
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cercetări privind aspectele imagistice, histologice și de laborator în patologia inflamatorie periapicală

Doctorand **Berar Antonela Marcela**

Conducător științific **Prof. Dr. Radu Septimiu Câmpian**

CLUJ-NAPOCA 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
Considerații generale privind leziunile periapicale	17
2. Epidemiologie	20
2.1. Prevalența leziunilor periapicale	20
2.2. Factori de risc asociați cu leziunile periapicale	21
3. Etiopatogenie	22
3.1. Factori infecțioși locali	22
3.1.1. Microbioza endodontică și periapicală	23
3.1.2. Biofilme bacteriene	25
3.1.3. Factori de patogenitate ai bacteriilor	26
3.2. Factori traumatici	27
3.3. Factori iatrogeni	27
4. Diagnosticul patologiei inflamatorii periapicale	28
4.1. Diagnosticul clinic	28
4.4.1. Manifestări clinice	29
4.4.2. Teste complementare	30
4.2. Diagnosticul radiologic	31
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
1. Obiective	37
2. Metodologie generală	39
2.1. Protocol experimental	39
2.1.1. Distribuția pe loturi	39
2.1.2. Inducerea leziunilor periapicale	39
2.1.3. Inducerea afecțiunilor sistemice	40
2.1.4. Analiza statistică a rezultatelor	40
2.2. Protocol clinic	41
3. Studiul 1. Evaluarea modificărilor hematologice și ale homeostaziei redox în leziunile periapicale – studiu experimental	43
3.1. Introducere	43
3.2. Obiective	44
3.3. Material și metode	44
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	58
4. Studiul 2. Investigarea modificărilor histopatologice și imunologice în leziunile periapicale induse experimental	59
4.1. Introducere	59
4.2. Obiective	59
4.3. Material și metode	60
4.4. Rezultate	61
4.5. Discuții	79
4.6. Concluzii	82

5. Studiul 3. Studiul parametrilor radiologici și identificarea modificărilor patologice de la nivelul leziunilor periapicale pe imagini rezonanță magnetică și micro-CT - studiu experimental	83
5.1. Introducere	83
5.2. Obiective	84
5.3. Material și metode	84
5.4. Rezultate	87
5.5. Discuții	99
5.6. Concluzii	101
6. Studiul 4. Evaluarea radiologică, histopatologică și analiza imunohistochimică a angiogenezei inflamatorii în leziunile periapicale la subiecți umani	103
6.1. Introducere	103
6.2. Obiective	104
6.3. Material și metode	104
6.4. Rezultate	106
6.5. Discuții	112
6.6. Concluzii	113
7. Concluzii generale	115
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	117
REFERINȚE	119

Cuvinte cheie: leziuni periapicale, diagnostic, IRM, micro-CT, histopatologie, angiogeneză, IL-6, CD-34, hematologie, redox, diabet zaharat, osteoporoză.

INTRODUCERE

Teza de față tratează o temă de actualitate din domeniul endodonției și chirurgiei orale, oferind o trecere în revistă a diverselor aspecte legate de patologia inflamatorie periapicală de origine endodontică, precum și o prezentare a rezultatelor obținute în urma studiilor de cercetare în acest domeniu.

Patologia periapicală este reprezentată de un grup de afecțiuni inflamatorii de origine endodontică, cel mai frecvent de cauză bacteriană, care în evoluție produc distrucția țesuturilor parodontiului profund al dinților. Studiile epidemiologice din diferite regiuni geografice arată o prevalență crescută a patologiei inflamatorii periapicale, ceea ce denotă faptul că această patologie constituie o problemă importantă de sănătate orală.

Diagnosticul patologiei periapicale se stabilește în mod curent prin examen clinic, completat cu examenul radiologic, informațiile obținute având un caracter limitat în ceea ce privește atât stadiul clinic, cât și stadiul de afectare histologică al țesuturilor periapicale. La momentul actual, terapia endodontică convențională sau chirurgicală limitează restabilirea optimă a integrității morfologice și

funcționale a dinților afectați, cu toate progresele cunoscute până în prezent. De aceea, elaborarea unui diagnostic precoce și precis al LP este esențială în adoptarea soluției adecvate de tratament.

Partea de cercetare teoretică a tezei - stadiul actual al cunoașterii prezintă o serie de considerații generale asupra leziunilor periapicale (LP), date epidemiologice asupra prevalenței și factorilor de risc, date etiopatogenetice asupra factorilor implicați în dezvoltarea leziunilor, diagnosticul clinic și radiologic în patologia inflamatorie periapicală.

Studiile clinice și experimentale au cercetat modificările apărute în leziunile periapicale la nivel local și sistemic pentru îmbunătățirea calității diagnosticului în patologia inflamatorie periapicală de origine endodontică.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Obiective

Obiectivul principal al acestei teze constă în studierea modificărilor cauzate de LP, atât prin studii experimentale pe model animal, cât și prin studii clinice pe pacienți diagnosticați cu patologie inflamatorie periapicală de origine endodontică.

Obiectivele specifice ale acestei teze sunt:

- Evaluarea parametrilor hematologici și biochimici oxidativi în evoluția patologiei inflamatorii periapicale, pe model animal;
- Analiza histologică și histomorfometrică a modificărilor periapicale și evaluarea implicării mecanismelor imunologice în patogeneza LP;
- Investigarea parametrilor radiologici și depistarea modificărilor periapicale pe imagini de rezonanță magnetică, la intensități ale câmpului magnetic de 7 Tesla și pe imagini micro-computer tomografice (micro-CT);
- Examinarea radiologică, histopatologică și imunohistochimică a LP la pacienți cu patologie periapicală, în vederea optimizării diagnosticului;

Metodologie generală

Cercetările experimentale s-au desfășurat la Biobaza Disciplinei de Fiziologie din cadrul UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, pe șobolani albi, adulți, rasa Wistar împărțiți în 4 loturi: lotul I – martor (n=10 animale/lot); lotul II - animale masculi cu LP induse experimental, la molarul unu (M1) mandibular dreapta (n=30 animale/lot); lotul III - animale masculi cu diabet zaharat tip 2, indus experimental și LP la M1 mandibular dreapta (n=30 animale/lot); lotul IV – animale femele cu osteoporoză postmenopauză și LP, induse la M1 mandibular dreapta, tratate cu acid zoledronic (AZ) (n=30 animale/lot). Momentele examinării au fost la T1 (14 zile), T2 (30 zile) și T3 (60 zile). Prelucrarea statistică s-a efectuat cu programul StatsDirect v.2.7.2. și cu aplicația Excel (Microsoft Office 2007). Au fost calculate elemente de statistică descriptivă, datele fiind prezentate utilizând indicatori de centralitate, localizare și distribuție. Pentru decelarea corelației s-a utilizat coeficientul de corelație Pearson (r) și Spearman (ρ).

Studiul 1. Evaluarea modificărilor hematologice și ale homeostaziei redox în leziunile periapicale – studiu experimental

Obiective

S-au studiat experimental modificările parametrilor hematologici și ai celor biochimici ai balanței oxidanți/antioxidanți (O/AO) la animale clinic sănătoase; animale cu LP induse experimental; animale cu afecțiuni sistemice induse experimental și LP asociate.

Material și metode

Parametrii hematologici evaluați au fost: hematocrit, hematii, hemoglobina, leucocite totale Lt, neutrofile N, eozinofile Eo, limfocite Ly, monocite Mo, plachete sangvine. Indicatorii serici balanței O/AO la nivel seric au fost: malondialdehida (MDA), glutationalul redus seric (GSH).

Rezultate

S-a efectuat analiza de comparație a parametrilor hematologici și biochimici pe momente de timp și loturi de animale și analiza de corelație între indicatorii balanței O/AO și elementele seriei albe. Rezultatele studiului de față arată modificări ale valorilor parametrilor hematologici și de SO cuantificați din sângele periferic, la loturile experimentale, comparativ cu valorile înregistrate la lotul martor. La lotul II, hematocritul, hematii, Lt și N prezintă creșteri semnificative statistic, față de lotul I. Din analiza de corelație s-a observat că creșterea Lt se asociază cu creșterea Ly și Eo la T1, iar creșterea Lt și N se asociază cu scăderea Mo, respectiv a Ly. În ceea ce privește markerii de SO, s-a observat că nivelul seric al valorilor MDA la lotul II crește semnificativ la toate loturile experimentale comparativ cu lotul I în momentele de timp evaluate. La animalele cu DZ și LP, hematocritul și Ly prezintă creșteri semnificative statistic, comparativ cu lotul I, doar la timpul T3. Ly, Lt, Mo și plachetele sangvine cresc semnificativ statistic de la 14 la 60 de zile. Eo prezintă scăderi semnificative statistic, față de lotul martor în toate cele 3 momente analizate. În cazul lotului III, concentrația MDA și GSH a înregistrat creșteri față de lotul martor, precum și creșteri de la 14 la 60 de zile, cu semnificație statistică.

Concluzii

1. Leziunile periapicale induse, la animalele fără afecțiuni sistemice determină, față de lotul martor, creșteri semnificative statistic ale hematocritului, hematiilor, hemoglobinei, leucocitelor totale, neutrofilelor și plachetelor sangvine.
2. Leziunile periapicale la animalele cu diabet zaharat tip 2 determină, față de lotul martor, creșteri semnificative statistic ale hematocritului, limfocitelor și scăderi semnificative ale eozinofilelor.
3. Leziunile periapicale, la animalele cu osteoporoză, produc față de lotul martor, scăderi semnificative ale eozinofilelor și plachetelor sangvine.
4. La lotul de animale cu leziuni periapicale, fără afecțiuni sistemice, se constată, față de lotul martor, creșteri ale stresului oxidativ pe seama creșterii semnificative a malondialdehidei.
5. În cazul animalelor cu diabet zaharat și leziuni periapicale se constată, față de lotul martor, creșteri ale stresului oxidativ, pe seama creșterii semnificative a malondialdehidei și creșterea apărării antioxidante, pe seama creșterii semnificative a glutationalului seric.

6. Lotul de animale cu osteoporoză tratată cu acid zoledronic și leziuni periapicale prezintă, față de lotul martor, modificări serice ale parametrilor stresului oxidativ atribuite creșterii semnificative a malondialdehidei.

7. Stresul oxidativ crește semnificativ la animalele cu leziuni periapicale, cu sau fără afecțiuni sistemice.

Studiul 2. Investigarea histopatologică și imunologică a leziunilor periapicale induse experimental

Obiective

S-au studiat pe model experimental de LP indusă la șobolan, la nivelul M1 mandibular, modificările histopatologice locale, din punct de vedere calitativ și cantitativ histomorfometric și nivelul seric al interleukinei 6 (IL-6).

Material și metode

Cercetările experimentale au fost efectuate pe 4 loturi de animale: un lot martor n=10 animale și 3 loturi grupate în 3 subloturi n=10 animale/sublot, după momentul examinării T1 la 14 zile, T2 la 30 zile și T3 la 60 de zile. Examenul histopatologic s-a efectuat pe secțiuni seriate de hemimandibulă recoltate de la animale și colorate cu Hematoxilină-Eozină (HE). Analiza histopatologică calitativă a LP induse experimental la molarii mandibulari s-a efectuat la microscopul optic Olympus BX 51. Pentru analiza histomorfometrică a LP induse experimental la molarii mandibulari s-au evaluat cantitativ: infiltratul inflamator (I.I.), spațiul ligamentului parodontal (SLP), resorbția radiculară externă (RRE), resorbția osoasă alveolară (ROA) și aria leziunilor (A(H))(mm²), măsurată pe preparatele histologice. Pentru determinările imunologice s-a dozat interleukina 6 (IL-6) (pg/ml) prin metoda cantitativă ELISA.

Rezultate

Analiza histopatologică a arătat că SLP a fost moderat mărit în cazul lotului II, la cele trei momente de timp evaluate, fără a se constata diferențe semnificative statistic. Din analiza de corelație, s-a obținut la 14 zile o corelație foarte bună și de același sens între I.I. – ROA și o corelație bună între I.I. – SLP, SLP – ROA. La 60 de zile există o corelație bună și de același sens între I.I. – RRE, I.I. – ROA, I.I. – A(H), SLP – RRE, SLP – ROA, RRE – ROA, ROA – A(H). În cazul lotului III au fost observate aceleași diferențe între momentele analizate, dar SLP a fost ușor mărit, confirmând faptul că variațiile glicemice din diabet influențează evoluția LP. La 14 zile există o corelație perfectă și de același sens între I.I. – RRE și o corelație bună și de același sens între I.I. – SLP, I.I. – ROA, SLP – RRE, SLP – ROA, RRE – ROA. La 60 de zile s-a stabilit o corelație foarte bună, dar de sens opus între I.I. – SLP și o corelație bună și de același sens între I.I. – RRE, I.I. – A(H), SLP – RRE, RRE – ROA. La lotul IV s-a observat o scădere a lățimii SLP de la T1 la T3, precum și față de lotul II și lotul III la cele 3 momente, dovedind încă o dată efectul protector al AZ. La analiza imaginilor histologice s-a observat o ușoară creștere a I.I. în LP la animalele diabetice, față de animalele cu glicemie normală. Deficitul de estrogeni și tratamentul cu AZ la animalele din lotul IV determină o scădere a I.I. față de lotul II. Se poate observa o reducere a I.I. la T3, în cazul loturilor cu patologie asociată. Reducerea I.I. presupune o cronicizare și o stabilizare a LP în faza inactivă, proces bine evidențiat în cazul lotului IV, datorită tratamentului cu AZ. ROA severă s-a observat la lotul III, fiind ușor mai accentuată decât la lotul II, iar la lotul IV a fost

mai puțin evidențiată. La lotul II se remarcă o creștere ușoară a A(H) de la T1 la T3, iar la lotul III se observă valori mari ale ariei încă de la T1. La fel ca în observațiile anterioare legate de protecția AZ, A(H) a LP este scăzută în cazul lotului IV. În ceea ce privește IL-6, valorile au fost crescute la loturile experimentale, comparativ cu lotul martor, în toate momentele de timp studiate. La lotul II, valorile medii au crescut semnificativ statistic de la 14 la 60 de zile; la 14 zile s-a obținut o corelație bună și de același sens între IL-6 – I.I., IL-6 – ROA, iar la 60 de zile o corelație foarte bună, dar de sens opus între IL-6 – I.I. La lotul III, valorile medii ale IL-6 au crescut semnificativ statistic, față de lotul martor; la 60 de zile există o corelație bună, dar de sens opus între IL-6 – ROA. La lotul IV, la 14 zile s-a obținut o corelație bună, dar de sens opus, între IL-6 – A(H), iar la 60 de zile o corelație foarte bună, dar de sens opus între IL-6 – ROA și o corelație bună, de același sens între IL-6 – ROA.

Concluzii

1. La lotul de animale cu leziuni periapicale se constată modificări histopatologice moderate: infiltrat inflamator moderat, spațiul parodontal moderat mărit și resorbție alveolară.

2. Lotul de animale cu diabet zaharat tip 2 și leziuni periapicale prezintă modificări histopatologice caracteristice, mult mai exprimate comparativ cu celelalte loturi: infiltrat inflamator intens, spațiul ligamentului parodontal intens mărit, resorbție radiculară și osoasă alveolară.

3. La lotul de animale cu leziuni periapicale și osteoporoză postmenopauză, tratată cu acid zoledronic, se constată modificări histopatologice reduse: infiltrat inflamator discret, spațiul ligamentului parodontal ușor mărit, resorbție alveolară minimă și fără resorbție radiculară.

4. Aria histologică a leziunilor periapicale a prezentat valorile cele mai crescute la 30 de zile la lotul cu diabet zaharat și valorile cele mai scăzute la 60 de zile la lotul de animale cu ovariectomie postmenopauză.

5. Valorile serice ale IL-6 au crescut semnificativ statistic la loturile de animale cu leziuni periapicale, comparativ cu lotul martor. Valorile maxime ale IL-6 s-au înregistrat la animalele cu diabet zaharat tip 2.

6. Corelații foarte bune pozitive s-au evidențiat între infiltratul inflamator și resorbția osoasă alveolară la 14 zile la lotul de animale cu leziuni periapicale și între infiltratul inflamator și resorbția radiculară externă la 14 și 30 de zile la lotul cu diabet zaharat. Resorbția alveolară s-a corelat foarte bine negativ cu valorile serice ale IL-6 la 60 de zile la lotul de animale cu leziuni periapicale și osteoporoză.

Studiul 3. Studiul parametrilor radiologici și identificarea modificărilor patologice de la nivelul leziunilor periapicale pe imagini de rezonanță magnetică și micro-CT - studiu experimental

Obiective

S-au evaluat modificările radiologice a LP induse experimental la nivelul molarilor mandibulari, vizualizate pe radiografiile digitale și modificările imagistice detectate pe imaginile de rezonanță magnetică și micro-CT.

Material și metode

Pentru studiul radiologic al LP induse experimental s-au efectuat radiografiile digitale ale hemimandibulelor dreaptă și stângă, recoltate după eutanasierea animalelor. Imaginile radiologice au fost analizate cu ajutorul software-ului de vizualizare a imaginilor EasyDent Viewer și s-au evaluat următorii parametri radiologici: gradul de vizibilitate a structurilor periapicale (ligament parodontal - LPO, lamina dura - LD, os alveolar - OA); gradul de severitate al leziunilor periapicale, utilizând Indicele Periapical modificat (PAI); aria resorbției osoase alveolare A(Rx), măsurată în mm², cu ajutorul software-ului de analiză al imaginii Digimizer 4.3. Studiul imagistic prin rezonanță magnetică al LP induse experimental s-a realizat cu aparatul Bruker Spec Pharma Scan, cu intensitatea câmpului magnetic de 7 Tesla, pe animale anesteziate cu un amestec de ketamină și xilazină hidroclorică. Imaginile pre- și postinjectare substanță de contrast pe bază de gadolinu au fost obținute utilizând secvența de achiziție RARE ponderat - T₁, în plan sagital, coronal și axial, iar durata scanării a fost de 10 minute. Pe parcursul scanării animalele au fost urmărite cu ajutorul aparatului de monitorizare pentru animale mici, astfel încât achiziționarea imaginilor să se realizeze în intervalul dintre 2 respirații cu scopul de a reduce artefactele de mișcare. Imaginile au fost apoi analizate de către un radiolog cu competență în rezonanță magnetică și un chirurg dento-alveolar, cu ajutorul soft-ului de vizualizare al imaginilor RadiAnt Dicom Viewer 1.9. Studiul imagistic prin micro-CT al LP induse experimental s-a realizat cu aparatul MicroCT Scanner SkyScan 1072®. Imaginile s-au vizualizat cu Data Viewer software versiunea 1.5, iar după scanare cu ajutorul CT vox software versiunea 2.7 s-au obținut reconstrucțiile tridimensionale.

Rezultate

Analiza statistică a parametrilor radiologici, pe loturi, în momentele studiate a evidențiat, la lotul de animale cu LP, că radiotransparența LPO este mai accentuată la 30 și 60 de zile în egală măsură, iar radioopacitatea LD este mult diminuată la 60 de zile. La lotul cu LP și DZ s-a observat radiotransparență mai accentuată a LPO încă de la 14 zile, radioopacitate a LD diminuată încă de la 14 zile, iar radioopacitatea OA a fost constantă în cele 3 momente evaluate, similar cu leziunile din lotul II. La lotul cu LP, ovariectomie și tratament cu AZ, radiotransparența LPO s-a diminuat constant în cele 3 momente de timp, iar radioopacitatea LD s-a menținut constantă. Analiza statistică dintre loturile de animale la momente diferite arată că vizibilitatea LPO progresa în manieră similară cu cea a LD, spre deosebire de vizibilitatea OA, care prezintă diferențe statistice semnificative doar la T3, sugerând faptul că modificările de la nivelul OA sunt mai mari doar la momentul T3. În ceea ce privește gradul de severitate al leziunilor evaluate cu ajutorul PAI, s-au observat de asemenea diferențe între grupele de animale. Severitatea leziunilor a fost mai mare la animalele cu LP și DZ, în toate cele 3 momente de timp, comparativ cu gradul de severitate al LP la animalele din celelalte loturi. Reacția de resorbție osoasă de la nivelul regiunii periapicale la primii molari mandibulari dreapta s-a evidențiat radiologic la toate loturile cu LP, în momentele de timp analizate. Aria radiologică a leziunilor la lotul cu DZ și LP este chiar de 2 ori mai mare decât la lotul cu LP, la momentul T1. S-a observat o creștere progresivă a ariei de la 14 la 60 de zile la lotul II, ceea ce nu se poate constata în cazul animalelor cu DZ și LP, unde s-a remarcat o scădere ușoară a ariei de la 14 la 60 de zile. În cazul lotului cu LP și ovariectomie s-au

obținut valori reduse ale mediei ariilor măsurate comparativ cu celelalte 2 loturi, datorată efectului protector al AZ administrat pe întreaga perioadă experimentală.

Concluzii

1. Examinarea radiologică permite aprecierea gradului de afectare al structurilor periapicale și evaluarea mărimii leziunilor în stadiile avansate de liză osoasă. Aria radiologică a leziunilor prezintă cele mai mari valori la lotul de animale cu diabet zaharat la 14 zile.

2. Examinarea IRM apreciază țesuturile moi și evoluția leziunilor, completând aspectele radiologice. Rezoluția imaginilor obținută prin IRM este net superioară imaginilor radiologice.

3. Examinarea micro-CT permite o evaluare calitativă detaliată a dinților și leziunilor periapicale, demonstrând o mare acuratețe diagnostică.

4. Datele experimentale testate pe model animal au relevanță clinică, recomandând scala de apreciere a gradului de afectare a structurilor osoase și moi, în individualizarea diagnosticului și direcționarea spre o terapie adecvată.

Studiul 4. Evaluarea radiologică, histopatologică și analiza imunohistochimică a angiogenezei inflamatorii în leziunile periapicale pe subiecți umani

Obiective

S-a urmărit investigarea angiogenezei în LP inflamatorii de origine endodontică și evaluarea asocierii dintre gradul de inflamație periapicală stabilit histologic, gradul de severitate al indicelui periapical detectat radiologic și densitatea capilară a leziunilor.

Material și metode

Lotul de pacienți incluși în studiu a fost constituit din 60 de pacienți diagnosticați cu leziuni periapicale, în serviciul Clinicii de Protetică Dentară, UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca și tratate chirurgical într-un cabinet privat de medicină dentară în perioada februarie - iulie 2015. S-au înregistrat datele legate de pacienți privind vârsta, sexul, istoricul medical și dentar, tipul și localizarea dinților afectați, statusul endodontic, semnele și simptomele clinice, răspunsul la testele diagnostice. Pentru stabilirea diagnosticului provizoriu al statusului pulpar și periapical s-a efectuat examenul clinic exooral/endooral, testele de vitalitate pulpară și examenul radiologic după criteriile standard. Statusul periapical al dinților afectați a fost evaluat de către 2 observatori, care au determinat pe radiografiile digitale mărimea ariei (mm²) și severitatea leziunilor utilizând PAI. Examenul histopatologic s-a efectuat la microscopul optic Leica DM750, pe secțiuni de 3-4 μm ale țesuturilor patologice periapicale, procesate și colorate cu HE. LP au fost împărțite în 3 grade de inflamație: I, II și III și clasificate pe baza vechimii țesutului de granulație în leziuni recente, de vârstă medie și vechi. Examenul imunohistochimic s-a realizat prin imunomarcarea cu anticorpul monoclonal CD34 și s-a determinat densitatea vaselor capilare din structura LP, stabilind indicele angiogenic. Analiza statistică a datelor s-a efectuat în programul SPSS versiunea 19.

Rezultate

Analiza lotului de pacienți a arătat că din totalul de 60 pacienți investigați, 26 (43,3%) au fost femei și 34 (56,7%) bărbați, cu vârsta medie 42,33 ani ± 12,75. LP sunt în relație cu rădăcinile următorilor dinți: 6 (10%) incisivi centrali, 20 (33,3%)

incisivi laterali, 8 (13%) canini, 17 (28,33%) premolari și 9 (15%) molari. 25 LP (41,66%) au fost localizate la mandibulă și 35 (58,33%) la maxilar. 24 dinți (40%) au avut obturații endodontice anterior efectuate și 36 (60%) dinți nu au avut obturații radiculare. Analiza radiologică a relevat faptul că cele mai multe LP au avut un grad moderat de inflamație și densitate mică a vaselor capilare. Aria radiologică a leziunilor s-a asociat cu densitatea vaselor capilare, astfel că LP cu mărimea mare a ariei radiologice au avut densitatea capilară mică, iar LP cu mărimea mică au avut densitatea medie. Densitatea capilarelor prezente în LP nu a influențat semnificativ gradul de severitate al LP, evidențiat cu indicii PAI. Prin analiza histopatologică s-au evidențiat 3 tipuri de LP cu grade diferite de inflamație. În evaluarea densității capilare din țesuturile periapicale patologice s-a observat că numărul capilarelor de neoformație s-a redus pe măsura vechimii leziunii. Indicele angiogenic al LP analizate nu s-a asociat cu tipul histologic și nici cu intensitatea I.I., dar s-a asociat mai bine cu gradul de maturitate al țesutului de granulație și mărimea radiologică a leziunilor.

Concluzii

1. Evaluarea radiologică a arătat o arie a leziunilor periapicale și scoruri ale indexului periapical mai mari în cazul infiltratului inflamator de intensitate mică asociat cu o densitate capilară redusă.
2. Evaluarea histopatologică nu evidențiază diferențe între intensitatea procesului inflamator și tipul histopatologic de leziuni periapicale.
3. Analiza imunohistochimică a evidențiat capilarele de neoformație și celulele dendritice interstițiale prezente în leziunile periapicale.
4. Granulomul periapical, granulomul periapical cu potențial chistic și chistul radicular reprezintă 3 stadii diferite în evoluția procesului inflamator cronic periapical asociat cu proliferarea vaselor de sânge.
5. Densitatea capilarelor de neoformație nu influențează tipul histopatologic al leziunii, gradul de inflamație sau severitatea scorului stabilit radiologic. Mărimea leziunii periapicale este asociată cu densitatea capilară.

Concluzii generale

1. Leziunile periapicale la animalele sănătoase determină creșteri semnificative ale hematocritului, hemoglobinei, hematiilor și ale stresului oxidativ.
2. Leziunile periapicale induse la animalele cu diabet zaharat tip 2 determină creșteri semnificative ale hematocritului, limfocitelor, malondialdehidei și scăderi progresive ale eozinofilelor.
3. Leziunile periapicale induse la animalele cu osteoporoză postmenopauză determină creșteri semnificative ale stresului oxidativ și scăderi ale eozinofilelor, plachetelor sangvine.
4. La animalele cu leziuni periapicale se evidențiază modificări histopatologice moderate și creșteri semnificative ale IL-6.
5. La animalele cu diabet zaharat tip 2 se constată cele mai exprimate modificări histopatologice și histomorfometrice, precum și creșteri semnificative ale IL-6.
6. La animalele cu osteoporoză se constată modificări histopatologice reduse și creșteri semnificative ale IL-6. Administrarea acidului zoledronic induce un grad mai redus de severitate și extensie locală.

7. Aria histologică a leziunilor prezintă valori cele mai crescute la 30 de zile la lotul cu diabet zaharat și cele mai scăzute la 60 de zile la lotul de animale cu osteoporoză postmenopauză.

8. Examinarea radiologică evidențiază stadializarea lizei osoase și cuantificarea parametrilor radiologici caracteristici. Aria radiologică a leziunilor prezintă cele mai mari valori la lotul de animale cu diabet zaharat la 14 zile.

9. Examinarea imagistică prin rezonanță magnetică permite identificarea leziunilor periapicale încă din stadiile incipiente, furnizând o analiză detaliată a țesuturilor moi și stadializarea pe baza gradului de afectare. Țesuturile mineralizate dinții și osul alveolar sunt detectate cu precizie pe imaginile micro-CT de înaltă rezoluție.

10. Angiogeneza capilară este asociată cu mărirea ariei radiologice a leziunilor și cu evoluția procesului inflamator periapical, în special cu vechimea țesutului de granulație.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea acestei teze constă în abordarea complexă a patologiei inflamatorii periapicale de origine endodontică, care vizează aprofundarea evaluării modificărilor periapicale; un studiu integrat, atât calitativ, cât și cantitativ, asupra leziunilor inflamatorii periapicale care coroborează elementele obținute din analiza parametrilor hematologici, biochimici ai balanței oxidanți/antioxidanți, imunologici, histomorfometrici și radiologici la animale fără și cu afecțiuni sistemice de tipul diabetului zaharat tip 2 și osteoporozei postmenopauză. Studiul clinic a demonstrat asocieri între mărirea granulomului periapical, granulomului periapical cu potențial chistic și chistului radicular și proliferarea vaselor de neoformație în evoluția procesului inflamator la pacienți.

Elementele de originalitate sunt:

- Teza reprezintă un studiu complex clinic și experimental privind modificările produse în leziunile periapicale;
- Evidențierea modificărilor hematologice, ale homeostaziei redox și imunologice pe model experimental;
- Cercetare complexă bazată pe metode de investigație în premieră care își pot găsi aplicabilitatea clinică.

Contribuțiile inovative ale tezei constau în:

- Evaluarea radiologică pe baza analizei ligamentului parodontal, laminei dura, osului alveolar, indicelui de severitate, ariei radiologice, care permite aprecierea stadiilor avansate ale leziunilor periapicale;
- Identificarea și vizualizarea modificărilor periapicale pe imagini de rezonanță magnetică și micro-CT, investigațiile imagistice permit stadializarea leziunilor, fiind net superioare evaluării radiologice.
- Scalele de evaluare, stabilite experimental pe baza gradului de afectare al structurilor osoase și moi permit individualizarea diagnosticului și direcționarea adecvată a tratamentului la pacienți.

PhD THESIS SUMMARY

Researches on imaging, histological and laboratory findings in periapical inflammatory pathology

PhD Student **Antonela Marcela Berar**

PhD Advisor **Prof. Dr. Radu Septimiu Câmpian**

CLUJ-NAPOCA 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. General considerations on periapical lesions	17
2. Epidemiology	20
2.1. The prevalence of periapical lesions	20
2.2. Risk factors associated with periapical lesions	21
3. Etiopathogeny	22
3.1. Local infectious agents	22
3.1.1. Endodontic and periapical microbiosis	23
3.1.2. Bacterial biofilms	25
3.1.3. Bacterial virulence agents	26
3.2. Traumatic agents	27
3.3. Iatrogenic agents	27
4. Diagnosis of periapical inflammatory pathology	28
4.1. Clinical diagnosis	28
4.4.1. Clinical manifestations	29
4.4.2. Complementary tests	30
4.2. Radiological diagnosis	31
PERSONAL CONTRIBUTION	35
1. Objectives	37
2. General methodology	39
2.1. Experimental protocol	39
2.1.1. Group distribution	39
2.1.2. Induction of periapical lesions	39
2.1.3. Induction of systemic diseases	40
2.1.4. Statistical analysis of the results	40
2.2. Clinical protocol	41
3. Study 1. Evaluation of redox homeostasis and hematological changes in periapical lesions – an experimental study	43
3.1. Introduction	43
3.2. Objectives	44
3.3. Material and methods	44
3.4. Results	46
3.5. Discussions	56
3.6. Conclusions	58
4. Study 2. Histopathological and immunological investigation in experimentally induced periapical lesions	59
4.1. Introduction	59
4.2. Objectives	59
4.3. Material and methods	60
4.4. Results	61
4.5. Discussions	79
4.6. Conclusions	82

5. Study 3. Study of radiological parameters and identification of pathological changes in periapical lesions on magnetic resonance and micro-CT images – an experimental study	83
5.1. Introduction	83
5.2. Objectives	84
5.3. Material and methods	84
5.4. Results	87
5.5. Discussions	99
5.6. Conclusions	101
6. Study 4. Radiological, histopathological evaluation and immunohistochemical analysis of inflammatory angiogenesis in periapical lesions – a clinical study	103
6.1. Introduction	103
6.2. Objectives	104
6.3. Material and methods	104
6.4. Results	106
6.5. Discussions	112
6.6. Conclusions	113
7. General conclusions	115
8. Originality and innovative contributions of the thesis	117
REFERENCES	119

Keywords: periapical lesions, diagnosis, MRI, micro-CT, histopathology, angiogenesis, IL-6, CD-34, hematology, redox, diabetes mellitus, osteoporosis.

INTRODUCTION

This thesis covers topical issues from the endodontics and oral surgery field, and provides an overview over the various aspects of periapical inflammatory pathology of endodontic origin, and also an overview of the results obtained during research studies carried out in this field.

Periapical pathology is represented by a group of endodontic inflammatory diseases, most frequently of bacterial origin, that can progress and cause damage to the deep periodontal tissues of the teeth. Epidemiological studies from different geographical areas show an increased prevalence of periapical inflammatory pathology, indicating that this pathology is a major oral health concern.

The diagnosis of periapical pathology is currently established by combined clinical and radiological examination, but the information acquired through these examinations is limited with respect to both the clinical staging as well as the histological staging of periapical lesions. Despite all known progress in the field of conventional or surgical endodontic therapy the optimal restoration of functional and morphological integrity of the affected teeth is limiting. Therefore, an early

and accurate diagnosis in periapical lesions is essential to adopt appropriate treatment solution.

The theoretical section of this thesis - current state of knowledge presents general considerations on periapical lesions (PL), epidemiological data on the prevalence and risk factors, etiopathogenic data on the factors involved in the development of these lesions and clinical and radiological diagnosis in periapical inflammatory pathology.

The clinical and experimental studies aim for finding the local and systemic changes in presence of periapical lesions to improve the quality of diagnosis in periapical inflammatory pathology.

PERSONAL CONTRIBUTION

Objectives

The main objective of this thesis is to study the changes caused by periapical lesions, both through experimental studies in an animal model and in patients diagnosed with periapical inflammatory pathology of endodontic origin.

The specific objectives of this thesis are:

- Evaluation of haematological and oxidative biochemical parameters in the evolution of periapical inflammatory pathology on animal model;
- Histological and histomorphometric analysis of periapical changes and the evaluation of immunological mechanisms involved in PL pathogenesis;
- Investigation of radiological parameters and screening of periapical changes on magnetic resonance images at a magnetic field intensity of 7 Tesla and also on micro-computer tomography (micro-CT) images;
- Radiological, histopathological and immunohistochemical examination of PL in patients with periapical pathology in order to improve the diagnosis.

General methodology

Experimental researches were conducted within the Biobase of Department of Physiology from the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" in Cluj-Napoca. The experiments were performed on white adult Wistar rats divided in 4 animal groups: **group I** – control (n=10 animals/group); **group II** - males with experimentally induced PL, in right mandible molar one (M1) (n=30 animals/group); **group III** - males with experimentally induced diabetes mellitus type 2 and PL in right mandible M1 (n=30 animals/group); **group IV** – females with postmenopausal osteoporosis and LP induced in right mandible M1 treated with zoledronic acid (ZA) (n=30 animals/group). The examination periods were T1 (14 days), T2 (30 days) and T3 (60 days). Statistical data processing was performed with the program Stats Direct v.2.7.2. and Excel (Microsoft Office 2007). Elements of descriptive statistics have been calculated and the data have been presented by using indicators of centrality, location and distribution. The Pearson(r) and Spearman (ρ) correlation coefficients were used to detect the correlations.

Study 1 – Evaluation of redox homeostasis and hematological changes in periapical lesions – an experimental study

Objectives

Experimental studies on changes in hematological parameters and biochemical parameters of the oxidants/antioxidants balance (O/AO) were initiated in clinically healthy animals; animals with experimentally induced PL; animals with experimentally induced systemic diseases and experimentally induced PL.

Material and method

The haematological parameters evaluated were the following: hematocrit, red blood cells, hemoglobin, total leukocytes Lt, neutrophils N, eosinophils Eo, lymphocytes Ly, monocytes Mo, platelets. The parameters of serum O/AO balance were: Malondialdehyde (MDA), Glutathione (GSH).

Results

The comparative analysis were conducted on haematological and biochemical parameters on different time intervals and animal groups and a correlation between serum O/AO balance parameters and the elements of white blood cells series was also made. The results have shown changes of the haematological parameters and oxidative stress (OS) from the peripheral blood in experimental groups when compared with values recorded in group I. In group II, hematocrit, red blood cells, Lt and N display statistically significant increases compared to group I. Based on these correlations, we observed that an increase in Lt is associated with high values of Ly and Eo at T1 and increase in Lt and N is correlated with the decrease of Mo and Ly. In terms of OS markers, it has been noticed that the serum level of MDA values in group II significantly increases in all groups when compared to group I. In animals with DZ and PL, hematocrit and Ly had statistically significant increased values only at T3 when compared to group I. Ly, Lt, Mo and platelets achieved an increase from 14 to 60 days. Eo displayed statistically significant decreased values in all analysed moments of time when compared to control group. In group III, MDA and GSH concentrations were both elevated when compared to control group and statistical significance increased values were observed as well as from day 14 to day 60.

Conclusions

1. Induced periapical lesions in animals without systemic diseases is causing a statistically significant increases in hematocrit, red blood cells, haemoglobin, total leukocytes, neutrophils and platelets compared to control group.

2. The periapical lesions in animals with type 2 diabetes mellitus induced statistically significant raise of hematocrit and lymphocytes values and lower values of eosinophils compared to control group,

3. The periapical lesions in animals with osteoporosis exhibited, when compared to control group, statistically significant reduced values of eosinophils and platelets.

4. In animal group with periapical lesions but without systemic disease elevated levels of oxidative stress has been noticed as a result of the significant

increment of malondialdehyde.

5. When compared to control group, the animals with diabetes mellitus and periapical lesions, had increase in oxidative stress due to high levels of malondialdehyde and increments in antioxidant defence as a result of significant raise in glutathione levels.

6. Animal group with periapical lesions and osteoporosis treated with zoledronic acid, displayed, increase oxidative stress parameters in the serum response to significantly high levels of malondialdehyde, when compared to control group,

7. The oxidative stress is significantly higher in animals with periapical lesions with or without systemic diseases.

Study 2 – Histopathological and immunological investigation in experimentally induced periapical lesions

Objectives

Local qualitatively and quantitatively histopathological changes and the serum level of interleukin 6 (IL-6) were evaluated in experimental studies of induced PL in rats, at mandibular M1.

Material and methods

Experimental studies were conducted on 4 animal groups: control group (n=10 animals) and 3 groups with PL; each group was further divided in 3 subgroups (n=10 animals/subgroup), based on examination time as follows: T1 at 14 days, T2 at 30 days and T3 at 60 days. The histopathologic examination was conducted on serial sections of hemimandible that were collected from the animals after euthanasia. The qualitative histopathological analysis of experimentally induced PL in mandibular molars was performed with Olympus BX 51 optic microscopy and a semiautomatic image analysis program Olympus Cell B was used for image processing. For histomorphometric investigation of experimentally induced PL in mandibular molars, the following quantitatively parameters were recorded: inflammatory infiltrate (I.I.), periodontal ligament space (PLS), external radicular resorption (ERR), alveolar bone resorption (ABR) and lesion area (A(H))(mm²). For immunological analysis interleukin 6 (IL-6) (pg/ml) was dosed through ELISA quantitative method.

Results

In group II with PL without any associated pathology, the histopathological investigation revealed a slight increased PLS in all time frames (T1, T2 and T3) with no statistically significant differences. At 14 days (T1), a very good correlation between I.I.– ABR and a good correlation between I.I. – PLS, PLS – ABR was observed. At 60 days a good correlation was revealed between I.I. – ERR, I.I. – ABR, I.I. – A(H), PLS – ERR, PLS – ABR, ERR – ABR, ABR – A(H). In group III, the same differences were observed between each time frames analyzed and a minor increase in PLS was noticed explaining the influence of diabetes on the evolution of PL. At 14 days there was an excellent correlation between I.I. – ERR and a good correlation between I.I. – PLS, I.I. – ABR, PLS – ERR, PLS – ABR, ERR – ABR. At 60 days a very good but opposite correlation was observed between I.I. – PLS and a good non-contradictory correlation

between I.I. – ERR, I.I. – A(H), PLS – ERR, ERR – ABR. In group IV a decrease of PLS width from T1 to T3 was noticed when compared to group II and group III for all rime frames, suggesting once again the protective effect of AZ and most probably, the chronicization of inflammatory infiltrate. By analysing the histological images, a slight increase of I.I. in PL for diabetic animals compared with healthy animals was observed. The estrogenic deficiency and AZ treatment is responsible for a decrease in I.I. compared to group II. In groups with associated pathologies, lower levels of I.I. at T3, were observed. The decrease in I.I. suggests chronicization and stabilization LP in the inactive phase; these changes were more relevant in the case of group IV treated with AZ. Most pronounced ABR was detected in group III, that was slightly higher when compared to group II and less obvious than in group IV. In group II a minor increase of A(H) from T1 to T3 was noticed, and in group III high values of the area were observed starting at T1. As previously noticed the protection conferred by AZ administration could be explained by the low A(H) of LP in group IV. Regarding IL-6 values, these were increased in experimental groups when compared with control group at all time frames. In group II, the median values significantly increased from day 14 to day 60; at 14 days a good non-contradictory correlation between IL-6 – I.I., IL-6 – ABR, and at 60 days a very good opposite correlation between IL-6 – I.I. were observed. In group III, the median values of IL-6 increased when compared with control group; at 60 days there was a good opposite correlation between IL-6 – ABR. In group IV, at 14 days a good opposite correlation was obtained between IL-6 – A(H), and at 60 days a very good opposite correlation between IL-6 – ABR and a good non-contradictory correlation between IL-6 – ABR was noticed.

Conclusions

1. In animal groups with periapical lesions moderate histopathological changes were noticed consisting in moderate inflammatory infiltrate, slightly increased periodontal space and alveolar resorption.
2. The animal group with type 2 diabetes mellitus and periapical lesions had more enhanced characteristic histopathological changes when compared with other groups: intensive inflammatory infiltrate, highly increased periodontal ligament space, alveolar bone and radicular resorption.
3. In animals with periapical lesions and postmenopausal osteoporosis treated with zoledronic acid, reduced histopathological changes were observed: reduced inflammatory infiltrate, slightly increased periodontal space, minimal alveolar resorption and no radicular resorption.
4. The highest scores of histological area of periapical lesions was recorded in diabetes mellitus group at 30 days and the lowest scores at 60 days, in postmenopausal animals with ovariectomy.
5. IL-6 serum levels significantly increased in periapical lesion groups compared to control group. The highest values of IL-6 were recorded in animals with type 2 diabetes mellitus
6. Positive correlations between inflammatory infiltrate and alveolar bone resorption were recorded at day 14 in group with periapical lesions and also good correlations between inflammatory infiltrate and external radicular resorption at 14 and 30 days was noticed in group with diabetes mellitus. The alveolar resorption had a negative correlation with serum levels of IL-6 at day 60 in animal group with periapical lesions and osteoporosis

Study 3 - Study on radiological parameters and identification of pathological changes in periapical lesions on magnetic resonance and micro-CT images – an experimental study

Objectives

The radiological changes of experimentally induced PL in mandibular molars, detected on digital radiographies and changes identified on magnetic resonance and micro-CT images were assessed.

Material and methods

The radiological study on experimentally induced PL consisted in the assessment of digital radiographies of left and right hemimandibles collected after euthanasia. The radiological images were investigated using EasyDent Viewer image visualisation software. The following radiological parameters were evaluated: visibility degree of periapical structures (periodontal ligament - POL, lamina dura - LD, alveolar bone - AO); the severity degree of PL assessed through modified Periapical Index (PAI); alveolar bone resorption; area of PL - A (Rx), measured in mm², by using the DigiMizer 4.3 image analysis software. The magnetic resonance imagistic study on experimentally induced PL was conducted in animals that were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine hydrochloride and scanned with Bruker Spec Pharma Scan machine, with a magnetic field intensity of 7 Tesla, Pre and post-injection contrast agent gadolinium images were obtained using weighted RARE acquisition sequence - T₁, in sagittal, coronal and axial plans and the scan duration was 10 minutes. During scanning, the animals were under close surveillance by using a small animal monitoring device, which allowed images acquisition in the range of 2 breathing intervals in order to reduce motion artefacts. The images were analysed by a radiologist specialised in magnetic resonance and a dentoalveolar surgeon by using image visualisation software RadiAntDicom Viewer 1.9. The imagistic study using micro-CT on experimentally induced PL was conducted with MicroCT Scanner SkyScan 1072[®] device. The images were viewed with Data Viewer software version 1.5, and after scanning with CT vox software version 2.7 the necessary tridimensional reconstructions were obtained.

Results

The statistical analysis of radiological parameters, at different time frames, highlighted equally pronounced POL radiotransparency at 30 and 60 days in group with PL while more diminished LD radiopacity was encountered at 60 days. In the group with PL and DZ more pronounced radiotransparency of POL was enhanced from 14 days, while LD radiopacity diminished from 14 days, but constant AB radiopacity was observed throughout all time frames that were similar with that notice in group II. The statistical analysis between animal groups at different time frames suggests the similar progression of POL and LD visibility in contrast to AB visibility, which showed statistically significant differences at T3, emphasizing that major changes in AB visibility occur only at T3. As regarding the severity degree of the lesions assessed through PAI score several differences between animal groups were observed. The lesions severity noticed in animals with PL and DZ, in all time frames was in contrast with the degree PL severity

observed in other animal groups. The bone resorption reaction from periapical area of the right mandibular first molars was radiologically assessed in all groups with PL at different time frames. The radiological lesion's area in the group with DZ and PL was twice higher than in group with PL, at T1. A progressive increase of PL area was observed from day 14 till 60 days in group II when compared with group with DZ and PL where a slight decrease occurred from day 14 till day 60. In group with LP and ovariectomy the lowest values of median areas were obtained compared to those from other two groups, probably due to the protective effect of AZ administration during the entire experimental period.

Conclusions

1. Radiological examination allows the assessment on the degree of periapical structures impairment and the lesions size evaluation in advanced stages of bone lysis. In animals with diabetes mellitus at day, 14 the radiological area of the lesions had the highest values.
2. IRM examination estimates soft tissues and lesion evolution and completing radiological findings. The resolution of the images obtained through IRM is superior to radiological images.
3. Micro-CT examination allows a detailed qualitative evaluation of the teeth and periapical lesions, demonstrating a high diagnostic accuracy.
4. Experimental data from animal model have a clinical relevance, by providing a scale to grade the degree of bone and soft structures damage, that would allow a proper diagnostic and individualized therapeutic approach.

Study 4 - Radiological, histopathological evaluation and immunohistochemical analysis of inflammatory angiogenesis in periapical lesions – a clinical study

Objectives

The investigation of angiogenesis in inflammatory PL of endodontic origin and the evaluation of correlation between the histological degree of periapical inflammation, the radiological degree of severity of the periapical index and the capillary density of lesions were conducted.

Material and methods

The group of patients included in the study consisted of 60 patients diagnosed with PL in the Prosthodontics Clinic of "Iuliu Hațieganu" UMPH Cluj-Napoca and surgically treated in a private clinical practice during February - July 2015. The age, gender, medical and dental record, type and location of affected teeth, endodontic status, clinical signs and symptoms, diagnostic test response of the patients were recorded. Provisional diagnosis of pulp and periapical status was established by extraoral/intraoral clinical examination, pulp vitality tests and radiological examination according to standard criteria. The periapical status of the affected teeth was evaluated by two observers, who determined the size of the area (mm²) and the severity of the lesions on digital radiographs using PAI. The histopathological examination was conducted with a Leica DM750 optical microscope on 3-4 µm pathological periapical tissues stained with HE. The histopathology examination of 3-4 µm periapical pathological tissues stained with HE was conducted

with Leica DM750 optic microscope. PL were classified into three inflammation degrees and grouped based of granulation tissues age in following types: de novo lesions, medium and old age lesions. Immunohistochemical examination was performed by CD34 monoclonal body immunolabeling and the density of capillary from LP structure was assessed to determine the angiogenic index. The statistical analysis of the data was performed with SPSS version19.

Results

The analysis of the patient group revealed that of all 60 investigated patients, 26 (43.3%) were female and 34 (56.7%) were male, with a mean age of 42.33 years \pm 12.75. PL were correlated with the roots of the following teeth: 6 (10%) central incisors, 20 (33.3%) lateral incisors, 8 (13%) canines, 17 (28.33%) premolars and 9 (15%) molars. 25 PL (41.66%) were located in the mandible and 35 (58.33%) in the maxilla. 24 teeth (40%) had previous endodontic fillings and 36 (60%) had no root fillings. The radiological analysis reveled that the majority of PL had a moderate degree of inflammation and reduced capillary density. The radiological area of the lesions was correlated with capillary density; thus, PL with largest radiological area size had low capillary density, and PL with small area size had medium density. Capillary density in PL had no significant impact on the PL severity degree, as shown by the PAI index. The histopathological examination evidenced three types of PL with different inflammation degrees. When assessing capillary density in pathological periapical tissues, it was seen that the number of newly formed capillaries decreased with the age of the lesion. The angiogenic index of the analyzed PL did not correlate with the histological type or with I.I. intensity, but correlated with the granulation tissue maturity degree and the radiological size of the lesions. The periapical inflammation was correlated with a local immune response as suggested by the presence of lymphocytes from I.I. and interstitial dendritic cells detected by CD34 immunolabeling.

Conclusions

1. The radiological evaluation demonstrated that largest area of periapical lesions and high periapical index scores were present in the cases with low intensity inflammatory infiltrate that were associated with reduced density of capillaries.
2. The histopathological evaluation showed no differences between inflammatory process intensity and histopathological type of periapical lesions.
3. The immunohistochemical investigation allowed the detection of neoformation capillaries and interstitial dendritic cells in periapical lesions.
4. Periapical granuloma, potentially cystic periapical granuloma and radicular cyst are three different stages in the evolution of chronic inflammatory process associated with blood vessel proliferation.
5. The density of neoformation capillaries has no effect on histopathological type of lesion, the degree of inflammation or the severity score assessed radiologically. The size of periapical lesion is correlated with capillaries density.

General conclusions

1. Periapical lesions in healthy animals induce significant increases in hematocrit, hemoglobin, red blood cells and oxidative stress.
2. Periapical lesions induced in animals with type 2 diabetes mellitus lead to significant elevations in hematocrit, lymphocytes, malondialdehyde, and a progressive decrease of eosinophils.
3. Periapical lesions induced in animals with postmenopausal osteoporosis determine significant increases in oxidative stress and a decline of eosinophils and platelets.
4. In animals with periapical lesions, moderate histopathological changes and significant increments of IL-6 are observed.
5. In animals with type 2 diabetes mellitus, the most pronounced histopathological and histomorphometric alterations, as well as significant increases of IL-6 are shown.
6. In animals with osteoporosis, reduced histopathological changes and significant increases of IL-6 are recorded. The administration of zoledronic acid induces a lower severity degree and reduced local extension of lesions.
7. The histological area of the lesions registers the highest values at 30 days in the group with diabetes mellitus and the lowest values at 60 days in animals with postmenopausal osteoporosis.
8. Radiological examination allows bone lyses stadialization and quantification of characteristic radiological parameters. The radiological area of the lesions has the highest values in the animal group with diabetes mellitus at 14 days.
9. Magnetic resonance imaging allows the identification of periapical lesions at early stages, providing a detailed analysis of soft tissues and stadialization relying on the damage degree. Mineralized tissues, teeth and alveolar bone are accurately detected on high resolution micro-CT images.
10. Capillary angiogenesis is correlated with the lesion's size of radiological area and with the evolution of the periapical inflammatory process, particularly with granulation tissue age.

Originality and innovative contributions of the thesis

The originality of this thesis consists of a complex approach to periapical inflammatory pathology of endodontic origin, which aims to deepen the evaluation of periapical changes; an integrated qualitative and quantitative study on periapical inflammatory lesions, which connects the elements obtained from the analysis of hematological parameters, biochemical parameters of the oxidant/antioxidant balance, immunological, histomorphometric and radiological parameters in animals with and without systemic diseases such as type 2 diabetes mellitus and postmenopausal osteoporosis. Magnetic resonance and micro-CT imaging are effective adjuvant methods for the investigation of periapical structures in experimental studies on animal models. The accurate evaluation of experimentally induced periapical lesions on magnetic resonance and micro-CT images improves the accuracy and quality of diagnosis. The clinical

study revealed associations between the size of periapical granuloma, periapical granuloma with cystic potential and radicular cyst and the proliferation of newly formed vessels in the evolution of the inflammatory process in patients.

The elements of originality are the following:

- The thesis is a complex clinical and experimental study on changes occurring in periapical lesions.
- It highlights hematological, redox homeostasis and immunological changes in an experimental model.
- A complex research based on first-time investigation methods that can be used for clinical applications.

The innovative contributions of the thesis consist of:

- Radiological assessment based on the analysis of periodontal ligament, lamina dura, alveolar bone, severity index, radiological area, allowing the evaluation of advanced stages of periapical lesions.
- Identification and visualization of periapical changes on magnetic resonance and micro-CT images; the imaging investigations allow staging the lesions, being clearly superior to radiological evaluation.
- Experimentally developed evaluation scales based on the degree of involvement of bone and soft tissue structures, allowing diagnostic individualization and proper treatment targeted towards patients.