



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

**RIESGO CARDIOVASCULAR ASOCIADO A INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN
PACIENTES CON PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA**

Francisca Stella Quinlan Binelli

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Mauricio Garrido Flores

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos

**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**

**RIESGO CARDIOVASCULAR ASOCIADO A INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN
PACIENTES CON PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA**

Francisca Stella Quinlan Binelli

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Mauricio Garrido Flores

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1160741
Santiago - Chile
2019**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores de Tesis, Dr. Mauricio Garrido y Dra. Marcela Hernández, por haberme guiado en llevar a buen puerto este trabajo, por haberme permitido ser parte de su proyecto Fondecyt y por haber creído en mis capacidades. Sin sus conocimientos, dedicación e incentivo nada de esto hubiese sido posible.

También quiero agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Biología Periodontal, especialmente a Jessica Astorga y Bernardita Parada, por su constante apoyo, orientación y cariño entregados a lo largo del desarrollo de mi Tesis; sé que sin ustedes este camino hubiese sido más difícil.

Agradezco también a aquellas personas que trabajan en la Facultad, tanto funcionarios como profesores, que siempre tuvieron la disposición de ayudar.

Y por último, agradecer a mi familia y amigos por haber sido mis pilares de apoyo a lo largo de toda mi carrera, y por haberme impulsado siempre a confiar en mis capacidades y perseguir mis sueños.

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. MARCO TEÓRICO.....	4
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5. RESULTADOS	133
6. DISCUSIÓN	188
7. CONCLUSIONES.....	222
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	233
9. ANEXOS	266

1. RESUMEN

Introducción

La periodontitis apical asintomática (PAA) es una enfermedad en la que se destruyen los tejidos perirradiculares producto de un proceso inflamatorio de origen bacteriano endodóntico, formándose una lesión periapical. Se ha estudiado el rol de infecciones dentales crónicas sobre la ocurrencia de inflamación sistémica, evidenciable como niveles elevados de marcadores inflamatorios séricos, lo que podría contribuir a un aumento del riesgo cardiovascular (RCV) y en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares (ECV). Sin embargo, no existe evidencia mecanística que sustente la asociación entre PAA y RCV, por lo que este estudio busca determinar los niveles séricos de marcadores inflamatorios en pacientes con diagnóstico de PAA y con tejidos periapicales sanos.

Metodología

Se incluyeron 55 voluntarios, 28 sanos y 27 con PAA, sistémicamente sanos, entre 16 y 40 años. Se excluyeron individuos con medicación sistémica con antibióticos, corticoides y/o antiinflamatorios en los últimos 3 meses, embarazadas y pacientes con periodontitis crónica (marginal) moderada o severa. Se consignaron las características sociodemográficas, historia médica y factores de RCV clásicos en cada paciente, además de un examen oral clínico y radiográfico. Las muestras de sangre periférica fueron tomadas en ayuno para determinar perfil lipídico, hemoglobina glicosilada, proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP), IgG, IL-6, IL-10, IL-12, ICAM-1s, VCAM-1s, Selectina-Es, Selectina-Ls, MMP-8 y VWa2. Se realizó análisis estadístico bivariado y multivariado, y se consideró un nivel de confianza de 95% y un $p < 0.05$ para la significancia estadística.

Resultados

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar hsCRP entre grupos, con valores superiores en voluntarios con PAA. Los valores de IL-6, MMP-8 y Selectina-Es también fueron significativamente superiores en el grupo con PAA. El análisis bivariado basado en concentraciones séricas de hsCRP ≥ 1 mg/L evidenció un OR=6.8 y mediante análisis multivariado se encontró una

asociación significativa entre PAA y niveles séricos de hsCRP ≥ 1 mg/L independiente del ajuste del modelo. Además, PAA se asocia de forma significativa a niveles de hsCRP >3 mg/L luego de ajustar el modelo por covariables.

Conclusiones

La PAA se relaciona con inflamación sistémica y RCV moderado/alto determinado por niveles séricos de hsCRP, lo que representa evidencia mecanística que permite asociar la PAA con ECV.

2. MARCO TEÓRICO

Enfermedades Cardiovasculares

Durante décadas las enfermedades cardiovasculares (ECV) han sido objeto de múltiples estudios debido a las altas tasas de morbimortalidad que anualmente provocan a nivel mundial, consolidándose como la principal causa de muerte en Europa y Estados Unidos (Pasqualini et al., 2012). Además de afectar el sistema circulatorio de forma directa, como consecuencia, las ECV provocan una reducción del suministro sanguíneo hacia el resto del organismo.

Si bien su etiología es multifactorial, se han establecido factores clásicos de riesgo cardiovascular (RCV), tales como edad, género, tabaquismo, nivel educacional, presión sistólica, presión diastólica, índice de masa corporal (IMC), colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y hemoglobina glicosilada (Cotti & Mercurio, 2015; Pasqualini et al., 2012), los que tienen un valor predictivo asociado. Si se compara edad y género, los hombres menores de 40 años presentan un RCV mayor que las mujeres, brecha que se reduce cuando estas últimas alcanzan la menopausia y desaparece el factor protector dado por los estrógenos. Sobre los 65 años, el RCV es aproximadamente igual en hombres y mujeres. Con respecto al hábito tabáquico, el riesgo de desarrollar un evento cardiovascular agudo se relaciona directamente con el número de cigarrillos consumidos diariamente y con la cantidad de años que la persona ha mantenido la adicción. Fumadores de más de 20 cigarrillos al día anticipan la ocurrencia de un evento cardiovascular en 20 años aproximadamente. En cuanto a la presión arterial, ésta constituye un factor de RCV cuando existe hipertensión arterial, es decir, valores ≥ 140 mmHg para la presión sistólica y ≥ 90 mmHg para la presión diastólica. Otro factor de RCV lo constituye la obesidad, consignada como un IMC > 29.9 kg/m², y la presencia de diabetes Mellitus tipo 2, establecida con una hemoglobina glicosilada $\geq 6,5$ %. Por último, un perfil lipídico alterado o dislipidemia, es considerado un factor de RCV cuando presenta valores ≥ 200 mg/dl de colesterol total, ≥ 130 mg/dl de colesterol LDL, colesterol HDL ≤ 35 mg/dl y/o triglicéridos ≥ 150 mg/dl (Giampaoli, Palmieri, Mattiello, & Panico, 2005; Studziński, Tomasik, Krzysztoń, Józwiak, & Windak, 2019; Szekanecz, Raterman, Pethó, & Lems, 2019).

En cuanto a la etiopatogenia de las ECV, se ha determinado que una respuesta

inflamatoria puede iniciar y/o perpetuar cualquier etapa de la enfermedad aterosclerótica (Pearson et al., 2003), así como también originar disfunción endotelial y eventos cardiovasculares agudos (Cotti, Dessì, Piras, & Mercurio, 2011).

Inflamación Sistémica y Enfermedades Cardiovasculares

Sumado a las altas tasas de morbimortalidad, las ECV han sido ampliamente estudiadas debido a la multiplicidad de sus factores etiológicos y etiopatogénicos. Esto ha permitido establecer ciertas características comunes dentro de las cuales se encuentran la disfunción del endotelio vascular en etapas tempranas y la presencia de un estado inflamatorio sistémico. Específicamente, en la enfermedad aterosclerótica ambas características se encuentran presentes, lo que ha permitido establecer el rol de la inflamación sistémica en las ECV (Cotti, Dessì, Piras, Flore, et al., 2011; Müller & Griesmacher, 2000; Pearson et al., 2003). Ante un factor de riesgo o injuria, se da inicio a la cascada inflamatoria con la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como interleuquina-1 (IL-1) y 6 (IL-6), las que estimulan al hígado a liberar proteínas de fase aguda, como proteína C reactiva (CRP), y alteran la permeabilidad del endotelio induciendo la expresión y/o liberación de moléculas de adhesión solubles, como molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) y vascular (VCAM-1), y selectinas. Los monocitos son atraídos hacia el endotelio mediante factores quimiotácticos, induciendo su migración hacia la capa sub-íntima y su transformación en macrófagos. Estos últimos secretan metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y otras enzimas de degradación de tejido conectivo, y fagocitan lipoproteínas transformándose en células espumosas, lo que contribuye a la pérdida de músculo liso endotelial. La acumulación de macrófagos, mastocitos y linfocitos-T contribuye al debilitamiento y posterior ruptura de la placa aterosclerótica, induciendo una trombosis u otra ECV (Pearson et al., 2003).

Periodontitis Apical Asintomática

La periodontitis apical (PA) es la inflamación crónica del periodonto apical en respuesta a una infección de origen endodóntico provocada por una colonización polimicrobiana organizada en forma de biopelícula en el interior del sistema de canales radiculares (SCR), compuesta principalmente por bacterias anaeróbicas Gram negativo. Dichas bacterias y sus productos metabólicos y enzimáticos inducen una

respuesta inflamatoria que inicialmente es contenida a nivel apical para prevenir su diseminación. Con el tiempo, la PA provoca la reabsorción del hueso perirradicular con su consecuente reemplazo por tejido inflamatorio, formándose una lesión periapical de origen endodóntico (LPOE) (Garrido et al., 2015). En términos radiográficos, se observa un área radiolúcida periapical que puede corresponder a un quiste radicular inflamatorio o a un granuloma periapical desde un punto de vista anatomopatológico (Gutmann, Baumgartner, Gluskin, Hartwell, & Walton, 2009). Aunque en la mayoría de los casos la PA crónica permanece asintomática, cuyo diagnóstico clínico es periodontitis apical asintomática (PAA), también puede cursar períodos de reagudización manifestando sintomatología, en cuyo caso se diagnostica como periodontitis apical sintomática (PAS), absceso apical agudo (AAA) o absceso apical crónico (AAC); por lo que su diagnóstico se determina mediante estudio clínico-radiográfico (Cotti, Dessì, Piras, & Mercurio, 2011).

Infecciones dentales e Inflamación Sistémica

En los últimos años ha adquirido relevancia el potencial rol de las infecciones dentales crónicas sobre la ocurrencia de inflamación sistémica, evidenciable como niveles elevados de marcadores inflamatorios séricos (Gomes et al., 2013; Paraskevas, Huizinga, & Loos, 2008). Esta inflamación sistémica podría contribuir en la patogénesis de las ECV, tales como disfunción endotelial, aterosclerosis, síndrome coronario agudo e infarto al miocardio (Cotti, Dessì, Piras, & Mercurio, 2011; Pearson et al., 2003), de manera independiente de los factores de riesgo cardiovascular clásicos; sin embargo se desconocen los mecanismos. Estudios en periodontitis crónica marginal han establecido una asociación análoga, principalmente sobre la base de inflamación sistémica de bajo grado (Cotti, Dessì, Piras, & Mercurio, 2011); pero no existen antecedentes mecanísticos para la PAA. Al respecto, los niveles séricos de mediadores de inflamación crónica, especialmente de CRP de alta sensibilidad (hsCRP), pueden ser cuantificados y utilizados para predecir el riesgo de eventos cardiovasculares. Particularmente, la cuantificación de hsCRP permite estratificar, además de predecir, el RCV, lo que la convierte en el marcador de elección y el único validado (Gomes et al., 2013; Pearson et al., 2003; Rader, 2000). Otros hallazgos, tales como la producción de CRP e IL-6 al interior de LPOE (Garrido et al., 2015), niveles séricos aumentados de inmunoglobulina G (IgG) total en pacientes con

LPOE, la detección de bacterias orales en placas ateroscleróticas (Gomes et al., 2013), el potencial rol de CRP en el reclutamiento de monocitos en etapas iniciales de la enfermedad aterosclerótica (Torzewski et al., 2000), y la inducción de expresión de moléculas de adhesión endotelial por parte de CRP en ausencia de lipoproteínas (Pasceri, Willerson, & Yeh, 2000), apuntan hacia la existencia de manifestaciones sistémicas como posible consecuencia de una infección oral localizada.

Sin embargo, la falta de estudios con un diseño metodológico acucioso, con adecuado control de confundentes y de la heterogeneidad clínica de los diagnósticos periapicales, limitan la identificación de los mecanismos que subyacen al aumento del RCV en individuos con PAA descrito por los estudios epidemiológicos. Además, parte de la evidencia disponible se basa en estudios retrospectivos, en los cuales los individuos de estudio presentan ECV ya establecidas y/o rangos etarios que no corresponden al grupo de riesgo. La evidencia mecanística podría contribuir a establecer una asociación biológicamente plausible y por tanto, contribuir a confirmar la asociación entre estas enfermedades, e implementar mejoras en la prevención y tratamiento de éstas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La periodontitis apical asintomática (PAA) se asocia con riesgo cardiovascular (RCV), determinado por marcadores de inflamación sistémica crónica y en particular, por proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP).

Objetivo General

Determinar los niveles séricos de marcadores inflamatorios de riesgo cardiovascular (RCV) en pacientes con diagnóstico de periodontitis apical asintomática (PAA) y en pacientes con tejidos periapicales sanos.

Objetivos Específicos

- 1) Cuantificar los niveles séricos de hsCRP, IL-6, IL-10, IL-12p70, ICAM-1s, VCAM-1s, Selectina-Es, Selectina-Ls, MMP-8, VWa2 e IgG en pacientes con PAA y controles sanos.
- 2) Determinar el riesgo cardiovascular (RCV) asociado a periodontitis apical asintomática (PAA), sobre la base de los niveles séricos de hsCRP.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

El estudio correspondió a un estudio analítico transversal y contó con la aprobación del Comité Ético y Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se encuentra adscrito al Proyecto FONDECYT 1160741, titulado “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” (**Anexo 1**).

Selección de muestras

Se incluyeron 55 voluntarios (n=55), 28 sanos y 27 con diagnóstico de periodontitis apical asintomática (PAA), todos sistémicamente sanos, entre 16 y 40 años, que acudieron a la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

El diagnóstico de PAA fue realizado mediante anamnesis, examen clínico, examen radiológico y pruebas de sensibilidad pulpar y percusión, datos que fueron registrados en una ficha clínica elaborada para tal fin. Además, la ficha clínica incluyó la elaboración de un periodontograma y el registro de los factores clásicos de riesgo cardiovascular (RCV) (**Anexo 2**). A cada paciente se le realizó un estudio radiográfico intraoral completo mediante un set de 11 radiografías retroalveolares periapicales. Los dientes con lesiones periapicales de origen endodóntico (LPOE) fueron evaluados mediante la técnica radiográfica de paralelismo para estandarizar y reducir la distorsión imagenológica (Costa, de Figueiredo Neto, de Oliveira, Lopes e Maia, & de Almeida, 2014). Los criterios de inclusión para el diagnóstico de PAA fueron respuesta negativa a las pruebas de sensibilidad pulpar (frío probado con Endo-Ice® Hygenic® y calor probado con transpoliisopreno), respuesta negativa o positiva leve a la percusión, y que al examen radiográfico se observara una lesión radiolúcida ≥ 3 mm de diámetro promedio (Gutmann et al., 2009; Venskutonis et al., 2015). Los pacientes sin PAA fueron asignados al grupo control (sanos).

Se excluyeron del presente estudio los voluntarios que recibieron medicación sistémica de antibióticos, corticoides o antiinflamatorios en los últimos 3 meses, mujeres embarazadas, pacientes con enfermedades sistémicas u obesidad, y pacientes con periodontitis crónica (marginal) moderada o severa. La evaluación de los parámetros periodontales, incluidos profundidad al sondaje (PS), sangrado al sondaje (SS) y nivel de inserción clínico (NIC), fue realizada por un especialista en periodoncia considerando 6 sitios por diente excluidos los terceros molares. El diagnóstico periodontal se determinó en base a las siguientes definiciones operacionales: pérdida de inserción clínica ≥ 4 mm en dos o más sitios interproximales de dientes distintos, o profundidad al sondaje ≥ 5 mm en dos o más sitios interproximales (también en dientes distintos) para periodontitis moderada; y pérdida de inserción clínica ≥ 6 mm en dos o más sitios interproximales de dientes distintos, y profundidad al sondaje ≥ 5 mm en uno o más sitios interproximales para periodontitis severa (Eke, Page, Wei, Thornton-Evans, & Genco, 2012).

Luego de informado el diagnóstico de PAA, a todos los pacientes se les entregó un documento con información sobre el proyecto, se les explicó el procedimiento y se les realizó el tratamiento endodóntico por un profesional calificado y experto disciplinar. Los adultos debieron firmar un consentimiento informado (**Anexo 3**), y en el caso de los menores de edad, éstos y sus tutores debieron firmar el asentimiento y la autorización respectivos (**Anexo 4**). Todos los documentos fueron previamente aprobados por el Comité Ético y Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Obtención y almacenamiento de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los individuos en ayuno, tanto de los individuos con PAA como del grupo control, mediante punción de la vena antero-cubital por personal técnico calificado. Una fracción de las muestras fue enviada y procesada en el Laboratorio Clínico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile para la determinación de perfil lipídico, hemoglobina glicosilada (HbA1c) y proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) mediante método turbidimétrico. La fracción restante de muestras fue procesada en el Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, mediante

centrifugación durante 10 minutos a 240 g (1600 rpm) para la obtención de suero y se almacenaron a -80°C hasta realizar los análisis respectivos.

ELISA

Los niveles proteicos de IgG se cuantificaron mediante un ensayo ELISA comercial (Human IgG ELISA Kit ®, Abcam, EE.UU), según el procedimiento indicado por el fabricante. Para llevar a cabo este ensayo, se utilizó una placa de 96 pocillos previamente cargados con anticuerpos específicos inmovilizados para IgG humana. Las muestras fueron diluidas a una concentración de 1:10.000.000 para realizar el ensayo, y la intensidad de color amarillo al finalizar el procedimiento fue medida inmediatamente a 450 nm en Biotek Synergy HT.

Ensayo Multiplex

Los niveles de los marcadores de inflamación sistémica IL-6, IL-10, IL-12 p70, ICAM-1s, VCAM-1s, Selectina-Es, Selectina-Ls, MMP-8 y VWa2 fueron cuantificados mediante un panel comercial Multiplex (Magnetic Luminex ® Assay, Human Premixed Multi-Analyte Kit, R&D Systems, Minneapolis, EE.UU) en una plataforma Luminex (MAGPIX, Millipore, St. Charles, EE.UU) según el procedimiento indicado por el fabricante. Las muestras fueron diluidas a una concentración de 1:2, y la intensidad de fluorescencia al finalizar el procedimiento fue medida inmediatamente a 450 nm en el software MILLIPIX AnalystR (Viagene Tech, Carlisle, EE.UU).

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a análisis estadístico utilizando el software STATAv11 (StataCorp, Collage Station, TX, EE.UU), considerando un nivel de confianza de 95% y un $p < 0.05$ para las diferencias estadísticamente significativas. Para determinar la normalidad en la distribución de los datos se utilizó la prueba de Shapiro Wilk. En el análisis bivariado, las diferencias entre dos grupos independientes (PAA y controles) se evaluaron con test T de Student no pareado para variables cuantitativas con distribución normal, o su equivalente no paramétrico, test de Mann-Whitney; y se utilizó test Chi Cuadrado en el caso de las

variables cualitativas. La categorización de riesgo cardiovascular (RCV) se realizó sobre la base de valores de hsCRP estandarizados para riesgo Bajo (<1 mg/L hsCRP), riesgo Medio (1 – 3 mg/L hsCRP) y riesgo Alto (>3 mg/L hsCRP) (Pearson et al., 2003). Las LPOE fueron analizadas considerando presencia o ausencia de >1 lesión. Para determinar asociación entre PAA y RCV se utilizaron modelos de regresión logística bivariados y multivariados, los que se construyeron ingresando covariables y ajustándolas de manera progresiva. En el caso del análisis multivariado, la variable dependiente principal fue el RCV sobre la base de niveles de hsCRP ajustado por variables sociodemográficas, variables orales y factores clásicos de RCV. Los modelos que resultaron en un cambio de la asociación inicial (OR) mayor al 10% para al menos un resultado, fueron incluidos. Una muestra mínima estimada de 18 casos por grupo fue determinada con un poder de 80% y un alfa de 5% basado en niveles séricos de IgG (Gomes et al., 2013).

5. RESULTADOS

Las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes que participaron del estudio se muestran en la Tabla N°1. Según los resultados, las variables periodontales (profundidad al sondaje y nivel de inserción clínico) y el índice COPD muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo de pacientes sanos (controles) y los pacientes con PAA. Al evaluar el número de lesiones apicales en el grupo de pacientes con PAA, se observa que 6 pacientes presentaban simultáneamente más de 1 lesión. Con respecto a la presión arterial, la mayoría de los pacientes presentó rangos normales para presión sistólica y diastólica, aunque en ambos grupos existen 2 casos de hipertensión. Los parámetros sociodemográficos edad, género, nivel educacional, tabaquismo e IMC presentaron una distribución similar entre ambos grupos.

Tabla N°1: Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con PAA y controles.

Variable	Controles (n=28)	PAA (n=27)	<i>p</i>
Edad (años)	24.5 ± 3.9	25.9 ± 5.0	0.3
Género mujer	12 (43%)	11 (41%)	0.9
Nivel educacional	3 (media completa)	3 (media completa)	0.3
Tabaquismo (n, % fumadores)	10 (35.7%)	6 (22.2%)	0.3
IMC (kg/m ²)	24.4 ± 2.6	25.7 ± 3.1	0.1
P. Sistólica (mmHg)	122.9 ± 14.2	118.3 ± 10.3	0.2
P. Diastólica (mmHg)	72.6 ± 9.7	73.7 ± 9.1	0.7
Hipertensión (n, %)	2 (7.1%)	2 (7.4%)	1.0
Índice COPD	8.5 (2)	11 (5)	<0.05
Profundidad al sondaje (mm)	1.8 ± 0.3	2.1 ± 0.4	<0.05
Nivel de inserción clínico (mm)	1.7 (0.5)	2.0 (0.4)	<0.05
>1 lesión apical (n, %)	---	6 (21%)	---

Los valores fueron expresados como promedios \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartílico). Las variables género, tabaquismo, hipertensión y número de lesiones apicales >1 fueron expresadas como frecuencias absolutas y relativas (n, %). PAA: Periodontitis Apical Asintomática. IMC: Índice de Masa Corporal. P. sistólica: Presión sistólica. P. diastólica: Presión diastólica. Índice COPD: Dientes Cariados, Obturados y Perdidos. Valores p fueron aproximados a la décima. Valores p en negrita: $p < 0.05$ (estadísticamente significativos).

Los resultados del perfil lipídico y hemoglobina glicosilada (HbA1c) de los pacientes evaluados en este estudio se muestran en la Tabla N°2. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de los controles y los con PAA para las variables evaluadas. Sin embargo, se observa que 9 pacientes (32.1%) del grupo de controles y 13 (48.1%) del grupo con PAA presentaron dislipidemia, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Tabla N°2: Perfil lipídico y HbA1c en pacientes con PAA y controles.

Variable	Controles (n=28)	PAA (n=27)	p
C. Total (mg/dL)	166.1 \pm 30.7	169.2 \pm 28.7	0.7
C. HDL (mg/dL)	55.7 \pm 16.7	52.2 \pm 15.1	0.4
C. LDL (mg/dL)	90.6 \pm 24.1	92.9 \pm 24.0	0.7
Triglicéridos (mg/dL)	78.0 (59.5)	115.0 (77.0)	0.1
Dislipidemia (n, %)	9 (32.1%)	13 (48.1%)	0.2
HbA1c (%)	5.1 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3	0.6

Los valores fueron expresados como promedios \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartílico). Las variables dislipidemia y HbA1c fueron expresadas como frecuencias absolutas y relativas (n, %) o en porcentaje (%). PAA: Periodontitis Apical Asintomática. C. Total: Colesterol Total. C. HDL: Colesterol HDL o Lipoproteína de alta densidad. C. LDL: Colesterol LDL o Lipoproteína de baja densidad. HbA1c: Hemoglobina Glicosilada. Valores p fueron aproximados a la décima.

Los resultados estadísticos de todos los marcadores de inflamación sistémica que fueron analizados en este estudio, ya sea por método turbidimétrico en el caso

de hsCRP, ELISA para IgG o ensayo Multiplex para el resto de los marcadores, se muestran en la Tabla N°3. Al comparar ambos grupos en estudio, se observan diferencias estadísticamente significativas en los marcadores hsCRP, IL-6, Selectina-Es y MMP-8 ($p < 0.05$). Las moléculas de adhesión solubles ICAM-1, VCAM-1 y Selectina-L no presentaron diferencias estadísticamente significativas, como tampoco lo hicieron IgG, IL-10, IL-12p70 y VWa2.

Tabla N°3: Niveles séricos de marcadores de inflamación sistémica y moléculas de adhesión solubles en pacientes con PAA y controles.

Variable	Controles (n=28)	PAA (n=27)	<i>p</i>
IgG (mg/mL)	88.9 (79.0)	82.2 (94.1)	0.5
hsCRP (mg/L)	0.78 (3.0)	2.5 (4.2)	<0.05
IL-6 (pg/mL)	22.4 (3.7)	23.2 (3.6)	<0.05
IL-10 (pg/mL)	117.1 ± 4.2	117.3 ± 5.5	0.5
IL-12p70 (pg/mL)	542.0 ± 52.0	561.4 ± 53.7	0.1
ICAM-1s (mg/mL)	1300.0 (900.0)	1400.0 (400.0)	1.0
VCAM-1s (mg/mL)	686.5 (230.8)	680.1 (29.1)	0.8
Selectina-Es (mg/mL)	48.0 ± 19.2	56.4 ± 17.1	<0.05
Selectina-Ls (mg/mL)	768.4 ± 76.5	748.7 ± 89.3	0.8
MMP-8 (ng/mL)	3509.0 (2256.0)	4492.0 (4706.0)	<0.05
VWa2 (ng/mL)	1060.3 (1255.9)	824.4 (1300.6)	0.7

Los valores fueron expresados como promedios ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico). PAA: Periodontitis Apical Asintomática. IgG: Inmunoglobulina G. hsCRP: Proteína C Reactiva de alta sensibilidad determinada por método turbidimétrico. IL-6: Interleuquina-6. IL-10: Interleuquina-10. IL-12p70: Interleuquina-12. ICAM-1s: Molécula de adhesión intercelular-1 soluble. VCAM-1s: Molécula de adhesión celular-vascular-1 soluble. Selectina-Es: Selectina-E soluble. Selectina-Ls: Selectina-L soluble. MMP-8: Metaloproteínasa de matriz extracelular-8. VWa2: Factor de Von Willebrand a2. Valores *p* fueron aproximados a la centésima. Valores *p* en negrita: $p < 0.05$ (estadísticamente

significativos).

Los resultados para determinar asociación entre PAA y RCV medio/alto y alto basado en niveles de hsCRP se encuentran expuestos en la Tabla N°4. En el análisis bivariado para riesgo medio/alto (hsCRP ≥ 1 mg/L), se observa un OR=6.8 con un incremento del RCV de 3.3 veces por cada LPOE adicional. En el análisis multivariado, se observa una asociación significativa ($p < 0.05$) entre PAA y RCV medio/alto (hsCRP ≥ 1 mg/L) independientemente del ajuste del modelo. La mayor asociación (OR=12.8) se observa al ajustar el modelo por los factores clásicos de RCV, en contraste con la menor asociación (OR=5.1) observada al ajustar el modelo por covariables orales (Índice COPD y profundidad al sondaje). Por otro lado, se observa una asociación entre PAA y RCV alto (hsCRP > 3 mg/L) al ajustar el modelo multivariado por nivel educacional, hipertensión y profundidad al sondaje (OR=4.0 y $p < 0.05$).

Tabla N°4: Asociación entre PAA y RCV medio/alto (hsCRP ≥ 1 mg/L) y alto (hsCRP > 3 mg/L).

Modelo	hsCRP ≥ 1 mg/L		hsCRP > 3 mg/L	
	OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>
Modelo 1	6.8 (2.0 – 23.3)	<0.05	2.4 (0.8 – 7.5)	0.1
Modelo 2	3.3 (1.3 – 8.9)	<0.05	1.6 (0.7 – 3.6)	0.2
Modelo 3	5.1 (1.3 – 20.4)	<0.05	2.6 (0.7 – 10.1)	0.2
Modelo 4	12.8 (2.4 – 67.1)	<0.05	2.7 (0.8 – 9.5)	0.1
Modelo 5	8.5 (2.0 – 36.9)	<0.05	4.0 (1.0 – 15.7)	<0.05

PAA: Periodontitis Apical Asintomática. RCV: Riesgo Cardiovascular. hsCRP: Proteína C Reactiva de alta sensibilidad determinada por método turbidimétrico. OR: Odds Ratio. IC: Intervalo de Confianza. Valores *p* fueron aproximados a la décima. Valores *p* en negrita: $p < 0.05$ (estadísticamente significativos). Modelo 1: Modelo de regresión logística bivariado. Modelo 2: Modelo de regresión logística bivariado, considerando > 1 LPOE (Lesión periapical de origen endodóntico). Modelo 3: Modelo de regresión logística multivariado, ajustado por Índice COPD (Dientes Cariados, Obturados y Perdidos) y profundidad al

sondaje. Modelo 4: Modelo de regresión logística multivariado, ajustado por factores de RCV clásicos (edad, género, tabaquismo, nivel educacional, hipertensión, IMC, dislipidemia y hemoglobina glicosilada). Modelo 5: Modelo de regresión logística multivariado, ajustado por nivel educacional, hipertensión y profundidad al sondaje.

6. DISCUSIÓN

Si bien estudios epidemiológicos han establecido una relación entre ECV y la presencia de periodontitis apical, la evidencia mecanística que respaldara dicha asociación es limitada. En este estudio se demostró que la presencia de PAA determina un RCV medio a elevado sobre la base de niveles séricos de hsCRP ≥ 1 mg/L, en individuos que no presentan factores de RCV clásicos (Giampaoli et al., 2005; Khalighinejad et al., 2016). Además, se encontraron niveles significativamente elevados de otros marcadores de inflamación sistémica, tales como IL-6, Selectina-Es y MMP-8, en el grupo con PAA en comparación con controles.

Durante la respuesta inflamatoria sistémica, IL-6 induce la expresión de CRP principalmente en el hígado. IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria altamente pleiotrópica que media la respuesta inflamatoria frente a injurias e infecciones, e incluso puede estimular de forma directa la resorción ósea. CRP es una proteína de fase aguda producida principalmente a nivel hepático en respuesta a IL-6 y que, entre otros efectos, induce de manera directa la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular contribuyendo al desarrollo de enfermedad aterosclerótica (Jakovljevic et al., 2015). Además, estudios recientes han reportado la producción de IL-6 y CRP en tejidos extrahepáticos, dentro de los cuales se encuentran las LPOE, lo que podría contribuir a los niveles sistémicos de ambos marcadores inflamatorios. Considerando el potente rol pro-inflamatorio de la CRP extrahepática y la creciente asociación entre periodontitis apical y algunas enfermedades sistémicas, tales como las ECV y diabetes mellitus, se puede inferir que la presencia de LPOE contribuye a la inflamación sistémica y por ende, a las ECV (Garrido et al., 2015).

Por otro lado, tanto Selectina-Es como MMP-8 están involucradas en la enfermedad aterosclerótica y se ha propuesto que podrían tener un valor predictivo de futuros eventos cardiovasculares cuando sus niveles séricos se encuentran aumentados (Libby, Ridker, & Maseri, 2002). Selectina-Es es una molécula de adhesión que se expresa *de novo* en el endotelio vascular en respuesta a estímulos de inflamación sistémica, así como también en algunos tipos de cáncer (Barthel, Gavino, Descheny, & Dimitroff, 2007). Además, ha llegado a ser considerada como

un marcador de disfunción endotelial debido a la asociación que existe entre niveles séricos elevados de la misma y un aumento del RCV, según estudios epidemiológicos. Por ende, los aumentos identificados en Selectina-Es en asociación con PAA podrían reflejar cambios precoces en la función endotelial (Libby et al., 2002). Por otro lado, MMP-8 es una colagenasa pro-inflamatoria que ha sido estudiada como potencial biomarcador de ECV, en tanto que sus niveles séricos se encuentran elevados en dichas enfermedades. Además de facilitar la diapédesis de leucocitos en la aterogénesis y permitir la remodelación y/o ruptura de la matriz extracelular, desestabiliza la placa aterosclerótica aumentando la probabilidad de un evento trombótico (Salminen et al., 2017). Por lo tanto, un incremento estadísticamente significativo en sus niveles séricos en presencia de PAA estaría relacionado con un aumento del RCV y con aterosclerosis.

En este estudio, y en concordancia con un meta-análisis reciente, se esperaba encontrar niveles séricos aumentados de IgG en periodontitis apical, asociación que no fue posible de establecer ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con PAA y el grupo control. Esto podría ser explicado por la inespecificidad de la IgG total como marcador de inflamación sistémica (Gomes et al., 2013). Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los marcadores IL-10, IL-12p70, Selectina-Ls, ICAM-1s, VCAM-1s y VWa2 entre ambos grupos en estudio. Selectina-Ls es una molécula de adhesión que se expresa de manera constitutiva en la membrana de granulocitos, monocitos y algunos linfocitos. Por otro lado, se ha descrito que ICAM-1s, VCAM-1s y VWa2 son marcadores de inflamación sistémica que además están involucrados en la aterogénesis, sin embargo no identificamos cambios en estos marcadores (Barthel et al., 2007; Kastritis et al., 2016).

Durante la activación del sistema inmune producto de una infección o injuria, el endotelio vascular pierde su equilibrio anti- y pro- inflamatorio, lo que se traduce en disfunción endotelial. La producción de moléculas de adhesión, como ICAM-1, VCAM-1 y selectinas, y de quimioquinas como IL-6, IL-10 e IL-12, permiten atraer células inflamatorias y perpetuar la enfermedad aterosclerótica (Müller & Griesmacher, 2000). Algunos estudios han establecido que la CRP está involucrada en la disfunción endotelial, potenciando la inflamación y coagulación. Estos efectos

están mediados por ciertas propiedades de la CRP, entre las cuales destacan la posibilidad de activar el sistema del complemento, inducir la expresión de moléculas de adhesión endotelial de manera independiente de la presencia de lipoproteínas, estimular el reclutamiento de monocitos y macrófagos hacia el endotelio vascular, inducir la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y MMPs, y mediar la transformación de macrófagos en células espumosas en las placas ateroscleróticas, entre otras (Pasceri et al., 2000; Torzewski et al., 2000).

Además, se ha descubierto una relación entre peor higiene oral y mayores niveles séricos de CRP y otros mediadores de inflamación (Frisbee, Chambers, Frisbee, Goodwill, & Crout, 2010), en línea con los hallazgos de este estudio. Al comparar las variables orales entre ambos grupos, se observa que tanto los indicadores periodontales (PS, NIC), como el Índice COPD, fueron mayores en el grupo con PAA ($p < 0.05$). El COPD es un índice que revela el daño dentario acumulado en el tiempo, por lo que un COPD elevado y la presencia de periodontitis marginal frecuentemente se asocian con el desarrollo de PAA.

Existe evidencia epidemiológica consistente que confirma que la periodontitis marginal es un factor de RCV independiente de ECV (Tonetti, Van Dyke, & workshop, 2013). Ésta y la PAA comparten aspectos relevantes de su etiopatogénesis; ambas son originadas por una microbiota predominantemente Gram (-) anaerobia, presentan inflamación crónica con destrucción ósea alveolar y se asocian con inflamación sistémica. La relación anatómica entre dientes y el sistema circulatorio permitiría el paso de bacterias o de sus productos directamente a la sangre, o bien, favorecería la liberación de mediadores de inflamación al torrente sanguíneo (Cotti, Dessì, Piras, & Mercurio, 2011). Debido a lo anteriormente mencionado, y para evitar enmascarar los efectos de la PAA, se realizó un ajuste del modelo multivariado por covariables orales y se excluyó a aquellos pacientes con periodontitis marginal moderada y severa.

La hsCRP es un biomarcador validado, tanto para predecir el RCV como también para estratificar el riesgo en pacientes con una ECV ya establecida. Esto se basa en estudios previos que han determinado una relación directa entre los niveles séricos de hsCRP y el riesgo de incidencia de enfermedad coronaria,

además de tener un valor predictivo de nuevos eventos coronarios en pacientes con angina inestable (Pearson et al., 2003). En nuestro estudio se demostró una sólida asociación entre RCV medio, sobre la base de niveles séricos de hsCRP ≥ 1 mg/L, y PAA, con OR que variaron desde 6.8 en el análisis bivariado hasta 12.8 en un modelo multivariado. Esto refleja que la asociación se mantiene en forma independiente de las covariables. Además, se demostró que el OR aumenta en 3.3 veces en presencia de una segunda LPOE. Al analizar la relación entre PAA y RCV alto (hsCRP > 3 mg/L), se demostró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al ajustar el modelo por covariables (OR=4.0).

Si bien en este estudio ambos grupos presentaron una distribución similar en cuanto a variables sociodemográficas y factores clásicos de RCV, los que fueron controlados mediante el diseño del estudio, el número de pacientes incluidos fue bajo producto de la rigurosidad de criterios de selección; sin embargo, éste fue suficiente para detectar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Por último, a pesar del acucioso control realizado para las variables confundentes, no se puede descartar un grado de sesgo inherente a los estudios observacionales, que podría influenciar la magnitud de las asociaciones encontradas.

Parte de los resultados de este trabajo se publicaron recientemente en el *Journal of Endodontics* (**Anexo 5**).

7. CONCLUSIONES

Existe una asociación entre PAA y RCV, determinado por niveles séricos de marcadores de inflamación sistémica, y en particular por hsCRP, estableciendo evidencia mecanística que relaciona una infección oral localizada con ECV.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barthel, S. R., Gavino, J. D., Descheny, L., & Dimitroff, C. J. (2007). Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 11(11), 1473-1491. doi:10.1517/14728222.11.11.1473
- Costa, T. H., de Figueiredo Neto, J. A., de Oliveira, A. E., Lopes e Maia, M. e. F., & de Almeida, A. L. (2014). Association between chronic apical periodontitis and coronary artery disease. *J Endod*, 40(2), 164-167. doi:10.1016/j.joen.2013.10.026
- Cotti, E., Dessì, 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., Dessì, 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
- Frisbee, S. J., Chambers, C. B., Frisbee, J. C., Goodwill, A. G., & Crout, R. J. (2010). Association between dental hygiene, cardiovascular disease risk factors and systemic inflammation in rural adults. *J Dent Hyg*, 84(4), 177-184.
- Garrido, M., Dezerega, A., Bordagaray, M. J., Reyes, M., Vernal, R., Melgar-Rodríguez, S., . . . Hernández, 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
- Giampaoli, S., Palmieri, L., Mattiello, A., & Panico, S. (2005). Definition of high risk individuals to optimise strategies for primary prevention of cardiovascular diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 15(1), 79-85. doi:10.1016/j.numecd.2004.12.001

- Gomes, M. S., Blattner, T. C., Sant'Ana Filho, M., Grecca, F. S., Hugo, F. N., Fouad, A. F., & Reynolds, M. A. (2013). Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod*, *39*(10), 1205-1217. doi:10.1016/j.joen.2013.06.014
- 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
- Jakovljevic, A., Knezevic, A., Karalic, D., Soldatovic, I., Popovic, B., Milasin, J., & Andric, M. (2015). Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J*, *41*(2), 72-77. doi:10.1111/aej.12072
- Kastritis, E., Papassotiriou, I., Terpos, E., Roussou, M., Gavriatopoulou, M., Komitopoulou, A., . . . Dimopoulos, M. A. (2016). Clinical and prognostic significance of serum levels of von Willebrand factor and ADAMTS-13 antigens in AL amyloidosis. *Blood*, *128*(3), 405-409. doi:10.1182/blood-2016-02-702696
- 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
- Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, *105*(9), 1135-1143.
- Müller, M. M., & Griesmacher, A. (2000). Markers of endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med*, *38*(2), 77-85. doi:10.1515/CCLM.2000.013
- Paraskevas, S., Huizinga, J. D., & Loos, B. G. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*, *35*(4), 277-290. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01173.x
- Pasceri, V., Willerson, J. T., & Yeh, E. T. (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, *102*(18), 2165-2168.
- Pasqualini, D., Bergandi, L., Palumbo, L., Borraccino, A., Dambra, V., Alovisi, 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

- Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O., Criqui, M., . . . Association, A. H. (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, *107*(3), 499-511.
- Rader, D. J. (2000). Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med*, *343*(16), 1179-1182. doi:10.1056/NEJM200010193431609
- Salminen, A., Vlachopoulou, E., Havulinna, A. S., Tervahartiala, T., Sattler, W., Lokki, M. L., . . . Pussinen, P. J. (2017). Genetic Variants Contributing to Circulating Matrix Metalloproteinase 8 Levels and Their Association With Cardiovascular Diseases: A Genome-Wide Analysis. *Circ Cardiovasc Genet*, *10*(6). doi:10.1161/CIRCGENETICS.117.001731
- Studziński, K., Tomasiak, T., Krzysztoń, J., Jóźwiak, J., & Windak, A. (2019). Effect of using cardiovascular risk scoring in routine risk assessment in primary prevention of cardiovascular disease: an overview of systematic reviews. *BMC Cardiovasc Disord*, *19*(1), 11. doi:10.1186/s12872-018-0990-2
- Szekanecz, Z., Raterman, H. G., Pethő, Z., & Lems, W. F. (2019). Common mechanisms and holistic care in atherosclerosis and osteoporosis. *Arthritis Res Ther*, *21*(1), 15. doi:10.1186/s13075-018-1805-7
- Tonetti, M. S., Van Dyke, T. E., & workshop, w. g. o. t. j. E. A. (2013). Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, *84*(4 Suppl), S24-29. doi:10.1902/jop.2013.1340019
- Torzewski, M., Rist, C., Mortensen, R. F., Zwaka, T. P., Bienek, M., Waltenberger, J., . . . Torzewski, J. (2000). C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *20*(9), 2094-2099.
- Venskutonis, T., Plotino, G., Tocci, L., Gambarini, G., Maminskas, J., & Juodzbaly, G. (2015). Periapical and endodontic status scale based on periapical bone lesions and endodontic treatment quality evaluation using cone-beam computed tomography. *J Endod*, *41*(2), 190-196. doi:10.1016/j.joen.2014.10.017

9. ANEXOS

Anexo 1



FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITÉ ÉTICO
CIENTÍFICO

Ed-29 junio 2016

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Dr. Eduardo Fernández Pdte./ Sra. P. Navarrete Secr/ Dr. M. Cornejo Vice-Pdte/ 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 Pdte. 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

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	MV:	V:	DV:	MB:	B:	DB:
			MP:	P:	DP:	ML:	L:	DL:
Si <input type="checkbox"/>		NIC	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 ²)								
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:

V	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														
P	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														
V	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														
L	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

Anexo 3



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. 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 evoluciona 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:

- 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.
- 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 atención 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

- 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.
- Los resultados de la investigación podrán ser usados en presentaciones a congresos científicos o publicados en revistas científicas nacionales o internacionales.
- 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:

- 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

Ed: 28/06/2016

FORMULARIO DE ASENTIMIENTO

He sido invitado a colaborar con la investigación 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. Entiendo que colaboraré donando muestras de tejidos asociados a dientes extraídos. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado y su dirección de correo electrónico.

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente colaborar en esta investigación donando mis dientes extraídos.

Nombre del Participante _____

Firma _____

Nombre del Tutor _____

Firma _____



Santiago, ____/____/____

Sección a llenar por el Investigador o su representante:

He explicado a..... la naturaleza de la investigación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

 Nombre y Firma del Investigador que toma el CI

Fecha

 Nombre y Firma del Investigador Principal

Fecha

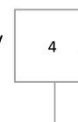
Ed 28/06/16

Fecha firma

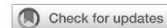
/

4

/



Elevated Systemic Inflammatory Burden and Cardiovascular Risk in Young Adults with Endodontic Apical Lesions



Mauricio Garrido, DDS,* Angélica M. Cárdenas, DDS,^{†‡} Jessica Astorga, BSc,[†] Francisca Quinlan, BSc,[†] Macarena Valdés, MSc, PhD,[§] Alejandra Chaparro, MSc, DDS,[¶] Paola Carvajal, MSc, DDS,* Pirkko Pussinen, PhD,^{||} Patricia Huamán-Chipana, MSc, DDS,** Jorge E. Jalil, MD,^{††} and Marcela Hernández, MSc, DDS, PhD^{†‡‡}

Abstract

Introduction: The aim of this study was to assess whether apical lesions are associated with inflammatory serum markers of cardiovascular risk, especially high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), in young adults. **Methods:** In this cross-sectional study, otherwise healthy individuals with apical lesions of endodontic origin (ALEOs) and a clinical diagnosis of asymptomatic apical periodontitis and controls aged between 18 and 40 years were included. Patients' sociodemographic characteristics, medical history, and classic cardiovascular risk factors were recorded, and the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth score was calculated. Oral clinical and radiographic examinations were performed. Blood samples were collected to determine the lipid profile, glycated hemoglobin, hsCRP, immunoglobulin G, interleukin (IL)-6, IL-10, IL-12p70, matrix metalloproteinase 8, soluble vascular cellular adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1, and soluble E-selectin. Bivariate and multivariate analyses adjusting for oral and classic cardiovascular risk factors were performed. **Results:** hsCRP levels were significantly higher in ALEO patients versus controls (median = 2.54 vs 0.78), whereas the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth score was comparable among the groups. Also, the levels of IL-6, matrix metalloproteinase 8, and soluble E-selectin were significantly higher in ALEO patients. hsCRP, IL-6, and IL-12 correlated with soluble adhesion molecules. Bivariate analysis based on hsCRP serum concentrations ≥ 1 mg/L showed an odds ratio (OR) = 6.8, and the risk increased 3.3 times for an additional ALEO. In multivariate analysis, ALEO was significantly associated with hsCRP levels ≥ 1 mg/L

(OR = 5.1–12.8) independently of the adjustment model. ALEO also associated with CRP levels >3 mg/L, which was significant after the adjustment for covariates (OR = 4.0). **Conclusions:** ALEO is associated with the systemic inflammatory burden and cardiovascular risk determined by hsCRP, supporting a mechanistic link for cardiovascular diseases in young adults. (*J Endod* 2019;45:111–115)

Key Words

Cardiovascular diseases, C-reactive protein, E-selectin, interleukin 6, periapical periodontitis

Apical periodontitis is an inflammation of the apical periodontium. From a clinical point of view, it is heterogeneous and varies between acute and chronic manifestations depending on the dynamic balance between endodontic bacterial consortia and the host's immune response. The hallmark of its chronic forms is the formation of an osteolytic apical lesion of endodontic origin (ALEO), and the most frequent clinical presentation is asymptomatic apical periodontitis (1–4).

In general terms, low-grade chronic dental infections have been associated with several systemic conditions at different degrees. Recent evidence sustains an epidemiologic link between ALEOs and cardiovascular diseases (CVDs), such as endothelial dysfunction (5), atherosclerosis (6), and coronary heart disease (7, 8), in an analogous fashion to marginal periodontal diseases. This might be especially evident in young adults under 40 years old who do not accumulate other risk factors (9, 10).

From a mechanistic point of view, it is widely accepted that an elevated systemic inflammatory burden significantly influences the development and progression of CVDs (9). Elevated levels of inflammatory bioactive molecules, including acute-phase

Significance

Available epidemiologic evidence between endodontic infections and cardiovascular diseases requires biologic plausibility. We show that young adults with endodontic apical lesions have an elevated systemic inflammatory burden, providing a clear mechanistic link with moderate-high cardiovascular risk.

From the *Department of Conservative Dentistry and [†]Laboratory of Periodontal Biology, Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry and [‡]Epidemiology Program, Public Health School, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile; [§]Health Sciences Division, Faculty of Dentistry, Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, Colombia; [¶]Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Universidad de los Andes, Santiago, Chile; ^{||}Oral and Maxillofacial Diseases, University of Helsinki and Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland; ^{**}Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Peru; ^{††}Division of Cardiovascular Diseases, School of Medicine, Pontifical Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile; and ^{†††}Dentistry Unit, Faculty of Health Sciences, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile.

Address requests for reprints to Dr Marcela Hernández, Av Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago, Chile. E-mail address: mhernandezrios@gmail.com 0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2018 American Association of Endodontists.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.11.014>

Clinical Research

proteins (high-sensitivity [hs] C-reactive protein [CRP]), cytokines (tumor necrosis factor alpha and interleukin [IL]-1, IL-6, IL-12, and IL-10), matrix metalloproteinases (MMPs [MMP-8 and MMP-9]), and soluble adhesion molecules (soluble [s] E-selectin, vascular cellular adhesion molecule [VCAM]-1, and intercellular adhesion molecule [ICAM]-1), are involved in virtually all steps of atherogenesis and show predictive potential for future vascular events (11–13).

Despite the epidemiologic association, there is still a lack of evidence confirming the biologic plausibility between apical periodontitis and cardiovascular risk. A recent meta-analysis reported limited evidence of higher levels of serum immunoglobulins (Igs) in association with apical periodontitis although other relevant inflammatory markers, such as hsCRP and IL-6, remained inconclusive (9). This is particularly important because hsCRP levels represent the only valid standardized biomarker for predicting cardiovascular risk (13, 14). There are few available studies on this issue, and most of them lack adequate control for classic and nonclassic cardiovascular risk factors, such as marginal chronic periodontitis. They also include clinically heterogeneous forms of apical periodontitis and populations older than the target risk group. We aimed to assess whether ALEO is associated with inflammatory serum markers of cardiovascular risk, especially hsCRP, in young adults.

Methods

Study Participants

A cross-sectional study was conducted adhering to the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology guidelines. Patients between 18 and 40 years old consulting at the Clinic of the Faculty of Dentistry, Universidad de Chile, Santiago, Chile, were enrolled between 2012 and 2017 if they had a clinical diagnosis of asymptomatic apical periodontitis (2), no previous endodontic treatment, and no antecedent of current acute or chronic systemic disease. ALEO was defined by the presence of at least 1 radiographic radiolucency (≥ 3 mm) in teeth with extensive caries and negative clinical tests of pulp sensitivity. Controls met the same criteria and the absence of any tooth with ALEO. Exclusion criteria were the presence of moderate to severe marginal periodontal diseases (15, 16), obesity (body mass index [BMI] ≥ 30 kg/m²), anti-inflammatory and/or antibiotic treatment in the previous 3 months, and pregnancy. The protocol was approved by the institutional review board and clearly explained to all study participants in compliance with relevant laws and ethics guidelines; written informed consent forms were signed.

Medical and Oral Examinations

Patients' sociodemographic characteristics and medical history were recorded. Physical examinations and blood samples were performed by trained health care personnel. Classic cardiovascular risk factors were assessed, including age, sex, educational level, current smoking habit, BMI, blood pressure, lipid profile, and glycated hemoglobin. Hypertension was defined as a systolic blood pressure measurement ≥ 140 mm Hg or diastolic blood pressure ≥ 90 mm Hg. Dyslipidemia was defined as total cholesterol ≥ 200 mg/dL, low-density lipoprotein ≥ 130 mg/dL, high-density lipoprotein < 40 mg/dL, triglycerides ≥ 150 mg/dL, or a combination thereof. The pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) score was calculated to estimate cardiovascular risk in young adults as previously reported (17, 18).

Oral clinical examinations were conducted by oral specialists at the clinic. The total periapical radiographic examinations were obtained. Clinical full-mouth recordings, including clinical periapical diagnosis, and the decayed/missing/filled teeth (DMFT) index were performed by 1 calibrated specialist in endodontics (M.G.).

Periodontal clinical parameters were evaluated by a trained periodontist (A.M.C.) at 6 sites in all teeth, including probing depths (PDs), the clinical attachment level, and bleeding on probing at the base of the crevice, excluding third molars. The periodontal assessment was made with a manual periodontal probe (UNC 15; Hu-Friedy, Chicago, IL). Periodontal diseases were defined and classified according to the study by Eke et al (19). A total of 27 patients and 28 controls entered in the protocol and received proper oral care.

Blood Samples and Laboratory Analysis

Fasting blood samples were obtained by venipuncture of the antecubital vein. Blood sample fractions were submitted to the clinical laboratory of the university hospital for determination of glycosylated hemoglobin, lipid profile, and hsCRP (range, 0.1–15 mg/L) and to the Laboratory of Periodontal Biology for further quantitative biomarker analysis.

Serum was obtained by centrifugation and frozen at -80°C for posterior analysis. IgG levels were quantified by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit according to the manufacturer's recommendations (R&D Systems, Minneapolis, MN). IL-6, IL-10, IL-12p70, MMP-8, sVCAM-1, sICAM-1, and sE-selectin were quantified by multiplex panels (R&D Systems) in a Luminex platform (Magpix, Millipore, St Charles, MO) and analyzed with MILLIPIX AnalystR software (Viagene Tech, Carlisle, MA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using STATA v12 software (Stata-Corp, College Station, TX). Only individuals accounting for the whole data set were included in the analysis. *P* values $< .05$ were considered statistically significant. Comparisons of quantitative variables between 2 independent groups (ALEO vs controls) were analyzed by the unpaired *t* test or the nonparametric Mann-Whitney test according to data distribution and the chi-square test for categorical variables. The association between serum markers was evaluated with Spearman rank correlation. The association between apical lesions and cardiovascular risk was determined by hsCRP ≥ 1.0 mg/L and hsCRP > 3.0 mg/L as the primary outcomes (American College of Cardiology Foundation/American Heart Association guidelines 2010). Apical lesions were analyzed as the presence or absence of ≥ 1 ALEO(s) and the number of lesions. The associations were assessed with bivariate and multivariate logistic regression analyses. Models were constructed by entering covariate adjustment progressively, starting with demographic variables, oral variables, classic cardiovascular risk factors, and stepwise adjustment. The models that resulted in a change of the initial association (odds ratio [OR]) $> 10\%$ for at least 1 primary outcome were included. An estimated minimum sample size of 18 cases per group was determined with a power of 80% and an alpha level of 5% based on serum IgG levels (9).

Results

Demographic and oral clinical parameters in healthy controls ($n = 28$) and ALEO patients ($n = 27$) are shown in Table 1. Demographic parameters including age, sex, educational level, smoking habit, and BMI were similarly distributed. Blood pressure ranged within normal values in most individuals. A few hypertensive cases were identified and equally distributed in the control ($n = 2$, 7.1%) and ALEO groups ($n = 2$, 7.4%, $P > .05$). Oral parameters, including the DMFT index, PDs, and clinical attachment level, were significantly higher in the ALEO group ($P < .05$). Mild periodontitis was present in 16 patients in the apical lesion group and 11 controls ($P < .05$).

Clinical Research

TABLE 1. Demographic, Clinical, and Laboratory Parameters of Patients with Endodontic Apical Lesions and Controls

Variable	Controls (n = 28)	ALEO (n = 27)	P Value
Age (years, mean ± SD)	24.5 ± 3.9	25.9 ± 5.0	.3
Females (n, %)	12 (43)	11 (41.0)	.9
Educational level (median)	Complete high school	Complete high school	.3
Smokers (%)	10 (35.7)	6 (22.2)	.3
BMI (kg/m ²)	24.4 ± 2.6	25.7 ± 3.1	.1
Systolic pressure (x ± SD)	122.9 ± 14.2	118.3 ± 10.3	.2
Diastolic pressure (x ± SD)	72.6 ± 9.7	73.7 ± 9.1	.7
Hypertension (n, %)	2 (7.1)	2 (7.4)	1.0
DMFT index (median [IQR])	8.5 (2)	11 (5)	<.05
Probing depth (mm, mean ± SD)	1.8 ± 0.3	2.1 ± 0.4	<.05
Clinical attachment level (mm, median [IQR])	1.7 (0.5)	2.0 (0.4)	<.05
Mild periodontitis, n >1 ALEO (n, %)	11	16 (6 (21))	<.05
Total cholesterol (mg/dL, mean ± SD)	166.1 ± 30.7	169.2 ± 28.7	.7
HDL cholesterol (mg/dL, mean ± SD)	55.7 ± 16.7	52.2 ± 15.1	.4
LDL cholesterol (mg/dL, mean ± SD)	90.6 ± 24.1	92.9 ± 24.0	.7
Triglycerides (mg/dL, median [IQR])	78.0 (59.5)	115.0 (77.0)	.1
Dyslipidemia (n, %)	9 (32.1)	13 (48.1)	.2
HbA1c (% mean ± SD)	5.1 ± 0.2	5.18 ± 0.3	.6
PDAY score	7.6 (4.0)	9.2 (5.3)	.2

ALEO, apical lesion of endodontic origin; BMI, body mass index; DMFT, decayed/missing/filled teeth; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; IQR, interquartile range; LDL, low-density lipoprotein; PDAY, pathobiological determinants of atherosclerosis in youth; SD, standard deviation; x, mean.

Patients had 1 ($n = 21$, 77.8%) or 2 apical lesions ($n = 6$, 21%). Clinical laboratory parameters including the lipid profile and glycated hemoglobin were similarly distributed between the groups ($>.05$). Among them, 9 (32.1%) and 13 (48.1%) individuals from the control and ALEO groups, respectively, had dyslipidemia without significant statistical differences ($P > .05$). PDAY score calculation resulted in slightly higher values in the apical lesion group compared with the controls (9.2 and 7.6, respectively) with no significant differences ($P > .05$).

The systemic inflammatory burden is presented in Table 2. Serum hsCRP levels were significantly higher in the ALEO group (median = 2.5, interquartile range = 4.2 mg/L) compared to the controls (median = 0.78, interquartile range = 3.0 mg/L, $P \leq .05$). In keeping with this, the levels of IL-6, MMP-8, and sE-selectin were significantly higher in the ALEO group versus the controls ($P = .048$, $.045$, and 0.045 , respectively). IgG, IL-10, and IL-12p70 showed no statistically significant differences ($P > .05$).

Correlations between serum markers in the control and ALEO groups are shown in Table 3. hsCRP, IL-6, and IL-12 positively correlated with soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1, and/or sE-selectin). Conversely, IL-10 negatively correlated with sICAM-1 in the healthy group. IL-12 positively correlated with IL-6 and -10; sICAM-1 and sE-selectin correlated positively only in the controls. No other statistically significant correlations were found between the markers analyzed (data not shown).

Having 1 or more ALEOs (Table 4) was shown to be associated with the systemic inflammatory burden. Bivariate analysis based on

TABLE 2. The Serum Inflammatory Burden and Soluble Adhesion Molecules in Patients with Endodontic Apical Lesions and Controls

Variable	Controls (n = 28)	ALEO (n = 27)	P Value
IgG (mg/mL, median [IQR])	88.9 (79.0)	82.2 (94.1)	.5
hsCRP (mg/L, median [IQR])	0.78 (3.0)	2.5 (4.2)	<.05
IL-6 (pg/mL, median [IQR])	22.4 (3.7)	23.2 (3.6)	<.05
IL-10 (pg/mL, mean ± SD)	117.1 ± 4.2	117.3 ± 5.5	.5
IL-12p70 (pg/mL, mean ± SD)	542.0 ± 52.0	561.4 ± 53.7	.1
MMP-8 (ng/mL, median [IQR])	3509.0 (2256.0)	4492.0 (4706.0)	<.05
sVCAM-1 median (mg/mL, median [IQR])	686.5 (230.8)	680.10 (29.1)	.8
sICAM-1 median (mg/mL, median [IQR])	1300.0 (900.0)	1400.0 (400.0)	1.0
sE-selectin (mg/mL, mean ± SD)	48.0 ± 19.2	56.4 ± 17.1	<.05

ALEO, apical lesion of endodontic origin; IgG, immunoglobulin G; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL, interleukin; MMP-8, matrix metalloproteinase-8; sE-selectin, soluble E-selectin; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular adhesion molecule-1.

CRP serum levels ≥ 1 mg/L showed an OR = 6.8 (95% confidence interval [CI], 2.0–23.3), and the risk increased 3.3 times for an additional ALEO. In multivariate analysis (Table 4), apical lesions were significantly associated with CRP levels ≥ 1 mg/L, independently of the adjustment model ($P < .05$), ranging between OR = 5.1 (CI = 1.3–20.4) when including potential oral covariates (DMFT and PD) and 12.8 (CI = 2.4–67.1) when adjusting for classic cardiovascular risk factors (age, sex, smoking habit, educational level, hypertension, BMI, dyslipidemia, and HbA1c). The presence of ALEOs was also significantly associated with CRP levels >3 mg/L when controlling for educational level, hypertension, and PD after stepwise adjustment (OR = 4.0; 95% CI, 1.0–15.7; $P = .046$).

Discussion

A consistent association between ALEOs and CVDs is sustained by epidemiologic studies, but a mechanistic link is not evident. This might be especially relevant in young adults because of the lack of accumulation of other risk factors that normally occur in older individuals (9, 10, 20). In the present study, we showed that an ALEO is significantly associated with elevated inflammatory serum markers of cardiovascular risk in young adults, especially with hsCRP.

Bivariate analysis showed significantly higher serum levels of hsCRP and IL-6 in ALEO versus control individuals. We showed for the first time that MMP-8 and sE-selectin concentrations are also elevated. The correlation analysis between serum markers suggested positive associations of CRP, IL-6, and IL-12 with soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1, and/or sE-selectin), especially in ALEO individuals.

The anatomic relation of endodontic ALEOs with the bloodstream can lead to the release of inflammatory mediators, bacterial products (ie, lipopolysaccharide) and/or bacteria, resulting in low-grade systemic inflammation and/or direct vascular damage. In contrast to marginal periodontal infections, no epithelial barrier exists between the necrotic root canal and the highly vascular connective tissue from apical granulomas and cysts. Moreover, extraradicular infection implies

Clinical Research

TABLE 3. The Correlation Matrix between Serum Levels of Interleukin (IL)-6 and the Systemic Inflammatory Burden

Marker	hsCRP		IL-6		IL-10		IL-12		sICAM-1	
	C	ALEO	C	ALEO	C	ALEO	C	ALEO	C	ALEO
IL-12	0.2	-0.2	0.9	0.5	0.4	0.5	1.0	1.0	—	—
sVCAM-1	-0.4	0.4*	0.1	0.01	-0.5	0.2	-0.2	-0.3	-0.2	0.2
sICAM-1	-0.02	0.1	0.4	0.1	0.4	0.1	0.5	-0.04	1.00	1.0
sE-selectin	0.01	-0.2	0.8	0.7	0.1	0.2	0.8	0.9	0.5	0.2

ALEO, apical lesion of endodontic origin; C, controls; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL, interleukin; sE-selectin, soluble E-selectin; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular adhesion molecule-1.

Boldface type indicates $P < .05$.

* $P = .05$.

direct inoculation of endodontic pathogens into the bloodstream (9, 21).

A recent meta-analysis provided evidence, although limited, of higher serum IgG levels in apical periodontitis (9); in contrast, our study failed to identify such a difference. Because the total circulating IgG can be influenced by the extraoral microbiota, its measurement is highly unspecific. On the other hand, significantly higher levels of serum IgG against *Porphyromonas endodontalis* were reported in association with ALEOs, supporting that the presence of this endodontic pathogen in oral biofilms can elicit a humoral adaptive immune response that might contribute to the systemic inflammatory burden and cardiovascular outcome (8). In addition, *Porphyromonas spp* as well as other oral pathogens can contribute to CVD by inducing autoimmune responses through molecular mimicry (22, 23).

Both, sE-selectin and MMP-8 are involved in atherogenesis, and elevated serum levels among apparently healthy men and women have shown predictive potential for future vascular events (11, 12). Elevated levels of both IL-6 and CRP are associated not only with subsequent atherosclerosis but also with the development of type II diabetes, even among individuals with no current evidence of insulin resistance (24).

Emerging reports propose that extrahepatic sources of CRP production may explain the lower and more sustained CRP concentrations that appear to predict cardiovascular risk. Recently, our research group reported that periodontal fibroblasts have low responsiveness to IL-6 (25), whereas enhanced CRP synthesis to IL-6 can be seen in ALEOs via trans-signaling, acting as a potential reservoir of IL-6 and CRP for sustaining a low systemic inflammatory response (26, 27). Although there is no directional association between these

entities, experimentally induced apical periodontitis in a rat model supports the hypothesis that ALEOs can induce systemic inflammation and functional impairment in remote organs (28).

CRP is involved in every step of vascular disease by enhancing inflammation, oxidative stress, and coagulation (29). These effects are mediated by several properties of CRP, including its ability to activate complement and up-regulate vascular adhesion molecules, monocyte recruitment into the arterial wall, proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor alpha and IL-1), superoxide, myeloperoxidase, and MMPs; it also impairs endothelial vasoreactivity and mediates low-density lipoprotein uptake by endothelial macrophages to form foam cells, among other effects (12, 29, 30).

Until now, hsCRP was the only valid biomarker for predicting cardiovascular risk. hsCRP concentrations ≥ 1 mg/L represent moderate risk and >3 mg/L high risk (13, 14). In fact, hsCRP measurement is especially recommended because it improves the reclassification of CVD-free subjects at intermediate risk into those with or without need of intervention, particularly among young adults (13, 31).

In this study, the analysis of cardiovascular risk based on CRP serum level concentrations ≥ 3 mg/L showed a statistically significant association with the presence of at least 1 apical lesion when adjusting for confounders (OR = 4.0). The relationship between ALEOs and CRP ≥ 1 mg/L showed a robust independent association, with ORs varying from 6.8 (bivariate) to 12.8 (multivariate). In addition, and according to the current findings, this risk increased 3.3 times with the presence of a second ALEO.

Most available mechanistic studies seeking an association between apical periodontitis and the systemic inflammatory burden lack adequate control for confounders. Often, a clinically heterogeneous mixture of acute and chronic forms of apical periodontitis is included, and participants are older than the main risk group, resulting in inconclusive overall evidence for hsCRP (9). Few recent studies accounting for these variables reported early endothelial dysfunction and up-regulation of proinflammatory cytokines, including IL-1, IL-2, IL-6, reactive oxygen species, and asymmetric dimethylarginine in serum from young adults with ALEOs compared with healthy volunteers (5, 32). In our study, we included ALEO ≥ 3 mm according to the definition of a medium well-defined apical radiolucency (33).

In the current study, the ALEO and control groups came from the same study population and were similar regarding individual classic cardiovascular risk factors, which were mostly controlled by the study design. This was also confirmed by the PDAY score, which determines and predicts coronary atherosclerotic lesions, especially in young individuals, and does not include CRP (17). Accordingly, volunteers' age ranged between 18 and 40 years to target young adults specifically. Oral potential confounders, such as DMFT and chronic periodontitis, were higher in the apical lesion group because they frequently coexist in association with poorer oral health status. Importantly, moderate to

TABLE 4. The Association between Endodontic Apical Lesions (≥ 1 Lesion) and C-reactive Protein Levels of Cardiovascular Risk

Model	hsCRP ≥ 1 mg/L		hsCRP >3 mg/L	
	OR (95% CI)	P Value	OR (95% CI)	P Value
AL*	6.8 (2.0–23.3)	<.05	2.4 (0.8–7.5)	.1
AL number	3.3 (1.3–8.9)	<.05	1.6 (0.69–3.6)	.2
AL [†]	5.1 (1.3–20.4)	<.05	2.6 (0.7–10.1)	.2
AL [‡]	12.8 (2.4–67.1)	<.05	2.7 (0.8–9.5)	.1
AL [§]	8.5 (2.0–36.9)	<.05	4.0 (1.0–15.7)	<.05

ALEO, ≥ 1 apical lesion of endodontic origin; CI, confidence interval; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; OR, odds ratio.

*Bivariate.

[†]Adjusted by the decayed/missing/filled teeth index and probing depth.

[‡]Adjusted by classic cardiovascular risk factors (age, sex, smoking habit, educational level, hypertension, body mass index, dyslipidemia, and glycated hemoglobin).

[§]Adjusted by educational level, hypertension, and probing depth.

severe chronic periodontitis was excluded to avoid masking the ALEO effects as an independent, nonclassic cardiovascular risk factor. One drawback of our study was the low number of individuals accounting for the eligibility criteria, but it had enough power to detect the differences between the groups. Finally, despite the different approaches undertaken to control for confounders, potential bias cannot be totally ruled out because it represents a core limitation of observational research that still might partially influence the magnitude of the identified association.

Overall, ALEOs were associated with the systemic inflammatory burden and cardiovascular risk determined by hsCRP, supporting a mechanistic link for cardiovascular diseases in young adults.

Acknowledgments

The authors thank Miss Bernarda Parada for her valuable assistance.

Supported by the National Fund for Scientific and Technological Development grant nos. 1060741 and 1120138. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

- Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR, Seltzer S. *Seltzer and Bender's Dental Pulp*, 2nd ed. Hanover Park, IL: Quintessence Publishing; 2012.
- Gutmann JL, Baumgartner JG, Gluskin AH, et al. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periapical health and disease states. *J Endod* 2009;35:1658–74.
- Buonavoglia A, Iatronico F, Pirani C, et al. Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. *Odontology* 2013;101:84–8.
- Hsiao WW, Li KL, Liu Z, et al. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics* 2012;13:345.
- Cotti E, Dessi C, Piras A, et al. Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. *J Endod* 2011;37:1624–9.
- Petersen J, Glassl EM, Nasseri P, et al. The association of chronic apical periodontitis and endodontic therapy with atherosclerosis. *Clin Oral Investig* 2014;18:1813–23.
- Pasqualini D, Bergandi L, Palumbo L, et al. Association among oral health, apical periodontitis, CD14 polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. *J Endod* 2012;38:1570–7.
- Liljestrand JM, Mantyla P, Palu S, et al. Association of endodontic lesions with coronary artery disease. *J Dent Res* 2016;95:1358–65.
- Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2013;39:1205–17.
- Caplan DJ, Pankow JS, Cai J, et al. The relationship between self-reported history of endodontic therapy and coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Am Dent Assoc* 2009;140:1004–12.
- Ridker PM, Silvertown JD. Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis. *J Periodontol* 2008;79(8 Suppl):1544–51.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–43.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499–511.
- Fortmann SP, Ford E, Criqui MH, et al. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the population science discussion group. *Circulation* 2004;110:e554–9.
- Eke PI, Dye BA, Wei L, et al. Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 2015;86:611–22.
- Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2007;78(7 Suppl):1387–99.
- McMahan CA, Gidding SS, Fayad ZA, et al. Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. *Arch Intern Med* 2005;165:883–90.
- McMahan CA, McGill HC, Gidding SS, et al. PDAY risk score predicts advanced coronary artery atherosclerosis in middle-aged persons as well as youth. *Atherosclerosis* 2007;190:370–7.
- Eke PI, Page RC, Wei L, et al. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2012;83:1449–54.
- Khalighinejad N, Aminoshariae MR, Aminoshariae A, et al. Association between systemic diseases and apical periodontitis. *J Endod* 2016;42:1427–34.
- Wang J, Jiang Y, Chen W, et al. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2012;38:954–9.
- Cusick ME, Libbey JE, Fujinami RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42:102–11.
- Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative stress in the local and systemic events of apical periodontitis. *Front Physiol* 2017;8:869.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286:327–34.
- Hernandez-Caldera A, Vernal R, Paredes R, et al. Human periodontal ligament fibroblasts synthesize C-reactive protein and Th-related cytokines in response to interleukin (IL)-6 trans-signalling. *Int Endod J* 2018;51:632–40.
- Garrido M, Dezerrega A, Bordagaray MJ, et al. C-reactive protein expression is up-regulated in apical lesions of endodontic origin in association with interleukin-6. *J Endod* 2015;41:464–9.
- Salazar J, Martinez MS, Chavez-Castillo M, et al. C-reactive protein: an in-depth look into structure, function, and regulation. *Int Sch Res Notices* 2014;2014:653045.
- Zhang J, Huang X, Lu B, et al. Can apical periodontitis affect serum levels of CRP, IL-2, and IL-6 as well as induce pathological changes in remote organs? *Clin Oral Investig* 2016;20:1617–24.
- Devaraj S, Yun JM, Adamson G, et al. C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 2009;84:479–84.
- Singh U, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein stimulates myeloperoxidase release from polymorphonuclear cells and monocytes: implications for acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2009;55:361–4.
- Chow SL, Maisel AS, Anand I, et al. Role of biomarkers for the prevention, assessment, and management of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2017;135:e1054–91.
- Cotti E, Zeida A, Deidda M, et al. Endodontic infection and endothelial dysfunction are associated with different mechanisms in men and women. *J Endod* 2015;41:594–600.
- Venskutonis T, Plotino G, Tocci L, et al. Periapical and endodontic status scale based on periapical bone lesions and endodontic treatment quality evaluation using cone-beam computed tomography. *J Endod* 2015;41:190–6.