



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

**NIVELES DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TIPO TOLL-4 (TLR-4),  
INTERLEUQUINA (IL)-10 E IL-12 EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE  
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA**

**Lynn María Barstow Melgarejo**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Mauricio Garrido Flores**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos**

**Dra. Angélica María Cárdenas Gutiérrez**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1160741**

**Santiago - Chile**

**2019**





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

**NIVELES DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TIPO TOLL-4 (TLR-4),  
INTERLEUQUINA (IL)-10 E IL-12 EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE  
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA**

**Lynn María Barstow Melgarejo**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Mauricio Garrido Flores**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos**

**Dra. Angélica María Cárdenas Gutiérrez**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1160741**

**Santiago - Chile**

**2019**

## DEDICATORIA

Gracias por guiar mi camino y darme la fuerza para continuar... Esto es para ti Papito.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Nieves y Allan, por todo el amor y apoyo incondicional. Gracias por todo el esfuerzo que han hecho para darme una buena educación y verme convertida en una profesional. Lo son todo para mí y sin ustedes no lo hubiese logrado.

A mi hermano Sebastián, por ser el mejor hermano que alguien pueda tener y siempre ayudarme en todo. A mi tía y segunda mamá Adriana, por el cariño que me das y siempre estar presente. A mis tíos Janice, Jimmy y Donald por el cariño, apoyo y ayuda que nos han dado como familia sobre todo en los momentos difíciles.

A los amigos de la vida y los que me entregó la universidad. Gracias por todos los momentos vividos durante estos años, por estar en las buenas y en las malas, por darme ánimos para seguir adelante y creer en mí.

A mis tutores, el Dr. Mauricio Garrido y la Dra. Marcela Hernández. Muchas gracias por confiar y permitirme ser parte de su proyecto, por toda la ayuda, orientación y dedicación para que se lograra llevar a cabo mi Tesis.

A todo el equipo del Laboratorio de Biología Periodontal, en especial a Jessica y Bernardita, por todo el cariño, apoyo y siempre estar dispuestas a ayudarme en todo lo que necesité.

A todos los funcionarios y quienes fueron mis profesores a lo largo de estos años de aprendizaje. Soy una orgullosa de haber sido formada como profesional en la Universidad de Chile.

Muchas Gracias...

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
MARCO TEÓRICO .....	2
HIPÓTESIS.....	6
OBJETIVO GENERAL .....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES .....	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
ANEXOS .....	29

## RESUMEN

**Introducción:** La periodontitis apical asintomática (PAA) es la inflamación y destrucción del periodonto apical de origen pulpar y etiología microbiana. Durante su patogénesis, las células mononucleares cumplen un rol central en el reconocimiento del lipopolisacárido de bacterias Gram negativo, vía receptor tipo toll-4 (TLR-4) y síntesis de interleuquinas (IL)-10 e IL-12 que median no sólo la respuesta inmune local, sino que también podrían mediar la respuesta inflamatoria sistémica. A la fecha se desconoce si la PAA promueve un estado de hiperreactividad de células mononucleares circulantes vía TLR-4.

**Objetivo:** Evaluar los niveles de expresión génica de TLR-4 en células mononucleares de sangre periférica y asociarlos con los niveles de IL-10 e IL-12 en individuos con PAA versus controles sanos.

**Metodología:** Se incluyeron muestras de sangre periférica de voluntarios con PAA (n=20) y controles sanos (n=20). Se separaron las células mononucleares a través de gradiente de Ficoll. Los niveles de expresión del ARN mensajero de TLR-4, IL-10 e IL-12 fueron determinados mediante RT-qPCR en tiempo real. Los resultados fueron analizados mediante el software STATA V 12 ( $p < 0,05$ ).

**Resultados:** Los niveles de expresión de TLR-4, IL-10 e IL-12 no presentaron diferencias significativas entre PAA y el grupo control. En el grupo control se encontró una correlación positiva de TLR-4 con IL-10 e IL-12. En PAA, se encontró una correlación positiva entre TLR-4 e IL-10.

**Conclusiones:** Sobre la base de nuestros resultados, no se encontró evidencia para asociar la respuesta inflamatoria sistémica a hiperreactividad de células mononucleares mediada por TLR-4, IL-10 e IL-12.

## MARCO TEÓRICO

### 1. Periodontitis Apical Asintomática

La periodontitis apical asintomática (PAA) se define como la inflamación y destrucción del periodonto apical, como resultado de la infección bacteriana del tejido pulpar, asociada a un área radiolúcida periapical detectada radiográficamente y a la ausencia de sintomatología clínica, o a una leve sintomatología a la percusión (“AAE”, 2009; Gutmann y cols., 2009). La PAA se caracteriza por la formación de una lesión periapical de origen endodóntico (LPOE), dada la reabsorción del hueso alveolar perirradicular y su consecuente reemplazo por tejido inflamatorio (Garrido y cols., 2015). Las LPOE pueden corresponder, desde el punto de vista anátomo patológico, a un granuloma periapical o a un quiste radicular inflamatorio (Gutmann y cols., 2009).

La destrucción de los tejidos periapicales que caracteriza a la PAA sería consecuencia directa de la activación de la respuesta inmuno inflamatoria del hospedero, en donde células mononucleares activadas, tales como macrófagos, linfocitos y plasmocitos, sintetizan niveles elevados de mediadores pro inflamatorios y osteodestructivos (Nair, 2004). Existe evidencia de que en individuos con PAA estos mediadores inflamatorios no actuarían solo a nivel local, sino que se asociarían con un estado inflamatorio sistémico de bajo grado y a un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (ECV) (Cotti y cols., 2011; Garrido y cols., 2019).

### 2. Reconocimiento vía receptor Tipo Toll-4 en células mononucleares en PAA

La infección endodóntica se caracteriza por un predominio de bacterias anaerobias Gram negativo (-). Entre sus factores de virulencia, destacan motivos bacterianos, tales como el lipopolisacárico (LPS), que son capaces de ser reconocidos por células mononucleares, activando tanto la respuesta inmune innata como adaptativa del hospedero (Nair, 2004; Stashenko y cols., 1995). Este

reconocimiento es realizado por receptores de superficie de estas células, desencadenando señales intracelulares que modulan la respuesta inmune periapical (Botta y cols., 1994; Laheij y cols., 2015).

Una de las vías de activación de las células mononucleares se da por la presencia de receptores Tipo Toll (TLRs), los cuales son un tipo de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), ubicados en la superficie de éstas (Sima y Glogauer, 2013). Los TLRs identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares endógenos asociados al daño o señales de peligro (DAMPs) liberados de células necróticas del hospedero (Holden y cols., 2014). Estos receptores transmembrana poseen un dominio intracelular denominado receptor Toll/IL-1 (TIR), el cual es crucial en la activación de la vía de señalización, y un dominio extracelular, que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) involucradas en el reconocimiento de los PAMPs (Takeda y Akira, 2004).

Los monocitos/macrófagos y linfocitos T expresan, entre otros, el receptor Tipo Toll-4 (TLR-4) (Vijay, 2018), cuya participación en PAA es central dado que reconoce LPS bacteriano y representa uno de los principales orquestadores de la respuesta inmune frente a esta endotoxina (Fokkema, 2012). Al reconocer su ligando, se activa la vía de señalización intracelular dependiente del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y la consecuente producción de citoquinas inflamatorias, fenómeno esencial para el inicio y desarrollo de la respuesta inmune (Aderem A, 2000). En línea con lo anterior, se ha reportado una marcada expresión de TLR-4 en LPOE de individuos con PAA, principalmente por monocitos y macrófagos (Leonardi y cols., 2015; Zhang y Hou, 2007).

La activación de las células mononucleares es capaz de inducir la síntesis de citoquinas, proteínas que actúan como factores reguladores intercelulares tanto a nivel local como sistémico (Candel-Martí y cols., 2011). Dentro de éstas se encuentran citoquinas pro inflamatorias, tales como la interleuquina (IL)-12, secretada principalmente por monocitos/macrófagos tras su activación mediada vía TLR-4. Esta citoquina regula la respuesta inmune innata y determina el tipo de respuesta inmune adaptativa, siendo su principal función promover la diferenciación de linfocitos T CD4+ inmaduro al tipo Th1 y la síntesis de INF- $\gamma$  (Hamza y cols.,

2010). Por otro lado, la IL-10 es una citoquina de características anti inflamatorias, cumpliendo funciones inhibitorias en la activación y función efectora de linfocitos T, monocitos y macrófagos, siendo su principal función limitar y resolver la respuesta inmuno inflamatoria (Moore y cols., 2001). Si bien en la PAA existiría un predominio de respuesta inmune del tipo Th1 con mecanismos pro inflamatorios, se sugiere que la acción de ambas citoquinas podría controlar el curso de la inflamación crónica en las LPOE (Colic y cols., 2010).

### **3. Respuesta inflamatoria sistémica asociada a PAA**

Se propone que las LPOE asociadas a PAA podrían actuar como un reservorio de factores pro inflamatorios que se diseminan desde la circulación local a la circulación general (Cotti y Mercurio, 2015; Garrido y cols., 2015; Hernández-Caldera y cols., 2018). Recientemente, un estudio demostró inflamación sistémica de bajo grado en pacientes con PAA, con un aumento del riesgo cardiovascular (CV) basado en niveles séricos elevados, especialmente de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) e IL-6 (Garrido y cols., 2019). Esto podría explicarse en parte, por un estado de hiperreactividad de células mononucleares circulantes vía reconocimiento mediado por TLR-4. De hecho, en ratas con periodontitis experimental, las células mononucleares derivadas de sangre periférica (PBMC) demostraron tener mayor adhesión al endotelio aórtico. También así, se evidenció un aumento en la activación del NF- $\kappa$ B y expresión de VCAM-1 en células endoteliales vasculares cultivadas, sugiriendo cambios aterogénicos mediados por monocitos/macrófagos periféricos activados (Miyajima y cols., 2014). En línea con lo anterior, las PBMC de pacientes con periodontitis produjeron mayores niveles de las citoquinas pro inflamatorias factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , quimioquina 10 con motivo CXC, factor inhibidor de la migración de macrófagos, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) -1 $\alpha$ , y MIP-1 $\beta$ , en comparación con las células de individuos sanos (Herrera y cols., 2014). Más aún, la producción de citoquinas pro / antiinflamatorias por PBMC se asoció con la capacidad de la placa supragingival para inducir la estimulación mediada por TLR-4 (Yamaguchi y cols., 2009). A pesar de estos

antecedentes emergentes asociados a otras formas de periodontitis, se desconoce si la PAA se asocia con una hiperreactividad de las células mononucleares circulantes. Es así que, el objetivo de este trabajo es evaluar y asociar los niveles de expresión de TLR-4, IL-10 e IL-12 en las células mononucleares de sangre periférica en sujetos que presenten PAA y controles sanos.

Se pretende que los resultados de esta investigación contribuyan en la comprensión de la patogenia de la PAA y su implicancia a nivel sistémico; en particular, el rol que tendrían TLR-4, IL-10 e IL-12 en la regulación de la inflamación sistémica desde un proceso inmuno inflamatorio local.

## **HIPÓTESIS**

Los individuos con PAA, a diferencia de los individuos sanos, presentan células mononucleares hiperreactivas en sangre periférica, evidenciado como un aumento de IL-12 pero no de IL-10, en relación con la sobreexpresión de TLR-4.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los niveles de expresión génica de TLR-4 en células mononucleares de sangre periférica y asociarlos con los niveles de expresión de IL-10 e IL-12 en individuos con PAA versus controles sanos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar los niveles de expresión génica de TLR-4, IL-10 e IL-12 en células mononucleares de sangre periférica de individuos con PAA y controles sanos.
2. Asociar los niveles de expresión de TLR-4 con IL-10 e IL-12 de individuos con PAA y controles sanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Tipo de estudio

El presente trabajo corresponde a un estudio observacional, analítico transversal y está adscrito al proyecto FONDECYT 1160741, el cual cuenta con la aprobación del Comité Ético Científico (CEC) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (N° 2016/08) (**Anexo 1**).

### 2. Selección de pacientes y evaluación

Se incluyeron voluntarios con diagnóstico de PAA no tratada (casos, n=20) y voluntarios sanos (controles, n=20) atendidos en la clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Se definió la presencia de PAA según los criterios diagnósticos que incluyen la concurrencia de una o más lesiones periapicales detectadas por radiografía retroalveolar, debida a caries dental en dientes con determinación clínica de pulpa no vital en base a los siguientes criterios de inclusión ("AAE", 2009; Gutmann y cols., 2009):

- Dientes que no respondan a los tests de sensibilidad pulpar (frío probado con Endo-Ice® Hygenic® y calor probado con barras de trans-poliisopreno).
- Dientes con respuesta negativa a la percusión.
- Presencia de lesión apical radiolúcida observada al examen radiográfico ( $\geq 3$  mm).

Como criterios de exclusión se consideró (Garrido y cols., 2019):

- Pacientes con diagnóstico de otras enfermedades distintas de PAA.
- Pacientes con tratamiento antibiótico o anti inflamatorio en los últimos 3 meses.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes obesos (índice de masa corporal (IMC)  $\geq 29,9$  Kg/m<sup>2</sup>).

Los controles sanos cumplieron los mismos criterios de exclusión, además de no tener ningún diente con caries dentinaria profunda, tratado endodónticamente ni con patologías apicales de origen endodóntico.

Previo al ingreso de cada voluntario a este estudio, se les entregó un documento con la información correspondiente al proyecto y los procedimientos a seguir. Quienes aceptaron ser partícipes del estudio firmaron un consentimiento informado (**Anexo 2**). En caso de ser menores de edad, éstos firmaron su asentimiento y su apoderado la autorización correspondiente (**Anexo 3**).

Los participantes del estudio fueron evaluados por personal calificado de salud y se les realizó anamnesis, examen clínico intraoral y examen radiográfico periapical completo. Se registró en una ficha clínica para cada paciente (**Anexo 4**), datos sociodemográficos, historia médica, examen físico, presión arterial (hipertensión arterial: p. sistólica  $\geq 140$ mm/Hg y p. diastólica  $\geq 90$ mm/Hg), IMC (obesidad:  $\geq 29,9$ Kg/m<sup>2</sup>), perfil lipídico (dislipidemia: colesterol total  $\geq 200$ mg/dL, colesterol HDL  $\leq 35$  mg/dL, colesterol LDL  $\geq 130$  mg/dL y/o triglicéridos  $\geq 150$  mg/dL), hemoglobina glicosilada (diabetes mellitus:  $\geq 6,5\%$ ), hábito tabáquico, datos correspondientes al diagnóstico, seguimiento del tratamiento y un periodontograma completo. El examen periodontal fue realizado por un periodoncista (AC), quien realizó un examen periodontal completo, sondeando todos los dientes en 6 sitios (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, distolingual, lingual y mesiolingual) excepto los terceros molares. Se registró la posición gingival, profundidad del sondaje y nivel de inserción clínica, para valorar la presencia o ausencia de saco periodontal, y en caso de presentar periodontitis crónica se clasificó sobre la base de los criterios de Eke (Eke y cols., 2012).

Un endodoncista (MG) diagnosticó la presencia o no de PAA, mediante anamnesis, examen clínico, examen radiológico periapical completo y tests de sensibilidad pulpar, y registró los datos en una ficha clínica destinada para cada paciente (**Anexo 4**).

### **3. Obtención de muestras de sangre periférica y aislamiento de células mononucleares a partir de sangre periférica**

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los individuos en ayuno, tanto con PAA como controles sanos, en tubos con heparina de litio, a través de la punción de la vena antero-cubital por personal de salud capacitado. Una parte de las muestras fueron enviadas al Laboratorio Clínico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile para la determinación del perfil lipídico y hemoglobina glicosilada (HbA1c). La otra parte de las muestras fueron enviadas y procesadas en el Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. A partir de estas muestras de sangre periférica, se obtuvo el aislado de las células mononucleares usando una gradiente de Ficoll®, de densidad 1,073 (Ficoll®-Paque PREMIUM 1,073, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **4. Extracción del ARNm y obtención de ADNc de células mononucleares**

Se realizó la extracción del ARN mensajero citoplasmático total (ARNm) a partir de las células mononucleares obtenidas, utilizando el método guanidinio isotiocianato de acuerdo con las instrucciones del fabricante (TRIzol® Regentó, Molecular Research Center, Inc, USA). El ARNm obtenido se resuspendió en 12 µL de agua mili-Q libre de RNasas y se cuantificó en un espectrofotómetro (Synergy HT; BioTek® Instrument Inc., Winooski, VT, USA). La primera hebra de ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 5 µg del ANRm total utilizando un kit de transcripción reversa (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

### **5. Determinación de niveles de expresión de TLR-4, IL-10 e IL-12**

Se determinó la expresión del ARNm de TLR-4, IL-10 e IL-12, mediante la amplificación de 50 ng de ADNc en un equipo de qPCR utilizando partidores específicos que se muestran en la **Tabla 1** y un kit KAPA SYBR® FAST qPCR master mix universal (KAPA Biosystems, Woburn, Ma, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó un termociclador en tiempo real (SteponePlus®, Applied Biosystems, Singapore) con el siguiente protocolo de

amplificación: 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos. Se realizó cuantificación relativa para medir los niveles de expresión de ARNm con el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) y como gen normalizador se utilizó la expresión de la subunidad de ARN ribosomal 18S.

	Partidor Forward	Partidor Reverse
<b>TLR-4</b>	ccctcccctgtacccttct	tccctgccttgaataccttc
<b>IL-10</b>	tgggggagaacctgaagac	ccttgctctgttttcacagg
<b>IL-12</b>	cactcccaaacctgctgag	tctcttcagaagtgaagggta
<b>18S</b>	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

**Tabla 1.** Partidores forward y reverse utilizados en cuantificación mediante qPCR. TLR: Toll like receptor. IL: Interleuquina. 18S: Subunidad ARN ribosomal como gen normalizador.

## 6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software STATA 12® (StataCorp LP, Texas, EE. UU.). Para determinar la normalidad en la distribución de los datos se utilizó el Test de Shapiro Wilk. Para la determinación de significancia estadística entre los determinantes demográficos y clínicos de los grupos de estudio se utilizó el test Chi<sup>2</sup> y Test de Mann-Whitney para las variables que presentaron distribución no normal, y se utilizó el Test T de Student en las variables con distribución normal.

En cuanto a la expresión relativa de TLR-4, IL-10 e IL-12, se utilizó para las comparaciones entre los grupos el Test de Mann-Whitney.

Para la evaluación de correlación entre los niveles de expresión de TLR-4 con IL-10 e IL-12 en ambos grupos de estudio se utilizó el Test de Spearman. Se consideró significancia estadística si  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes con PAA y controles

El presente estudio contó con la participación de 40 voluntarios de los cuales se obtuvieron 20 muestras de sangre periférica de individuos con diagnóstico clínico y radiográfico de PAA y 20 muestras de individuos sanos. Las características demográficas y clínicas se presentan en la **Tabla 2**. Veintiún pacientes eran mujeres y 19 hombres, 52,5% y 47,5% de la muestra respectivamente. La distribución de los parámetros mencionados entre PAA y control no presentó variación con significancia estadística entre los grupos, con excepción de la edad, género mujer, tabaquismo e índice COPD, que fue significativamente mayor en PAA ( $p < 0,05$ ).

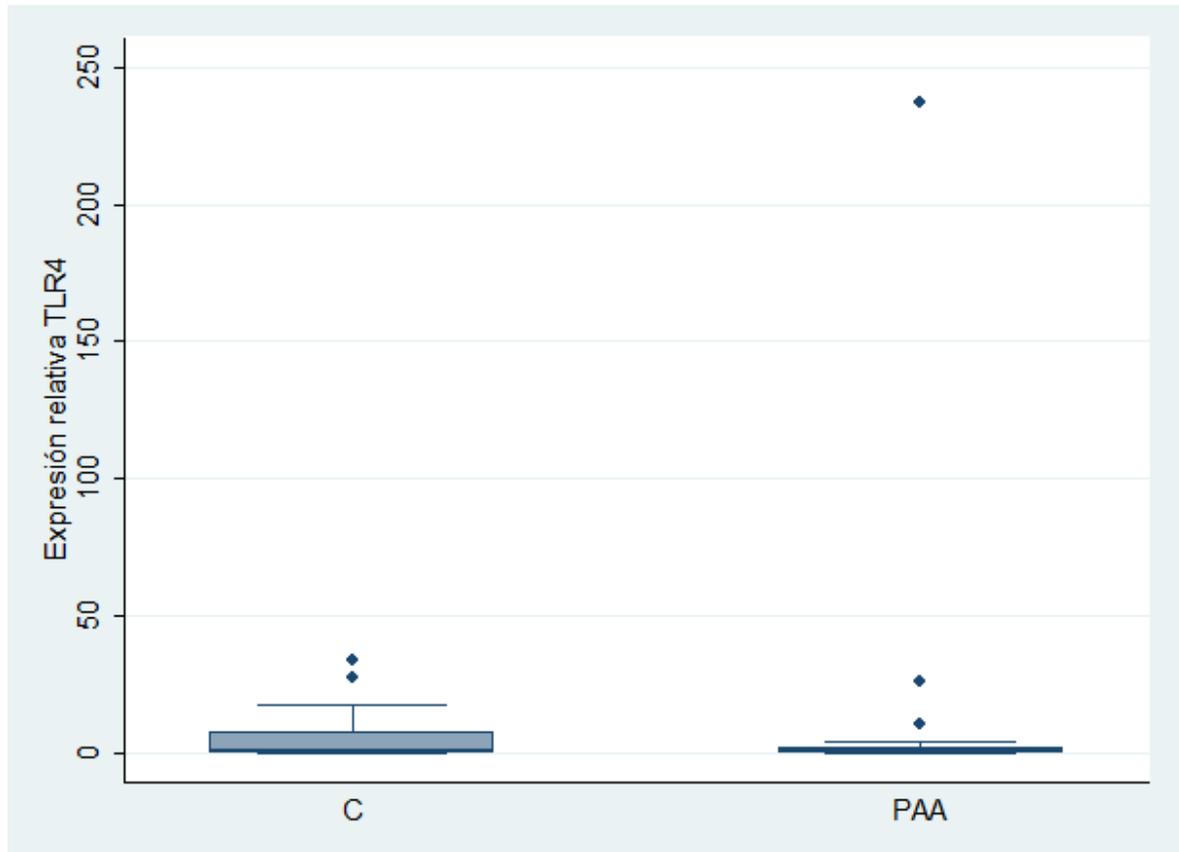
Variable	C (n=20)	PAA (n=20)	P
<b>Edad (años)</b>	20 (6)	24,5 (8,5)	<b>0,022*</b>
<b>Género (n° mujeres, %)</b>	7 (35%)	14 (70%)	<b>0,027*</b>
<b>Nivel educacional</b>	media completa	media completa	0,55
<b>Tabaquismo (n°, % fumadores)</b>	2 (10%)	12 (60%)	<b>0,001*</b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,32 ± 2,66	24,43 ± 3,33	0,252
<b>HbA1c (%)</b>	5,18 ± 0,18	5,19 ± 0,21	0,802
<b>Dislipidemia (n°, %)</b>	5 (25%)	7 (35%)	0,49
<b>Hipertensión (n°, %)</b>	1 (5%)	1 (5%)	1
<b>Índice COPD</b>	4 (4)	10 (12,5)	<b>0,0006*</b>

<b>Profundidad al sondaje (mm)</b>	1,94 ± 0,37	2,08 ± 0,41	0,251
<b>NIC (mm)</b>	1,08 (0,36)	1,23 (1,005)	0,14

**Tabla 2.** Características demográficas y clínicas de los pacientes con PAA y controles. Los valores están expresados como promedios ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico) con excepción de género, tabaquismo, dislipidemia e hipertensión que fueron expresados como frecuencias absolutas, (%). C: Control. PAA: Periodontitis apical asintomática. IMC: Índice de masa corporal. HbA1c: Hemoglobina glicosilada. COPD: Dientes cariados, perdidos, obturados. NIC: Nivel de inserción clínico. Valores \* $p < 0,05$  (significancia estadística).

## 2. Niveles de expresión génica de TLR-4

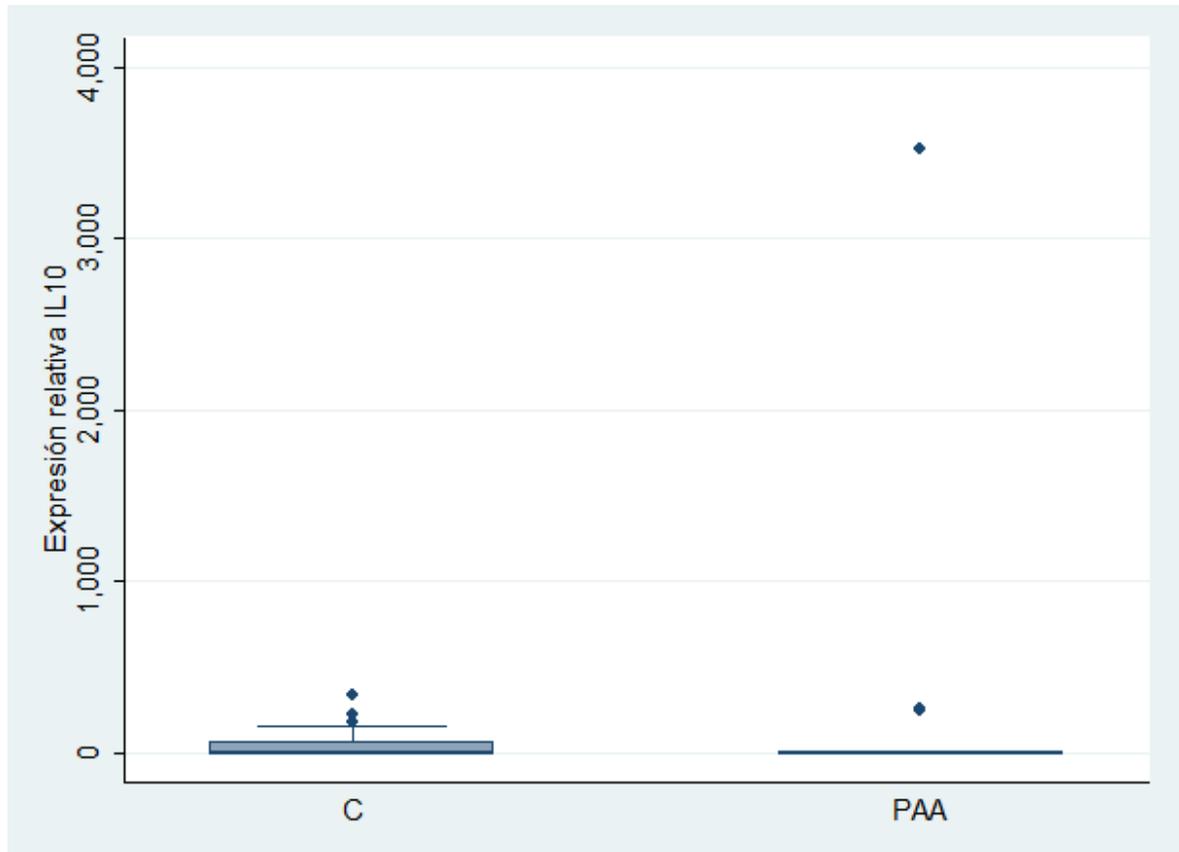
Los niveles de expresión relativa del ARNm de TLR-4 en PAA y el grupo control se presentan en la **Figura 1**. Los niveles de expresión de TLR-4 no presentaron diferencias significativas entre PAA y el grupo control ( $p > 0,05$ ). Los valores (mediana) en PAA fue 0.38, mientras que en el grupo control fue 0.44.



**Figura 1.** Expresión génica relativa de TLR-4 en controles y PAA. La expresión génica se normalizó en relación al ARNr 18S y se expresó como la diferencia entre  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . TLR: Toll like receptor. C: Control. PAA: Periodontitis apical asintomática.  $p > 0,05$ .

### 3. Niveles de expresión génica de IL-10

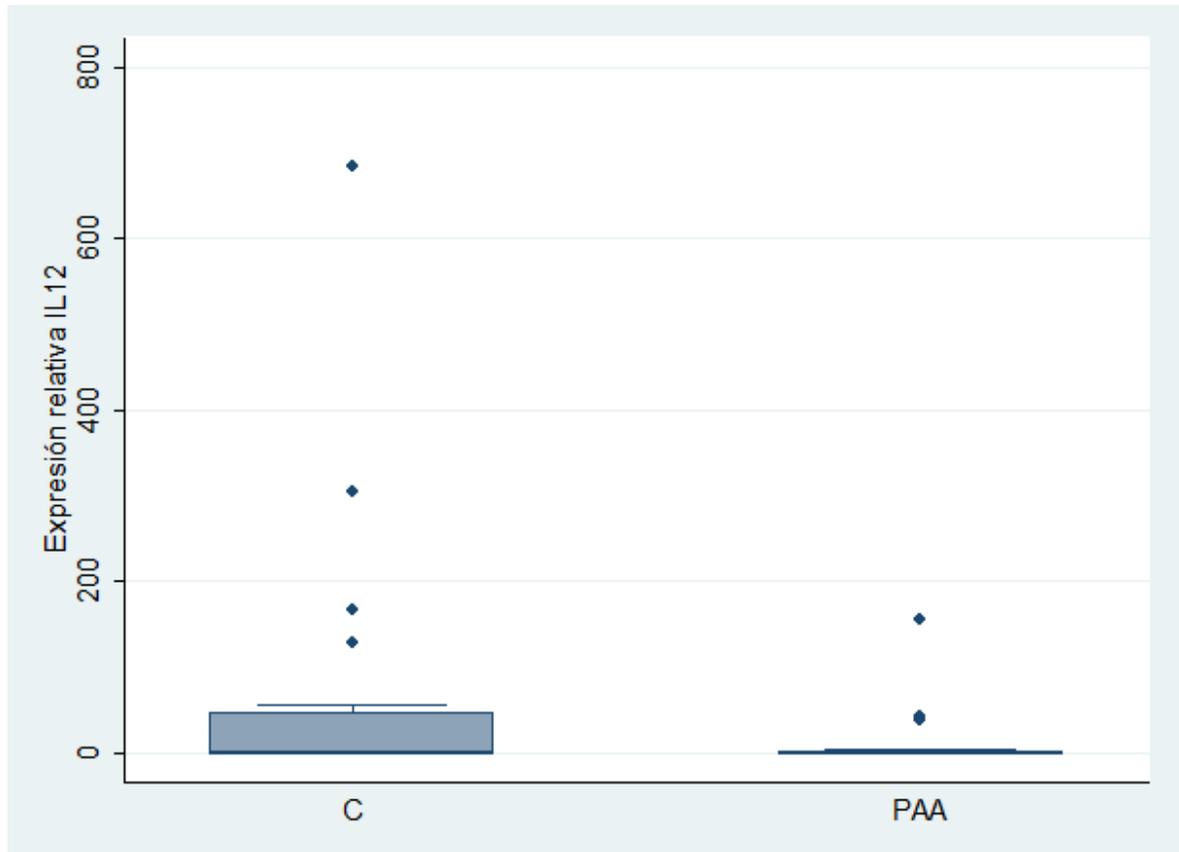
Los niveles de expresión relativa del ARNm de IL-10 en PAA y el grupo control se presentan en la **Figura 2**. Los niveles de expresión de IL-10 no presentaron diferencias significativas entre PAA y el grupo control ( $p > 0,05$ ). Los valores (mediana) en PAA fue 0.25, mientras que en el grupo control fue 0.13.



**Figura 2.** Expresión génica relativa de IL-10 en controles y PAA. La expresión génica se normalizó en relación al ARNr 18S y se expresó como la diferencia entre  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . IL: Interleuquina. C: Control. PAA: Periodontitis apical asintomática.  $p > 0,05$ .

#### 4. Niveles de expresión génica de IL-12

Los niveles de expresión relativa del ARNm de IL-12 en PAA y el grupo control se presentan en la **Figura 3**. Los niveles de expresión de IL-12 no presentaron diferencias significativas entre PAA y el grupo control ( $p > 0,05$ ). Los valores (mediana) en PAA fue 0.53, mientras que en el grupo control fue 0.13.



**Figura 2.** Expresión génica relativa de IL-12 en controles y PAA. La expresión génica se normalizó en relación al ARNr 18S y se expresó como la diferencia entre  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . IL: Interleuquina. C: Control. PAA: Periodontitis apical asintomática.  $p > 0,05$ .

### 5. Asociación de niveles de expresión de TLR-4 con IL-10 e IL-12

La **Tabla 3** muestra la correlación entre los niveles de expresión génica de TLR-4 con IL-10 e IL-12 tanto en PAA como en el grupo control. En el grupo control se encontró una correlación positiva entre TLR-4 con IL-10 e IL-12 ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, se identificó una correlación positiva entre IL-10 e IL-12 en el grupo control ( $p < 0,05$ ). En PAA, se encontró una correlación positiva entre TLR-4 con IL-10 ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, no se encontró una correlación entre IL-10 e IL-12 en PAA ( $p > 0,05$ ).

	C			PAA		
	TLR-4	IL-10	IL-12	TLR-4	IL-10	IL-12
TLR-4	1	---	---	1	---	---
IL-10	<b>0,7143*</b>	1	---	<b>0,6617*</b>	1	---
IL-12	<b>0,8074*</b>	<b>0,8421*</b>	1	0,4120	0,5940	---

**Tabla 3.** Correlación entre los niveles de expresión génica de TLR-4 con IL-10 e IL-12. TLR: Toll like receptor. IL: Interleuquina. C: Control. PAA: Periodontitis apical asintomática. Coeficiente de correlación de Spearman (r). \* $p < 0,05$  (significancia estadística).

## DISCUSIÓN

La PAA es una patología que se caracteriza por el desarrollo de una respuesta inmuno inflamatoria ante un estímulo bacteriano que ocasiona la destrucción del tejido periapical del diente y la formación de una LPOE (Gazivoda y cols., 2009; Nair, 2004). En este proceso, los monocitos/macrófagos y linfocitos T cumplen un rol central al reconocer vía TLR-4 el LPS de bacterias Gram negativo (Fokkema, 2012). Tras el reconocimiento y posterior activación de dichas células, existe una consecuente producción de citoquinas que regulan la respuesta inmune, tales como la IL-10 e IL-12 (Colic y cols., 2010).

Dada la proximidad anatómica entre las LPOE y el sistema circulatorio se postula que podría ocurrir una diseminación de mediadores inflamatorios, bacterias y sus productos a la circulación general, promoviendo un estado inflamatorio sistémico de bajo grado que se asocia con un mayor riesgo CV (Cotti y cols., 2011; Garrido y cols., 2019). Con base en estos antecedentes, en el presente estudio se hipotetizó que existe una hiperreactividad de las PBMC en individuos con PAA, evidenciada como un desbalance entre IL-12 e IL-10 mediado por TLR-4.

Al analizar las características demográficas y clínicas de los sujetos con PAA y controles, se observó una distribución similar en nivel educacional y variables clínicas (IMC, HbA1C, dislipidemia, hipertensión, profundidad al sondaje y NIC) entre los grupos. Estos resultados se encuentran dentro de lo esperado, ya que estas variables fueron controladas por el diseño de estudio. La edad fue significativamente mayor en el grupo con PAA, aunque se mantienen en el grupo adulto joven, lo que es relevante debido a la falta de acumulación de otros factores de riesgo CV que normalmente ocurren en personas mayores (Garrido y cols., 2019; Khalighinejad y cols., 2016). En cuanto al género, estudios han indicado una mayor frecuencia de periodontitis apical (PA) en el género femenino (Jimenez-Pinzon y cols., 2004; León y cols., 2011), concordando con nuestros resultados, mientras que otros han indicado un predominio masculino (Kirkevang y cols., 2001). En el presente estudio se encontró predominancia de mujeres, lo que podría ser explicado

por una mayor priorización de problemas de salud oral por parte de éstas (León y cols., 2011).

El índice COPD, que refleja el daño dentario acumulado en el tiempo, fue significativamente mayor para el grupo con PAA, ya que con frecuencia coexiste en asociación con un estado de salud oral más deficiente (Garrido y cols., 2019). En cuanto al hábito tabáquico, a pesar de que se ha asociado con una mayor prevalencia de PA y se ha propuesto como un posible factor de riesgo, actualmente existe una falta de consenso en la literatura sobre estas asociaciones (Bergstrom y cols., 2004; Persic Bukmir y cols., 2016; Rodriguez y cols., 2013; Segura-Egea y cols., 2015). En el presente estudio se identificó un porcentaje de fumadores significativamente mayor en el grupo con PAA (60%) respecto del grupo control (10%). El tabaquismo representa uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad coronaria en la población adulta menor de 55 años (Pasqualini y cols., 2012). Por un lado, fumar genera un aumento en el riesgo de lesión endotelial en el sistema vascular periférico y el desarrollo de un estado inflamatorio crónico, los cuales son factores de riesgo de ECV y por el otro, este hábito se ha asociado también con un aumento en la incidencia de tratamiento endodóntico. Al comparar con individuos que nunca han fumado, los fumadores actuales de cigarrillos tienen 1,7 veces más probabilidades de tener tratamiento endodóntico (Krall y cols., 2006; Pasqualini y cols., 2012).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión génica de TLR-4 en PBMC de individuos con PAA versus controles sanos. En cuanto a los niveles de expresión génica de IL-12 e IL-10 en PBMC, tampoco se identificaron diferencias significativas en sujetos con PAA versus controles sanos. IL-12 es una citoquina de carácter pro inflamatorio, secretada tras la activación celular mediada por TLR-4. Ésta cumple un rol clave en la respuesta inmuno inflamatoria en la PAA, principalmente al promover la diferenciación de linfocitos T CD4+ inmaduros al tipo Th1 y la producción de INF- $\gamma$  (Hamza y cols., 2010). Por el contrario, IL-10 cumple un rol más bien anti inflamatorio, capaz de inhibir la activación y síntesis de citoquinas pro inflamatorias como IL-12, tanto en linfocitos T como en macrófagos, por tanto, es central en la homeostasis del sistema inmune (Moore y cols., 2001). Estudios en PA inducida

experimentalmente en ratones nulos para IL-10 demostraron significativamente mayor reabsorción ósea periapical en PA que en los controles, en conjunto con una mayor producción de la IL-1 $\alpha$  (Sasaki y cols., 2000). Estos hallazgos refuerzan que el rol protector de IL-10 es clave en la regulación de la respuesta inmune local en la patogénesis de la PAA (Graves y cols., 2011).

En un estudio reciente de nuestro equipo de investigación se evaluaron los niveles séricos de diversos marcadores de inflamación sistémica entre individuos con PAA y controles. Se reportaron niveles significativamente elevados de hsCRP, IL-6, selectina-E soluble y metaloproteinasa de matriz (MMP)-8, mientras que no se encontraron diferencias en los niveles de IL-12 ni IL-10 (Garrido y cols., 2019). De modo similar, en otro estudio se observó que la expresión de INF- $\gamma$  e IL-12 por las células T CD4+, CD8+ y monocitos CD14+ en sangre periférica no fue diferente entre individuos con periodontitis marginal y sanos (Lima y cols., 2011). Niveles circulantes elevados de marcadores de inflamación sistémica, en particular, hsPCR, representan un factor de riesgo independiente para el desarrollo y progresión de ECV, tales como disfunción endotelial (Cotti y cols., 2011), aterosclerosis (Petersen y cols., 2014), síndrome coronario agudo e infarto al miocardio (Liljestrand y cols., 2016; Pasqualini y cols., 2012). Al respecto, se ha propuesto que las LPOE actuarían como un reservorio de mediadores inflamatorios que podrían diseminarse a través de la circulación, generando una respuesta inflamatoria sistémica de bajo grado. De relevancia, los tejidos periapicales son capaces de producir IL-6 y proteína C reactiva (CRP), las que se encuentran exacerbadas en LPOE (Cotti y Mercurio, 2015; Garrido y cols., 2015; Hernandez-Caldera y cols., 2018). Adicionalmente, se ha reportado una sobrerregulación significativa de la expresión génica de TLR-4 en LPOE en comparación con tejido periapical sano tanto en estudios clínicos (Fernández y cols., 2019) como en modelos experimentales en ratas, principalmente en monocitos y macrófagos (Zhang y Hou, 2007).

Los monocitos circulantes son heterogéneos y un perfil asociado a maduración y activación, en función de la expresión superficial del receptor de LPS (CD14) y el receptor de Fc  $\gamma$  III (CD16), contribuye al desarrollo de la aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias (Urbanski y cols., 2017). Además, estos monocitos activados parecen contribuir significativamente al riesgo de ECV al

inducir daño y apoptosis en las células endoteliales, lo que representa un primer paso hacia la aterosclerosis (Merino y cols., 2008). Se han reportado cambios fenotípicos similares en subpoblaciones de monocitos en sangre periférica y en tejido gingival de pacientes con periodontitis (Jagannathan y cols., 2014). Conjuntamente, los monocitos circulantes en pacientes con periodontitis demostraron ser funcionalmente más activos a nivel transcriptómico para los genes involucrados en la endocitosis, la producción de citoquinas y la apoptosis (Liu y cols., 2016). De hecho, los monocitos hiperinflamatorios que sobreexpresaron IL-6 y TNF- $\alpha$ , mostraron una mayor adherencia a las células endoteliales aórticas y potencial de inducir disfunción endotelial en periodontitis inducida experimentalmente en ratas (Miyajima y cols., 2014). Sobre la base de los resultados obtenidos en este estudio, la síntesis de IL-12 e IL-10 mediada por TLR-4 no tendrían un rol central en una potencial activación de las PBMC en individuos con PAA.

Datos obtenidos a partir de un estudio piloto de nuestro grupo de investigación en los que se evaluó el perfil de citoquinas/quimioquinas a partir de PBMC de voluntarios con PAA versus controles (datos no publicados), sostienen que estas células exhiben un perfil pro inflamatorio en individuos con PAA. A partir de 105 proteínas inflamatorias analizadas, 27 de ellas con características proinflamatorias exhibieron niveles significativamente mayores en PAA, las que incluyeron el marcador de activación de monocitos CD14+ soluble, CRP y MMP-9. Estos resultados avalan la activación de los monocitos circulantes en PAA, sin embargo y en línea con nuestros resultados, IL-10 e IL-12 no serían los blancos principales de regulación. Por otro lado, la ausencia de cambios en la expresión de TLR-4, receptor central en el reconocimiento del LPS de bacterias Gram negativo, sugiere que otros inmunógenos circulantes podrían gatillar la activación de monocitos, a través de otros PRRs.

Al evaluar la asociación entre los niveles de expresión de TLR-4, IL-10 e IL-12, se encontró una correlación positiva con significancia estadística entre TLR-4 y ambas citoquinas en el grupo control, esto podría indicar que los efectos pro inflamatorios de IL-12 estarían, en parte, contrarrestados por la acción de IL-10, lo que no ocurriría en el grupo con PAA a través de TLR-4.

En resumen, el presente estudio no identificó diferencias en la expresión génica de TLR-4, IL-10 e IL-12 en PBMC de individuos con PAA y controles sanos, sugiriendo que estas células no serían activadas vía TLR-4. Los resultados de este estudio sugieren que otros inmunógenos circulantes y PRRs podrían estar involucrados en una potencial activación de PBMC en PAA, abriendo nuevos focos de estudio en la patogénesis de la inflamación sistémica asociada a PAA.

## **CONCLUSIONES**

A partir del presente trabajo de investigación se puede concluir que no hay diferencias significativas en los niveles de expresión génica de TLR-4, IL-10 e IL-12 en PBMC de individuos con PAA y controles sanos; por lo tanto, la respuesta sistémica a la PAA no estaría mediada por una hiperreactividad de células mononucleares mediada por TLR-4.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAE Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology. (2009). *J Endod*, 35(12), 1634. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.035
- Aderem A, U. R. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797), 782-787.
- Bergstrom, J., Babcan, J., & Eliasson, S. (2004). Tobacco smoking and dental periapical condition. *Eur J Oral Sci*, 112(2), 115-120. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00112.x
- Botta, G. A., Arzese, A., Minisini, R., & Trani, G. (1994). Role of structural and extracellular virulence factors in gram-negative anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis*, 18 Suppl 4, S260-264.
- Candel-Marti, M. E., Flichy-Fernandez, A. J., Alegre-Domingo, T., Ata-Ali, J., & Penarrocha-Diago, M. A. (2011). Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16(4), e518-521.
- Colic, M., Gazivoda, D., Vasilijic, S., Vucevic, D., & Lukic, A. (2010). Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *J Oral Pathol Med*, 39(9), 690-696. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00925.x
- Cotti, E., Dessi, C., Piras, A., Flore, G., Deidda, M., Madeddu, C., Mercurio, G. (2011). Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. *J Endod*, 37(12), 1624-1629. doi: 10.1016/j.joen.2011.09.006
- Cotti, E., Dessi, C., Piras, A., & Mercurio, G. (2011). Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. *Int J Cardiol*, 148(1), 4-10. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.08.011
- Cotti, E., & Mercurio, G. (2015). Apical periodontitis and cardiovascular diseases: previous findings and ongoing research. *Int Endod J*, 48(10), 926-932. doi: 10.1111/iej.12506
- Eke, P. I., Page, R. C., Wei, L., Thornton-Evans, G., & Genco, R. J. (2012). Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*, 83(12), 1449-1454. doi: 10.1902/jop.2012.110664

- Fernandez, A., Cardenas, A. M., Astorga, J., Veloso, P., Alvarado, A., Merino, P., Hernandez, M. (2019). Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and its association with matrix metalloproteinases in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. doi: 10.1007/s00784-019-02861-9
- Fokkema, S. J. (2012). Peripheral blood monocyte responses in periodontitis. *Int J Dent Hyg*, 10(3), 229-235. doi: 10.1111/j.1601-5037.2012.00572.x
- Garrido, M., Cardenas, A. M., Astorga, J., Quinlan, F., Valdes, M., Chaparro, A., Hernandez, M. (2019). Elevated Systemic Inflammatory Burden and Cardiovascular Risk in Young Adults with Endodontic Apical Lesions. *J Endod*, 45(2), 111-115. doi: 10.1016/j.joen.2018.11.014
- Garrido, M., Dezerega, A., Bordagaray, M. J., Reyes, M., Vernal, R., Melgar-Rodriguez, S., Hernandez, M. (2015). C-reactive protein expression is up-regulated in apical lesions of endodontic origin in association with interleukin-6. *J Endod*, 41(4), 464-469. doi: 10.1016/j.joen.2014.12.021
- Gazivoda, D., Dzopalic, T., Bozic, B., Tatomirovic, Z., Brkic, Z., & Colic, M. (2009). Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med*, 38(7), 605-611. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00788.x
- Graves, D. T., Oates, T., & Garlet, G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*, 3. doi: 10.3402/jom.v3i0.5304
- Gutmann, J. L., Baumgartner, J. C., Gluskin, A. H., Hartwell, G. R., & Walton, R. E. (2009). Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *J Endod*, 35(12), 1658-1674. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.028
- Hamza, T., Barnett, J. B., & Li, B. (2010). Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci*, 11(3), 789-806. doi: 10.3390/ijms11030789
- Hernandez-Caldera, A., Vernal, R., Paredes, R., Veloso-Matta, P., Astorga, J., & Hernandez, M. (2018). Human periodontal ligament fibroblasts synthesize C-reactive protein and Th-related cytokines in response to interleukin (IL)-6 trans-signalling. *J Endod*, 51(6), 632-640. doi: 10.1111/iej.12872

- Herrera, B. S., Bastos, A. S., Coimbra, L. S., Teixeira, S. A., Rossa, C., Jr., Van Dyke, T. E., Spolidorio, L. C. (2014). Peripheral blood mononuclear phagocytes from patients with chronic periodontitis are primed for osteoclast formation. *J Periodontol*, *85*(4), e72-81. doi: 10.1902/jop.2013.130280
- Holden, J. A., Attard, T. J., Laughton, K. M., Mansell, A., O'Brien-Simpson, N. M., & Reynolds, E. C. (2014). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect Immun*, *82*(10), 4190-4203. doi: 10.1128/IAI.02325-14
- Jagannathan, R., Lavu, V., & Rao, S. R. (2014). Comparison of the proportion of non-classic (CD14+CD16+) monocytes/macrophages in peripheral blood and gingiva of healthy individuals and patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, *85*(6), 852-858. doi: 10.1902/jop.2013.120658
- Jimenez-Pinzon, A., Segura-Egea, J. J., Poyato-Ferrera, M., Velasco-Ortega, E., & Rios-Santos, J. V. (2004). Prevalence of apical periodontitis and frequency of root-filled teeth in an adult Spanish population. *Int Endod J*, *37*(3), 167-173.
- Khalighinejad, N., Aminoshariae, M. R., Aminoshariae, A., Kulild, J. C., Mickel, A., & Fouad, A. F. (2016). Association between Systemic Diseases and Apical Periodontitis. *J Endod*, *42*(10), 1427-1434. doi: 10.1016/j.joen.2016.07.007
- Kirkevang, L. L., Horsted-Bindslev, P., Orstavik, D., & Wenzel, A. (2001). Frequency and distribution of endodontically treated teeth and apical periodontitis in an urban Danish population. *Int Endod J*, *34*(3), 198-205.
- Krall, E. A., Abreu Sosa, C., Garcia, C., Nunn, M. E., Caplan, D. J., & Garcia, R. I. (2006). Cigarette smoking increases the risk of root canal treatment. *J Dent Res*, *85*(4), 313-317. doi: 10.1177/154405910608500406
- Laheij, A. M., van Loveren, C., Deng, D., & de Soet, J. J. (2015). The impact of virulence factors of Porphyromonas gingivalis on wound healing in vitro. *J Oral Microbiol*, *7*, 27543. doi: 10.3402/jom.v7.27543
- León, P., Ilabaca, M., Alcota, M., & González, F. (2011). Frecuencia de periodontitis apical en tratamientos endodónticos de pregrado. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, *4*, 126-129.

- Leonardi, R., Perrotta, R. E., Loreto, C., Musumeci, G., Crimi, S., Dos Santos, J. N., Pannone, G. (2015). Toll-like receptor 4 expression in the epithelium of inflammatory periapical lesions. An immunohistochemical study. *Eur J Histochem*, *59*(4), 2547. doi: 10.4081/ejh.2015.2547
- Liljestrand, J. M., Mantyla, P., Paju, S., Buhlin, K., Kopra, K. A., Persson, G. R., Pussinen, P. J. (2016). Association of Endodontic Lesions with Coronary Artery Disease. *J Dent Res*, *95*(12), 1358-1365. doi: 10.1177/0022034516660509
- Lima, P. M., Souza, P. E., Costa, J. E., Gomez, R. S., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2011). Aggressive and chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol*, *82*(1), 86-95. doi: 10.1902/jop.2010.100248
- Liu, Y. Z., Maney, P., Puri, J., Zhou, Y., Baddoo, M., Strong, M., Deng, H. W. (2016). RNA-sequencing study of peripheral blood monocytes in chronic periodontitis. *Gene*, *581*(2), 152-160. doi: 10.1016/j.gene.2016.01.036
- Merino, A., Noguerras, S., Buendia, P., Ojeda, R., Carracedo, J., Ramirez-Chamond, R., Aljama, P. (2008). Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. *Contrib Nephrol*, *161*, 83-88. doi: 10.1159/000130412
- Miyajima, S., Naruse, K., Kobayashi, Y., Nakamura, N., Nishikawa, T., Adachi, K., Matsubara, T. (2014). Periodontitis-activated monocytes/macrophages cause aortic inflammation. *Sci Rep*, *4*, 5171. doi: 10.1038/srep05171
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, *19*, 683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683
- Nair, P. N. (2004). Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*, *15*(6), 348-381.
- Obregón F, G. M., Dezerega A, Hernández M. (2015). Actividad de metaloproteinasa de matriz extracelular-9 en fluido crevicular gingival durante la respuesta reparativa en periodontitis apical asintomática. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*, *8*(1), 54-59.
- Pasqualini, D., Bergandi, L., Palumbo, L., Borraccino, A., Dambra, V., Alovise, M., Berutti, E. (2012). Association among oral health, apical periodontitis, CD14

- polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. *J Endod*, 38(12), 1570-1577. doi: 10.1016/j.joen.2012.08.013
- Persic Bukmir, R., Jurcevic Grgic, M., Brumini, G., Spalj, S., Pezelj-Ribaric, S., & Brekalo Prso, I. (2016). Influence of tobacco smoking on dental periapical condition in a sample of Croatian adults. *Wien Klin Wochenschr*, 128(7-8), 260-265. doi: 10.1007/s00508-015-0910-8
- Petersen, J., Glassl, E. M., Nasser, P., Crismani, A., Luger, A. K., Schoenherr, E., Glodny, B. (2014). The association of chronic apical periodontitis and endodontic therapy with atherosclerosis. *Clin Oral Investig*, 18(7), 1813-1823. doi: 10.1007/s00784-013-1156-3
- Rodriguez, F. R., Taner, B., Weiger, R., & Walter, C. (2013). Is smoking a predictor of apical periodontitis? *Clin Oral Investig*, 17(8), 1947-1955. doi: 10.1007/s00784-012-0893-z
- Sasaki, H., Hou, L., Belani, A., Wang, C. Y., Uchiyama, T., Muller, R., & Stashenko, P. (2000). IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*, 165(7), 3626-3630.
- Segura-Egea, J. J., Martin-Gonzalez, J., & Castellanos-Cosano, L. (2015). Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*, 48(10), 933-951. doi: 10.1111/iej.12507
- Sima, C., & Glogauer, M. (2013). Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontol 2000*, 63(1), 80-101. doi: 10.1111/prd.12032
- Stashenko, P., Wang, C. Y., Riley, E., Wu, Y., Ostroff, G., & Niederman, R. (1995). Reduction of infection-stimulated periapical bone resorption by the biological response modifier PGG glucan. *J Dent Res*, 74(1), 323-330. doi: 10.1177/00220345950740010701
- Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 16(1), 3-9.
- Urbanski, K., Ludew, D., Filip, G., Filip, M., Sagan, A., Szczepaniak, P., Guzik, T. J. (2017). CD14(+)CD16(++) "nonclassical" monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*, 117(5), 971-980. doi: 10.1160/th16-08-0614

- Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*, 59, 391-412. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.002
- Yamaguchi, R., Yoshimura, A., Yoshioka, H., Kaneko, T., & Hara, Y. (2009). Ability of supragingival plaque to induce toll-like receptor 4-mediated stimulation is associated with cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J Periodontol*, 80(3), 512-520. doi: 10.1902/jop.2009.080393
- Zhang, C., & Hou, B. X. (2007). [Expression of lipopolysaccharide receptors CD14 and TLR4 in a model of rat molar apical periodontitis]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 42(3), 148-149.

## ANEXOS

## ANEXO 1



Ed-29 junio 2016

---

**ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**


---

Dr. Eduardo Fernández Pdtte./ Sra. P. Navarrete Secrf/ Dr. M. Cornejo Vice-Pdtte/ Sr. R. La Rosa / Dr. R. Cabello/ Dr. Mauricio Baeza/ Dra. Weronika Weil / Dr. A. Molina

INFORME N°:2016/08

1. **Acta de Aprobación de Proyecto FONDECYT titulado “Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica” Versión 04/2016.**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

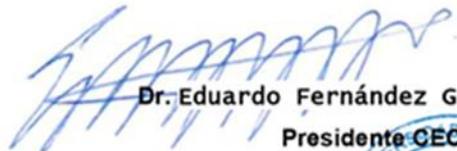
Dr. Eduardo Fernández Presidente CEC	Sra. Paulina Navarrete Secretaria CEC	Dr. Marco Cornejo Vice Pdtte. CEC
Dr. Mauricio Baeza Miembro permanente CEC	Sr. Roberto La Rosa Miembro permanente CEC	Dra. Weronika Weil Miembro permanente CEC
Dr. Rodrigo Cabello Miembro permanente CEC	Dr. Alfredo Molina Miembro alterno CEC	
3. **Fecha de Aprobación: 29/06/2016**
4. **Título completo del proyecto: “Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica” Versión 04/2016”.**
5. **Investigador responsable:** Dra. Marcela Hernández Ríos.
6. **Institución Patrocinante:** Facultad de Odontología – Universidad de Chile
7. **Documentación Revisada:**
  - Consentimiento Informado (CI) (Pacientes) aprobado por el CEC, con timbre y fecha de edición correspondiente, debidamente fechado y firmado por todos los involucrados.
  - Certificado del CIB
  - Carta del Director de Departamento
  - Proyecto de Investigación

### 8.- Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizarán las modificaciones en relación a los siguientes aspectos:

- Fueron modificados en cuanto a formato y contenido el Consentimiento y Asentimiento Informado.
- Se agregaron beneficios por participar en el estudio (limpieza dental, y examen dental clínico y radiográfico, exámenes de perfil lipídico, CRP y hemoglobina glicosilada sin costo).
- Se incorpora un flujograma explicativo con los tiempos e intervenciones sobre los participantes en el proyecto.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado "Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica"

  
Dr. Eduardo Fernández G.  
Presidente CEC



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

## ANEXO 2



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR  
EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CON TOMA DE MUESTRA DE SANGRE**

Este formulario de consentimiento puede contener algunas palabras que usted probablemente no entienda, si es así puede pedir explicaciones al investigador.

**Investigador Principal:** Marcela Hernández Ríos. Email: [mhernandezrios@odontologia.uchile.cl](mailto:mhernandezrios@odontologia.uchile.cl). Fono: 229781833

**Título del Proyecto:** PERFILES DE RESPUESTA DE MACRÓFAGOS INDUCIDOS POR PATÓGENOS ENDODÓNTICOS Y SU REGULACIÓN EPIGENÉTICA COMO DETERMINANTES PARA LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LA PERIODONTITIS APICAL CRÓNICA

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea cuidadosamente este formulario de consentimiento y discuta cualquier inquietud que usted tenga con el investigador. Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar la decisión.

**1.- Solicitud de participación**

Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un proyecto de investigación sobre periodontitis apical crónica, bajo la supervisión de la Dra. Marcela Hernández Ríos, de la Universidad de Chile. Esta enfermedad corresponde a una infección de origen dental que generalmente se produce como consecuencia de caries y evolución con el tiempo hacia la formación de una lesión de los tejidos que rodean a la raíz del diente (lesión periapical). El tratamiento indicado para estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas. El propósito de esta investigación es caracterizar la infección y respuesta inflamatoria en individuos afectados en forma previa y posterior al tratamiento endodóntico. Para esto, obtendremos muestras de lesiones periapicales o ligamento periodontal sano en dientes con indicación de extracción, o bien, fluido de los canales radiculares y sangre de los voluntarios con indicación de endodoncia o controles y su participación consistirá exclusivamente en donar muestras que serán tomadas por profesionales expertos con estricta confidencialidad de sus datos.

**2.- Si usted participa usted deberá realizar:**

- a) Una entrevista previa a la toma de muestra. Además se le realizará un examen clínico oral gratuito. La entrevista dura aproximadamente 15 minutos; la información suministrada en la entrevista es confidencial.
- b) En el caso de estar indicado el tratamiento de canal, se extraerán 200 ml de sangre de su brazo antes del tratamiento y en los controles de uno, seis y 12 meses post tratamiento. Una parte de esta sangre (leucocitos mononucleares y suero) se usará para determinar la respuesta inmune celular asociada a esta patología oral. Se analizarán en laboratorio del Hospital Clínico de la Universidad de Chile perfil lipídico, hemoglobina glicosilada y proteína C reactiva. Además se le tomarán muestras del canal radicular del diente afectado durante la realización del tratamiento de canal (endodóntico). En el caso de no tener dientes con periodontitis apical (controles), sólo se le tomará una muestra de sangre durante la primera visita. En el caso de tener indicación de extracción de dientes con periodontitis apical o dientes sanos por indicación de ortodoncia, se extraerán los tejidos blandos adheridos al diente para análisis de la respuesta inmune local.

**3. Criterios de inclusión.**

Sujetos sanos (sin enfermedad actual general ni periodontitis apical) hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 45 años sin enfermedades generales.

**4. Criterios de exclusión.**

Individuos en tratamiento antibiótico o antiinflamatorio en los últimos 3 meses previos a la selección odontológica.

**3.- Riesgo y efectos adversos que pueden estar asociados a la investigación**

Usted puede experimentar ligeras molestias en el sitio de la extracción de la sangre. Algunas personas experimentan mareos o sensación de debilidad general tras la extracción de la muestra. En el caso de las muestras de fluido de canal radicular o tejidos asociados a dientes extraídos, no existen riesgos ni molestias propias de la obtención de muestra.

**4.- Manejo y difusión de la información**

- a) Los resultados de la investigación son estrictamente con fines científicos y no comerciales. No se entregará información de la investigación a compañías de seguros ni otras personas o instituciones sin su previa autorización.
- b) Los resultados de la investigación podrán ser usados en presentaciones a congresos científicos o publicados en revistas científicas nacionales o internacionales.
- c) A su muestra se le asignará un código numérico. Esto prevendrá que la persona que trabaje con su muestra conozca la identidad del donante.

**5.- Beneficios para usted/sociedad:**

- a) En el caso de realizarse examen de sangre, como beneficios obtendrá examen dental clínico y radiográfico, limpieza dental, y exámenes de perfil lipídico, CRP y hemoglobina glicosilada sin costo.



Usted estará haciendo una libre y generosa donación para la investigación que podrá ser beneficiosa para futuras generaciones. La participación es voluntaria y usted puede rehusar a participar y retirarse de investigación cualquier momento sin ninguna penalidad, en este caso sus leucocitos serán eliminados.

**6.- Seguimiento**

Para proteger sus derechos, la agencia que suministra los fondos (FONDECYT) para este proyecto podría en algún momento inspeccionar los registros suministrados por usted para este proyecto (no por nombres, sino utilizando solamente códigos numéricos). Esto con el fin de asegurarse de que sus derechos han sido protegidos en este proyecto.

**7. Compensaciones**

En caso de daños la compensación será en un 100% de cargo del investigador responsable, liberando de gastos al sujeto y comprenderá la atención médica u odontológica requerida.

**8.- Aclaraciones**

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o si experimenta cualquier problema, puede llamar al investigador responsable Marcela Hernández Ríos teléfonos 229781833.



Si Ud. desea consultar sobre sus derechos como sujeto de investigación o piensa que estos han sido vulnerados se puede dirigir al representante del Comité Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: DR. Eduardo Fernández al teléfono 229781742.

**He leído este formulario de aprobación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo que me darán copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación.**

Nombre del Participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma Participante

\_\_\_\_\_  
RUT

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma Investigador Principal



## ANEXO 4

### Ficha clínica

Nombre:				ID:				
Fecha ingreso:				Diente:				
Género:		Femenino <input type="checkbox"/>		Masculino <input type="checkbox"/>		Edad:		
Nivel educacional: básica incompleta <input type="checkbox"/> básica completa <input type="checkbox"/> media completa <input type="checkbox"/> superior completa <input type="checkbox"/>								
ANAMNESIS								
Enfermedad sistémica actual		No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>		Especificar:				
Tratamiento médico los últimos 6 meses		No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>		Especificar:				
EXAMEN CLÍNICO								
		Maxilar superior			Maxilar inferior			
Periodontitis crónica	No <input type="checkbox"/>	PS (mm)	MV:	V:	DV:	MB:	B:	DB:
			MP:	P:	DP:	ML:	L:	DL:
Si <input type="checkbox"/>		NIC (mm)	MV:	V:	DV:	MB:	B:	DB:
			MP:	P:	DP:	ML:	L:	DL:
Gingivitis		No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>						
COPD	Cariados (N° de dientes):							
	Obturados (N° de dientes):							
	Perdidos (N° de dientes):							
	COPD Total:							
Fuma actualmente		Si <input type="checkbox"/>		No <input type="checkbox"/>				
RIESGO CARDIOVASCULAR								
Presión arterial (mm/Hg)								
IMC (kg/m <sup>2</sup> )								
Colesterol HDL (mg/dL)								
Colesterol LDL (mg/dL)								
Hb glicosilada (%)								
DIAGNÓSTICO								
Diente:		PAA <input type="checkbox"/>		PAS <input type="checkbox"/> Fístula <input type="checkbox"/>		Sano <input type="checkbox"/>		
				Absceso <input type="checkbox"/>				
Diámetro basal de la lesión radiográfica (mm)		Vertical:			Horizontal :			
Tests de sensibilidad (frío/calor)		Positivo <input type="checkbox"/>		Percusión		Positiva <input type="checkbox"/>		
		Negativo <input type="checkbox"/>				Negativa <input type="checkbox"/>		

**EXAMEN PERIODONTAL****Nombre:****Fecha:**

<b>V</b>	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
IG														
SS														
PE														
PS														
NIC														

<b>P</b>	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
IG														
SS														
PE														
PS														
NIC														

<b>V</b>	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7
IG														
SS														
PE														
PS														
NIC														

<b>L</b>	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7
IG														
SS														
PE														
PS														
NIC														

**DIAGNÓSTICO:** Sana  Gingivitis  Periodontitis