucocitos y plaquetas, para mediar el reclutamiento de leucocitos circulantes (96). Formas solubles de VCAM-1 se incrementan en enfermedad arterial coronaria, detectándose altas concentraciones plasmáticas en pacientes con infarto agudo al miocardio y con enfermedad vascular periférica (92, 97). En línea con lo anterior, observamos también un aumento significativo de la presión diastólica en presencia de *P. endodontalis*. La hipertensión arterial se asocia con alteraciones morfológicas y funcionales del endotelio vascular. Un estudio en pacientes con hipertensión arterial leve a moderada mostró mayores concentraciones plasmáticas de VCAM-1s en comparación

con los normotensos (98). Estudios *in vitro* evidencian que entre numerosos patógenos periodontales, *P. endodontalis* es la única capaz de causar daño endotelial directo (30). Estos resultados, en línea con los hallazgos ya descritos para PAA, sostienen que la infección endodóntica por *P. endodontalis* podría representar un factor de riesgo adicional para el asentamiento de disfunción endotelial y riesgo incrementado de aterogénesis (60).

Adicionalmente, se observó una tendencia al aumento de los niveles séricos de IL-6 en pacientes con PAA infectados con *P. endodontalis* versus los no infectados, y se encontraron al límite de la significancia estadística ($p=0,06$). Estos resultados denotarían que la infección endodóntica por *P. endodontalis* en PAA podría exacerbar la respuesta inflamatoria local y sistémica (46). Se ha reportado una asociación entre los niveles plasmáticos de IL-6 con disfunción endotelial temprana en pacientes con PA. De este modo, la infección endodóntica por *P. endodontalis* podría asociarse con disfunción endotelial temprana mediante daño directo al endotelio e indirectamente, mediante inflamación sistémica (10).

En relación con los niveles de anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis*, éstos tendieron a ser menores para el grupo de pacientes con PAA en los que se detectó la bacteria (4,37 UE) versus los que no se detectó (5,48 UE) ($p>0,05$). En contraste con nuestros resultados, estudios en PA encontraron una asociación entre mayores niveles de anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* y la presencia de *P. endodontalis* en pacientes con ≥ 2 LPAs versus

pacientes con una o ninguna LPA observada radiográficamente (78). Nuestros resultados sugieren que la respuesta inmune humoral estaría dada por la presencia de la enfermedad (PAA) y no por la presencia de bacterias patógenas específicas obtenidas de los canales radiculares; o bien, que la bacteria ocuparía otros nichos además del sistema de canales radiculares, que incluirían la biopelícula subgingival. De hecho, un estudio reciente reportó localización subgingival de *P. endodontalis* y respuesta humoral por IgG en pacientes con PA (78).

Los niveles de endotoxinas séricas fueron significativamente mayores en los pacientes en los cuales no se detectó *P. endodontalis* versus los pacientes en que se detectó. En línea con nuestros resultados, un estudio reciente demostró una relación entre mayores niveles de endotoxinas (LPS) circulantes y un mayor número de LPAs, sin embargo estos resultados no se asociaron directamente con la presencia de *P. endodontalis* (78). Aunque estos resultados son contradictorios a lo esperado, la endotoxemia refleja el reservorio total de endotoxina circulante que deriva de diferentes reservorios, que incluyen la microbiota comensal y patógena.

Finalmente, al evaluar los niveles séricos de los marcadores inflamatorios sistémicos en pacientes con PAA en línea base y post tratamiento endodóntico, los resultados de nuestro estudio demuestran una reducción significativa de los niveles séricos de VCAM-1s tras una semana y un mes post tratamiento. Asimismo, nuestro estudio demostró una reducción significativa de los niveles séricos de anticuerpos IgG anti- *P.endodontalis*

una semana post tratamiento respecto de los datos basales. Si bien se ha reportado que el tratamiento endodóntico en PA podría reducir los niveles séricos de diversos marcadores inflamatorios sistémicos, no se han evaluado moléculas de adhesión endotelial solubles como tampoco la respuesta humoral anti-*P. endodontalis* (35). Nuestros resultados sostienen que el tratamiento endodóntico se asocia con una reducción del potencial riesgo de disfunción endotelial (92), como también de los niveles séricos de IgG anti-*P. endodontalis*, probablemente producto de la reducción de la carga microbiana endodóntica y por tanto la hipótesis de que el tratamiento endodóntico conservador en PAA podría reducir la inflamación sistémica y por ende el riesgo de futuros eventos CV en razón de una modificación de la respuesta humoral mediada por *P. endodontalis* (35, 78). Sin embargo, es relevante determinar en estudios futuros si este efecto sería sostenible a largo plazo. Las potenciales asociaciones entre PAA, *P. endodontalis*, moléculas de adhesión endotelial solubles (VCAM-1s) y disfunción endotelial se grafican en la Figura N° 2.

En resumen, a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de marcadores de inflamación sistémica, endotoxinas y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en los pacientes con PAA versus los controles, se observaron tendencias importantes a favor del grupo con PAA particularmente para Selectina-Es que relacionaría esta enfermedad crónica con riesgo CV. Además los pacientes con PAA presentaron riesgo CV medio en relación con los controles que presentaron riesgo CV

bajo, determinados por los niveles séricos de hsCRP. Los pacientes con PAA infectados con *P. endodontalis* mostraron un aumento significativo de VCAM-1s sérica y presión diastólica; mientras que el tratamiento endodóntico conservador en pacientes con PAA redujo significativamente los niveles séricos de VCAM-1s y de anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis*. El tratamiento endodóntico conservador en pacientes con PAA contribuiría con la reducción de la inflamación sistémica y con el posible riesgo CV asociado.

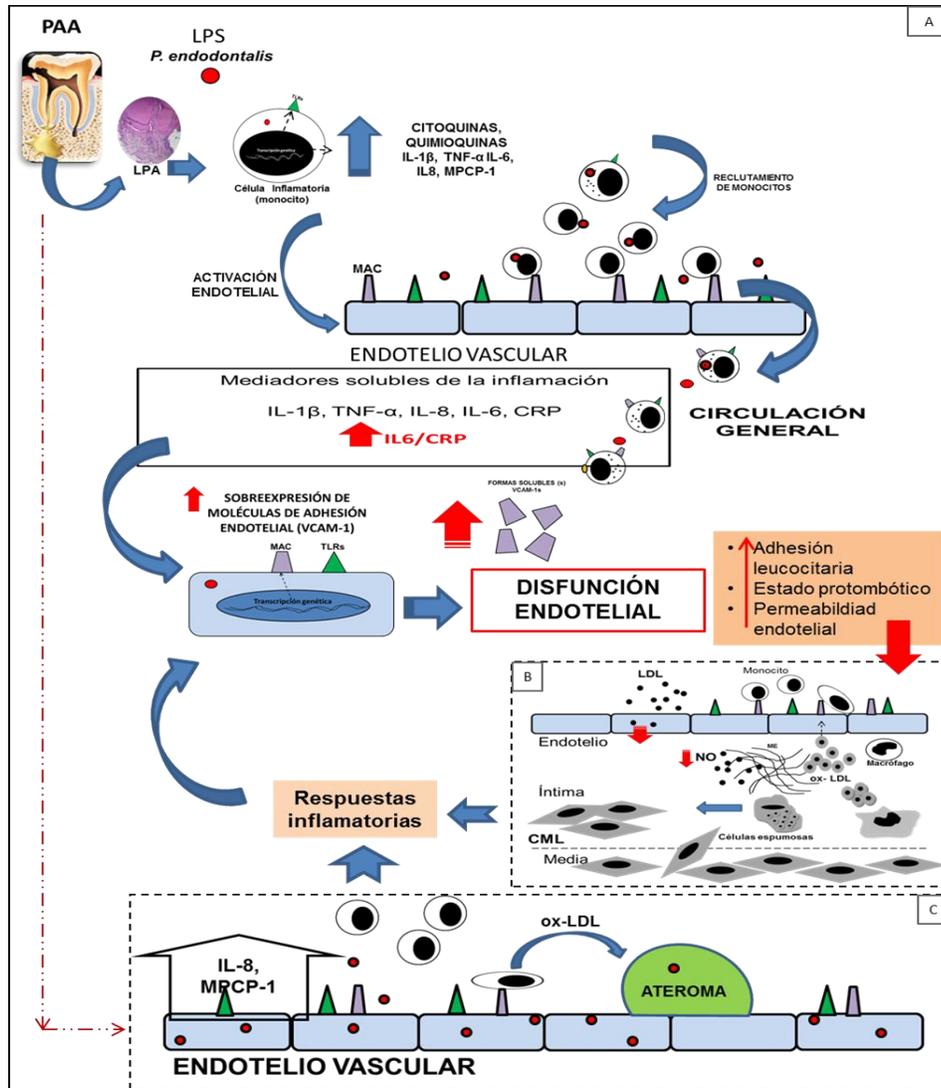


Figura N° 3. Esquema simplificado de la posible relación entre PAA, *P. endodontalis*, moléculas de adhesión endotelial solubles (VCAM-1s) y disfunción endotelial.

A) *P. endodontalis* en PAA promueve activación leucocitaria, respuestas inflamatorias locales que induce la expresión de moléculas de adhesión celular (MAC), receptores tipo Toll (TLR), quimioquinas y citoquinas. En el endotelio activado, el dominio extracelular de las MAC puede liberarse a la circulación general, asimismo el incremento de mediadores inflamatorios, LPS y productos bacterianos en la circulación puede promover la sobreexpresión de moléculas de adhesión endotelial, daño y disfunción endotelial. B) La pérdida paulatina de la capacidad del endotelio para controlar el tráfico de macromoléculas permite un mayor depósito de moléculas circulantes, tales como LDL. Éste exceso genera cambios químicos que promueven la liberación de moléculas de adhesión endotelial, respuestas inflamatorias locales y la futura formación de estrías lipídicas y placas ateroscleróticas. C) La invasión del endotelio vascular por *P. endodontalis* puede causar daño endotelial directo que promovería la disfunción endotelial y la inducción de respuestas inflamatorias locales, tales como el reclutamiento de monocitos, elevaciones de LDL oxidado (ox-LDL) y aterogénesis acelerada que potencian el riesgo CV.

CONCLUSIONES

1. Se identificó la presencia de *P. endodontalis* en el 21,74% de canales radiculares de individuos con PAA.
2. Los pacientes con PAA presentaron riesgo CV medio en relación con los controles que presentaron riesgo CV bajo, determinados por los niveles séricos de hsCRP.
3. Los niveles séricos de Selectina-Es tendieron a ser mayores en PAA al compararlos con controles sanos. Esta diferencia estuvo al límite de la significancia y podría representar un indicador de disfunción endotelial en PAA.
4. La infección por *P. endodontalis* en pacientes con PAA se asoció en forma estadísticamente significativa con el incremento de los niveles séricos de VCAM-1s ($p<0,05$) y niveles de IL-6 ($p=0,06$).
5. El tratamiento endodóntico conservador en pacientes con PAA redujo significativamente los niveles séricos de VCAM-1s tras una semana y un mes post tratamiento, asimismo los niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* tras una semana post tratamiento.

RESUMEN

Introducción: Estudios epidemiológicos han establecido una asociación entre la periodontitis apical asintomática (PAA) y enfermedades cardiovasculares, particularmente aterogénesis, sin embargo no existe evidencia mecanística que sustente dicha asociación. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de marcadores de inflamación sistémica, endotoxinas y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en suero de voluntarios sanos, y pacientes con PAA con y sin infección endodóntica por *P. endodontalis*, en línea base y post terapia endodóntica.

Materiales y métodos: Se incluyeron 23 pacientes con PAA y 25 voluntarios sin PAA, todos sistémicamente sanos, entre 18-40 años de edad que acudieron a la clínica odontológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Se excluyeron individuos con medicación sistémica, periodontitis crónica (marginal). Se determinaron los niveles de MPO, IL-6, CRP, ICAM-1, VCAM-1s, y Selectina-Es como marcadores de inflamación sistémica mediante ensayo multiplex, niveles de endotoxinas por ensayo LAL y anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* por ensayo de ELISA. Se determinó la presencia de *P. endodontalis* mediante PCR y cultivo bacteriano. Se determinó significancia estadística si $p < 0,05$.

Resultados: Se encontró una tendencia hacia niveles mayores de marcadores de inflamación sistémica entre PAA e individuos sanos ($p>0,05$), particularmente para Selectina-Es ($p=0,06$), mientras que hsCRP alcanzó niveles de riesgo CV medio (1,5mg/L). Los pacientes con PAA infectados con *P. endodontalis* mostraron un aumento significativo en la presión diastólica ($p=0,004$) y niveles séricos de VCAM-1s ($p=0,02$), mientras que IL-6 demostró tendencia al aumento ($p=0,06$), comparados con los no infectados. La endotoxemia fue significativamente mayor en pacientes con PAA no infectados versus infectados ($p=0,02$). Se encontró una reducción significativa de los niveles séricos de VCAM-1s tras una semana ($p=0,0008$) y un mes ($p=0,026$) post tratamiento respecto de los niveles basales. Asimismo se observó una reducción significativa de los niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* una semana post tratamiento en comparación con los niveles basales ($p=0,02$).

Conclusiones: Pacientes con PAA presentaron riesgo CV medio en relación con los controles que presentaron riesgo CV bajo, determinados por los niveles séricos de hsCRP. Pacientes con PAA infectados con *P. endodontalis* mostraron un aumento significativo en la presión diastólica y en los niveles séricos de VCAM-1s. El tratamiento endodóntico redujo los niveles séricos de VCAM-1s y los niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*P. endodontalis* en pacientes con PAA. El tratamiento endodóntico conservador contribuiría a reducir la inflamación sistémica y el potencial riesgo de disfunción endotelial asociado en pacientes con PAA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Belmar MJ, Pabst C, Martínez B, Hernández M. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(6):801-6.
2. Abbott PV. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis. *Endod Top.* 2004;8(1):36-54.
3. Rocas IN, Siqueira JF. Root Canal Microbiota of Teeth with Chronic Apical Periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11):3599-606.
4. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(6):348-81.
5. Gutmann JL, Baumgartner JC, Gluskin AH, Hartwell GR, Walton RE. Identify and Define All Diagnostic Terms for Periapical/Periradicular Health and Disease States. *Journal of Endodontics.* 2009;35(12):1658-74.
6. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and Apical Periodontitis: Study of Prevalence and Association with Clinical and Histopathologic Findings. *Journal of Endodontics.* 2010;36(8):1277-88.
7. Figdor D. Apical periodontitis: A very prevalent problem. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2002;94(6):651-2.

8. Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic Investigation of Root Canal–treated Teeth with Apical Periodontitis: A Retrospective Study from Twenty-four Patients. *Journal of Endodontics*. 2009;35(4):493-502.
9. Cotti E, Dessì C, Piras A, Mercurio G. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. *International Journal of Cardiology*. 2011;148(1):4-10.
10. Cotti E, Dessì C, Piras A, Flore G, Deidda M, Madeddu C, et al. Association of Endodontic Infection with Detection of an Initial Lesion to the Cardiovascular System. *Journal of Endodontics*. 2011;37(12):1624-9.
11. Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MCP, de Souza AM, Faccioli LH, et al. Circulating Interleukin-6 and High-Sensitivity C-Reactive Protein Decrease After Periodontal Therapy in Otherwise Healthy Subjects. *J Periodontol*. 2009;80(4):594-602.
12. Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, Lopez-Lopez J, Martin-Gonzalez J, Velasco-Ortega E, et al. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2012:e356-e61.

13. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(4):277-90.
14. Ozbek SM, Ozbek A. Real-time polymerase chain reaction of “red complex” (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2010;110(5):670-4.
15. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Silva MG. Prevalence and Clonal Analysis of *Porphyromonas gingivalis* in Primary Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*. 2008;34(11):1332-6.
16. Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2007;103(2):285-8.
17. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular Detection of Black-Pigmented Bacteria in Infections of Endodontic Origin. *Journal of Endodontics*. 2001;27(9):563-6.
18. Gomes BPF, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and

Prevotella nigrescens in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiology and Immunology. 2005;20(4):211-5.

19. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiology and Immunology. 2008;23(5):384-90.

20. Wilson J, Schurr M, LeBlanc C, Ramamurthy R, Buchanan K, Nickerson C. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Postgraduate Medical Journal. 2002;78(918):216-24.

21. Paramonov NA, Aduse-Opoku J, Hashim A, Rangarajan M, Curtis MA. Structural Analysis of the Core Region of O-Lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* from Mutants Defective in O-Antigen Ligase and O-Antigen Polymerase. Journal of Bacteriology. 2009;191(16):5272-82.

22. Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. Hemin-Dependent Modulation of the Lipid A Structure of *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. Infection and Immunity. 2006;74(8):4474-85.

23. Gomes BPFA, Endo MS, Martinho FC. Comparison of Endotoxin Levels Found in Primary and Secondary Endodontic Infections. Journal of Endodontics. 2012;38(8):1082-6.

24. Hong C-Y, Lin S-K, Kok S-H, Cheng S-J, Lee M-S, Wang T-M, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2004;33(3):162-9.
25. Tang Y, Sun F, Li X, Zhou Y, Yin S, Zhou X. *Porphyromonas endodontalis* Lipopolysaccharides Induce RANKL by Mouse Osteoblast in a Way Different from That of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics*. 2011;37(12):1653-8.
26. Chen SC, Huang FM, Lee SS, Li MZ, Chang YC. The upregulation of receptor activator NF- κ B ligand expression by interleukin-1 α and *Porphyromonas endodontalis* in human osteoblastic cells. *International Endodontic Journal*. 2009;42(4):375-80.
27. Yu Y, Qiu L, Guo J, Yang D, Qu L, Yu J, et al. TRIB3 mediates the expression of Wnt5a and activation of nuclear factor- κ B in *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide-treated osteoblasts. *Molecular Oral Microbiology*. 2015;30(4):295-306.
28. Guo J, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Ochiai K, Qiu L, et al. Calcium Hydroxide Suppresses *Porphyromonas endodontalis* Lipopolysaccharide-induced Bone Destruction. *Journal of Dental Research*. 2014 May 1, 2014;93(5):508-13.

29. Mirucki CS, Abedi M, Jiang J, Zhu Q, Wang Y-H, Safavi KE, et al. Biologic Activity of *Porphyromonas endodontalis* complex lipids. *Journal of endodontics*. 2014;40(9):1342-8.
30. Dorn BR, Harris LJ, Wujick CT, Vertucci FJ, Progulsk-Fox A. Invasion of vascular cells in vitro by *Porphyromonas endodontalis*. *International Endodontic Journal*. 2002;35(4):366-71.
31. Pussinen PJ, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna AS, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia, Immune Response to Periodontal Pathogens, and Systemic Inflammation Associate With Incident Cardiovascular Disease Events. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007 June 1, 2007;27(6):1433-9.
32. Papapanou PN, Neiderud A-M, Papadimitriou A, Sandros J, Dahlén G. "Checkerboard" Assessments of Periodontal Microbiota and Serum Antibody Responses: A Case-Control Study. *Journal of Periodontology*. 2000 2000/06/01;71(6):885-97.
33. Pussinen PJ, Alfthan G, Jousilahti P, Paju S, Tuomilehto J. Systemic exposure to *Porphyromonas gingivalis* predicts incident stroke. *Atherosclerosis*. 2007;193(1):222-8.
34. Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, Ugarte R. Markers of Systemic Bacterial Exposure in Periodontal Disease and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic

Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*. 2007 2007/12/01;78(12):2289-302.

35. Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, et al. Can Apical Periodontitis Modify Systemic Levels of Inflammatory Markers? A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Endodontics*. 2013;39(10):1205-17.

36. Pasqualini D, Bergandi L, Palumbo L, Borraccino A, Dambra V, Alovisei M, et al. Association among Oral Health, Apical Periodontitis, CD14 Polymorphisms, and Coronary Heart Disease in Middle-aged Adults. *Journal of Endodontics*. 2012;38(12):1570-7.

37. Petersen J, Glaßl E-M, Nasser P, Crismani A, Luger AK, Schoenherr E, et al. The association of chronic apical periodontitis and endodontic therapy with atherosclerosis. *Clinical Oral Investigations*. 2014;18(7):1813-23.

38. Caplan DJ, Chasen JB, Krall EA, Cai J, Kang S, Garcia RI, et al. Lesions of Endodontic Origin and Risk of Coronary Heart Disease. *Journal of dental research*. 2006;85(11):996-1000.

39. Márton IJ. How does the periapical inflammatory process compromise general health? *Endodontic Topics*. 2004;8(1):3-14.

40. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology*. 2011;3(0).
41. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPF. Correlation between Clinical/Radiographic Features and Inflammatory Cytokine Networks Produced by Macrophages Stimulated with Endodontic Content. *Journal of Endodontics*. 2012;38(6):740-5.
42. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, León R, Chandía S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Diseases*. 2006;12(3):283-9.
43. Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, et al. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *Journal of Inflammation (London, England)*. 2012;9:8-.
44. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AMF, Letra A, et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *Journal of Applied Oral Science*. 2014 Jul-Aug;22(4):336-46.

45. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenic Activity of Bacterial Endodontic Contents from Primary Root Canal Infection with Periapical Lesions against Macrophage in the Release of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor α . *Journal of Endodontics*. 2010;36(9):1467-74.
46. Pršo IB, Kocjan W, Šimić H, Brumini G, Pezelj-Ribarić S, Borčić J, et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin 6 in Human Periapical Lesions. *Mediators of Inflammation*. 2007;2007:38210.
47. Abdolsamadi HR, Vahedi M, Esmaeili F, Nazari S, Abdollahzadeh S. Serum Interleukin-6 as a Serologic Marker of Chronic Periapical Lesions: A Case-control Study. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*. 2008 Spring;2(2):43-7.
48. Maekawa T, Tabeta K, Kajita-Okui K, Nakajima T, Yamazaki K. Increased expression of C-reactive protein gene in inflamed gingival tissues could be derived from endothelial cells stimulated with interleukin-6. *Archives of Oral Biology*. 2011;56(11):1312-8.
49. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. Regulation of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by Interleukin-1 and Interleukin-6 in Mouse Calvaria: Association of MMP Induction with Bone Resorption. *Endocrinology*. 1998;139(3):1338-45.

50. Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, Macdonald DG, Kinane DF. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *European Journal of Oral Sciences*. 2000;108(3):195-201.
51. Garrido M, Dezerega A, Bordagaray MJ, Reyes M, Vernal R, Melgar-Rodríguez S, et al. C-Reactive Protein Expression Is Up-regulated in Apical Lesions of Endodontic Origin in Association with Interleukin-6. *Journal of Endodontics*. 2015;41(4):464-9.
52. Renvert S, Lindahl C, Roos-Jansåker A-M, Lessem J. Short-Term Effects of an Anti-Inflammatory Treatment on Clinical Parameters and Serum Levels of C-Reactive Protein and Proinflammatory Cytokines in Subjects With Periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2009 2009/06/01;80(6):892-900.
53. Vidal F, Figueredo CMS, Cordovil I, Fischer RG. Periodontal Therapy Reduces Plasma Levels of Interleukin-6, C-Reactive Protein, and Fibrinogen in Patients With Severe Periodontitis and Refractory Arterial Hypertension. *Journal of Periodontology*. 2009 2009/05/01;80(5):786-91.
54. van der Waal SV, Lappin DF, Crielaard W. Does apical periodontitis have systemic consequences? The need for well-planned and carefully conducted clinical studies. *Br Dent J*. [Opinion]. 2015;218(9):513-6.
55. Blach A, Franek E, Witula A, Kolonko A, Chudek J, Drugacz J, et al. The influence of chronic periodontitis on serum TNF- α , IL-6 and hs-CRP concentrations,

and function of graft and survival of kidney transplant recipients. *Clinical Transplantation*. 2009;23(2):213-9.

56. Devaraj S, Yun J-M, Adamson G, Galvez J, Jialal I. C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction. *Cardiovascular Research*. 2009;84(3):479-84.

57. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein: a surrogate risk marker or mediator of atherothrombosis? *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2003 2003-11-01 00:00:00;285(5):R1250-R2.

58. Libby P. Atherosclerosis: Disease Biology Affecting the Coronary Vasculature. *The American Journal of Cardiology*. 2006;98(12, Supplement 1):S3-S9.

59. Krugluger W, Nell A, Solar P, Matejka M, Boltz-Nitulescu G. Influence of sE-selectin and L-selectin on the regulation of cell migration during chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 1995;30(3):198-203.

60. Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *The Lancet*. 2001;358(9286):971-5.

61. Hannigan E, O'Connell DP, Hannigan A, Buckley LA. Soluble Cell Adhesion Molecules in Gingival Crevicular Fluid in Periodontal Health and Disease. *Journal of Periodontology*. 2004 2004/04/01;75(4):546-50.
62. Motawi T, Shaker O, Taha N, Raheem MA. Genetic variations in E-selectin and ICAM-1: Relation to atherosclerosis. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2012;18(6):CR381-CR9.
63. Molé N, March AK-d, Martin G, Miller N, Béné MC, Faure GC. High levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in crevicular fluid of periodontitis patients with plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998;25(9):754-8.
64. Fraser HS, Palmer RM, Wilson RF, Coward PY, Scott DA. Elevated Systemic Concentrations of Soluble ICAM-1 (sICAM) are Not Reflected in the Gingival Crevicular Fluid of Smokers with Periodontitis. *Journal of Dental Research*. 2001 July 1, 2001;80(7):1643-7.
65. Rose-Hill S, Ford PJ, Leishman SJ, Do HL, Palmer JE, Heng NCK, et al. Improved periodontal health and cardiovascular risk. *Australian Dental Journal*. 2011;56(4):352-7.
66. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the Molecular Basis of Leukocyte Tethering and Rolling Revealed by Structures of P- and E-Selectin Bound to SLe^X and PSGL-1. *Cell*. 2000;103(3):467-79.

67. Jia W, Wang R, Zhao J, Liu IY, Zhang D, Wang X, et al. E-Selectin Expression Increased in Human Ruptured Cerebral Aneurysm Tissues. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*. 2011;38(06):858-62.
68. Haslacher H, Perkmann T, Gruenewald J, Exner M, Endler G, Scheichenberger V, et al. Plasma myeloperoxidase level and peripheral arterial disease. *European Journal of Clinical Investigation*. 2012;42(5):463-9.
69. Kaya MG, Yalcin R, Okyay K, Poyraz F, Bayraktar N, Pasaoglu H, et al. Potential Role of Plasma Myeloperoxidase Level in Predicting Long-Term Outcome of Acute Myocardial Infarction. *Texas Heart Institute Journal*. 2012;39(4):500-6.
70. Rathnayake N, Gustafsson A, Norhammar A, Kjellström B, Klinge B, Rydén L, et al. Salivary Matrix Metalloproteinase-8 and -9 and Myeloperoxidase in Relation to Coronary Heart and Periodontal Diseases: A Subgroup Report from the PAROKRANK Study (Periodontitis and Its Relation to Coronary Artery Disease). *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0126370.
71. Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 1997;24(5):287-96.

72. Karahocagil MK, Aslan M, Ceylan MR, Cıkman A, Sunnetcioglu M, Kucukoglu ME, et al. Serum myeloperoxidase activity and oxidative stress in patients with acute brucellosis. *Clinical Biochemistry*. 2012;45(10–11):733-6.
73. Ren Y-F, Malmstrom HS. Rapid quantitative determination of C-reactive protein at chair side in dental emergency patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2007;104(1):49-55.
74. Martinho F, Leite FM, Nascimento G, Cirelli J, Gomes BFA. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clinical Oral Investigations*. 2014 2014/12/01;18(9):2095-102.
75. Marinho ACS, Martinho FC, Leite FRM, Nascimento GG, Gomes BPFA. Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. *Journal of Endodontics*. 2015;41(6):817-23.
76. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003 December 1, 2003;42(6):1206-52.

77. Pussinen PJ, Vilkuna-Rautiainen T, Alfthan G, Mattila K, Asikainen S. Multiserotype Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Diagnostic Aid for Periodontitis in Large-Scale Studies. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002 February 1, 2002;40(2):512-8.
78. Liljestrand JM, Mäntylä P, Paju S, Buhlin K, Kopra KAE, Persson GR, et al. Association of Endodontic Lesions with Coronary Artery Disease. *Journal of Dental Research*. 2016 November 1, 2016;95(12):1358-65.
79. Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SSM, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiology and Immunology*. 2007;22(4):266-71.
80. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2008 2008/09/01;106(3):443-9.
81. Díaz L, Hoare A, Soto C, Bugeño I, Silva N, Dutzan N, et al. Changes in lipopolysaccharide profile of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates correlate with changes in colony morphology and polymyxin B resistance. *Anaerobe*. 2015;33:25-32.
82. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiology and Immunology*. 1986;1(1):48-55.

83. Park O-J, Min K-M, Choe S-J, Choi B-K, Kim K-K. Use of Insertion Sequence Element IS1126 in a Genotyping and Transmission Study of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004 February 1, 2004;42(2):535-41.
84. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of Putative Periodontal Pathogens in Subgingival Specimens by 16S Ribosomal DNA Amplification with the Polymerase Chain Reaction. *Clinical Infectious Diseases*. 1995 June 1, 1995;20(Supplement 2):S304-S7.
85. Rôças IN, Alves FRF, Santos AL, Rosado AS, Siqueira JF, Jr. Apical Root Canal Microbiota as Determined by Reverse-capture Checkerboard Analysis of Cryogenically Ground Root Samples from Teeth with Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*. 2010;36(10):1617-21.
86. Blann AD, Lip GYH. Cell Adhesion Molecules in Cardiovascular Disease and Its Risk Factors—What Can Soluble Levels Tell Us? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(5):1745-7.
87. Kirkevang L-L, Wenzel A. Risk indicators for apical periodontitis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 2003;31(1):59-67.
88. Rodriguez F-R, Taner B, Weiger R, Walter C. Is smoking a predictor of apical periodontitis? *Clinical Oral Investigations*. [journal article]. 2013;17(8):1947-55.

89. Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *International Endodontic Journal*. 2015;48(10):933-51.
90. Belch JJF, Shaw JW, Kirk G, McLaren M, Robb R, Maple C, et al. The White Blood Cell Adhesion Molecule E-Selectin Predicts Restenosis in Patients With Intermittent Claudication Undergoing Percutaneous Transluminal Angioplasty. *Circulation*. 1997;95(8):2027-31.
91. de Almeida-Pititto B, Ribeiro-Filho FF, Bittencourt MS, Lotufo PA, Bensenor I, Ferreira SRG. Usefulness of circulating E-selectin to early detection of the atherosclerotic process in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2016;8:19.
92. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*. 2006;368(1–2):33-47.
93. Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira Jr JF. Prevalence of Selected Bacterial Named Species and Uncultivated Phylotypes in Endodontic Abscesses From Two Geographic Locations. *Journal of Endodontics*. 2006;32(12):1135-8.
94. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Debelian GJ. Analysis of Symptomatic and Asymptomatic Primary Root Canal Infections in Adult Norwegian Patients. *Journal of Endodontics*. 2011;37(9):1206-12.

95. Bhaskar S, Sudhakaran PR, Helen A. Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation and adhesion molecule expression by modulating TLR-NF- κ B signaling pathway. *Cellular Immunology*. 2016.
96. Galkina E, Ley K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(11):2292-301.
97. De Caterina R, Basta G, Lazzerini G, Dell'Omo G, Petrucci R, Morale M, et al. Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 as a Biohumoral Correlate of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17(11):2646-54.
98. Parissis JT, Korovesis S, Giazitzoglou E, Kalivas P, Katritsis D. Plasma profiles of peripheral monocyte-related inflammatory markers in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. *International Journal of Cardiology*. 2002;83(1):13-21.

ANEXO 1



Comisión Nacional de Investigación
Científica y Tecnológica - CONICYT

INFORME DE ASPECTOS BIOÉTICOS
CONCURSO NACIONAL DE PROYECTOS FONDECYT REGULAR 2012

N° Proyecto	1120138
Investigador/a Responsable	EMMA MARCELA HERNANDEZ RIOS
Título	CROSSTALK BETWEEN LOCAL HOST RESPONSE TO ENDODONTIC INFECTION AND LOW-GRADE SYSTEMIC INFLAMMATION IN ASYMPTOMATIC APICAL PERIODONTITIS: PROSPECTIVE STUDY EVALUATING THE EFFECT OF CONSERVATIVE ENDODONTIC TREATMENT
Institución	UNIV.DE CHILE/FAC.DE ODONTOLOGIA
Grupo de Estudio	MEDICINA G2-G3
Fecha	Santiago, 25 de enero de 2012

Observaciones:

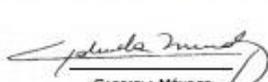
Adjunta acta de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, con fundamentación.

Adjunta Consentimiento Informado (CI) para pacientes con periodontitis apical asintomática, otro para padres de menores con dientes sanos (controles) y asentimiento informado para estos menores, que son adecuados.

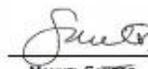
Conclusiones:

- Sin observaciones.

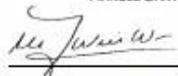
Este informe ha sido preparado por los miembros del Comité Asesor de Bioética de FONDECYT.

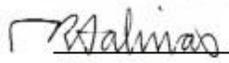

GABRIELA MÉNDEZ


RAFAEL TÉLLEZ


MANUEL SANTOS


MARÍA ANGÉLICA SOTOMAYOR


MARÍA INÉS WINKLER.


RODRIGO SALINAS


RAÚL VILLARROEL



ANEXO 2

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 lo realizará el tratamiento de

23/04/2012
COMITE ASESOR
DE BIOÉTICA
FONDECYT

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. Fonos: 9781806;
 email: mhemandezrios@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 3

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 Former Specify _____Medical treatment last 6 months Yes No Periodontitis Yes No Gingivitis Yes No Current smoker Yes No Non-HDL-cholesterol (mg/dL) HDL-cholesterol (mg/dL) Blood pressure (mm/Hg) Obesity (BMI) (kg/m²) Hyperglycemia (glucohemoglobin %) N° of teeth with AAP N° of teeth with dental caries Tooth number Rx lesion size (mm) vertical horizontal Vitalometry Positive Negative Percussion Yes No Control after treatment (1 week) Date Asymptomatic Yes No Rx filling Adequate Inadequate Control after treatment (1 month) Date Asymptomatic Yes No Control after treatment 3 months Date Asymptomatic Yes No Lesion size (mm) Vertical Horizontal Control after treatment 6 months Date Asymptomatic Yes No Lesion size (mm) Vertical Horizontal Control after treatment 12 months Date Asymptomatic Yes No Lesion size (mm) Vertical Horizontal