



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA Y
PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

**Presencia de *Enterococcus faecalis* en un grupo de pacientes chilenos con
Periodontitis Crónica**

Joaquín Amadeo Vázquez de Ponson Du Terrail

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

TUTOR PRINCIPAL

Profesora Nora Silva Steffens

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Loreto Abusleme Ramos

Dra. Alicia Morales Chvets

Adscrito a Proyecto Fondecyt 1130570

Santiago - Chile



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA Y
PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

**Presencia de *Enterococcus faecalis* en un grupo de pacientes chilenos con
Periodontitis Crónica**

Joaquín Amadeo Vázquez de Ponson Du Terrail

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

TUTOR PRINCIPAL

Profesora Nora Silva Steffens

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Loreto Abusleme Ramos

Dra. Alicia Morales Chvets

Adscrito a Proyecto Fondecyt 1130570

Santiago - Chile

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos que han estado siempre al lado mío en este camino, estén presentes ahora o no; más importante es lo que dejaron como lección y recuerdos que el hecho si ahora están presentes o no.

A todas las personas que trabajaron en el Fondecyt 1130570, que permitieron integrarme y trabajar con ellos en el estudio.

A la profesora Nora Silva, por permitirme trabajar al lado de ella y compartir parte de su sabiduría conmigo, no como estudiante, sino como una gran persona que respeto.

A las doctoras Alicia Morales y Loreto Abusleme, a pesar de estar siempre con trabajo, nunca me dejaron a la deriva y me permitieron llevar este trabajo a buen puerto.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Marco Teórico	3
2.1.1 Enterococcus faecalis	4
2.1.2 Enterococcus faecalis y su relación con la periodontitis crónica	6
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3.1 Hipótesis	9
3.2 Objetivo General	9
3.3 Objetivos Específicos	9
4. MATERIALES Y METODOS	10
4.1 Tipo de Estudio	10
4.2 Grupo de Estudio	10
4.3 Obtención de las muestras	11
4.4 Procesamiento Molecular	12
4.4.1 Extracción de ADN	12
4.4.2 Técnica de PCR	13
4.4.3 Electroforesis	13
4.4.4 Análisis de Resultados	14
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSIÓN	17
7. CONCLUSIÓN	23
8. SUGERENCIAS	23
10. ANEXOS	30
Anexo 1. Consentimiento informado	30
Anexo 2. Carta de Aprobación del Comité de Ética	33
Anexo 3. Ficha Clínica	35

1. RESUMEN

Introducción: Dentro de la microbiota normal de la cavidad oral se presenta *E. faecalis*, una bacteria anaerobia facultativa, Gram positivo, frecuentemente asociada a tratamientos endodónticos fallidos, en saliva de pacientes con periodontitis recurrente y población infantil con alto número de lesiones de caries. Dentro de sus características está el poseer diversos factores de virulencia, gran porcentaje de ADN móvil, y el asociarse a otras bacterias del biofilm teniendo de esa manera alta resistencia a antimicrobianos. En estudios recientes ha sido identificado en periodontitis crónica.

Objetivos: El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *E. faecalis* en un grupo de pacientes chilenos diagnosticados con periodontitis crónica.

Materiales y métodos: La muestra en estudio se conformó por 28 pacientes, con diagnóstico de periodontitis crónica, sin tratamiento periodontal previo ni compromiso sistémico por enfermedades o antibióticos asociados. Una muestra por cada cuadrante de cada paciente fue procesada en laboratorio, realizando la detección de *E. faecalis* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Resultados: Nuestros resultados determinaron que *E. faecalis* fue identificado en el 64,23% de las muestras provenientes de pacientes con diagnóstico de Periodontitis Crónica. También se aprecia la diferencia en la detección de *E. faecalis* entre distintos tipos de sitios de acuerdo a las características clínicas de cada uno, encontrándose con mayor frecuencia en sitios con PS \geq 5 mm y IS (+) versus PS \geq 5 mm y IS (-) y PS < 5 mm.

Conclusión: El porcentaje de detección de *E. faecalis* sugiere que este patógeno forma parte de la microbiota en la periodontitis crónica en la población estudiada.

2. INTRODUCCIÓN

La literatura científica ha descrito que gran parte de las enfermedades presentes en cavidad oral poseen una causa microbiana, la cual puede ser caracterizada por medio de test microbiológicos y moleculares, los cuales ayudan a identificar la capacidad infectiva de muchos agentes patógenos y evalúan su susceptibilidad *in vitro*.

La periodontitis, posee como agente etiológico principal un gran número de bacterias, las cuales, de acuerdo a su aparición y organización, guían el curso de la patología en términos de sus características clínicas, clasificándose comúnmente en crónica o agresiva.

La composición bacteriana asociada con periodontitis crónica varía de acuerdo a la población estudiada a nivel mundial. En estudios realizados en Brasil, los autores reportan que hay un predominio de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* y *Eubacterium nodatum*; mientras que en estudios provenientes de España y Holanda las bacterias más comúnmente aisladas son *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Parvimonas micra* (Ali y cols, 1997; Rodrigues y cols, 1999). Tanto la similitud como diferencias entre las distintas microbiotas, nos dan pie para investigar la composición a nivel nacional de las poblaciones bacterianas más comunes en periodontitis, y así tener un mayor entendimiento de como progresa la enfermedad, evaluar sus mecanismos de resistencia y de adaptación con el tiempo (Colombo y cols, 2002).

Quince años atrás se empezó a observar cómo ha variado la microbiota periodontal en las poblaciones, teniendo en este estudio como foco de atención al *Enterococcus faecalis*, que corresponde a la especie bacteriana más comúnmente aislada en infecciones orales como periodontitis refractaria, infecciones en canales radiculares y abscesos perirradiculares (Mundy y cols, 2000).

El analizar la microbiota asociada a una patología crónica ayuda a complementar procedimientos diagnósticos y tomar decisiones terapéuticas,

permitiendo seleccionar un mejor tratamiento, y obtener una menor tasa de fracasos de éstos. Además, es fundamental considerar la población sobre la cual se actúa, ya que existe gran variación en los perfiles microbianos en la cavidad oral.

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Enterococcus faecalis* en muestras subgingivales obtenidas de un grupo de pacientes chilenos con diagnóstico de periodontitis crónica.

2.1 Marco Teórico

La cavidad oral es uno de los nichos ecológicos humanos de mayor biodiversidad conocido hasta el momento, con más de 700 especies de microorganismos identificados (Rams y van Winkelhoff, 2017). Se puede encontrar en estados de salud como de enfermedad, ya sea por caries, patología periodontal, endodóntica, u otra, variando la composición microbiana en un caso u otro (Perea, 2005).

En salud existe una relación de balance y beneficio entre la microbiota oral del hospedero y su medio. La microbiota residente es importante ya que evita la colonización del nicho por patógenos exógenos, confiriendo beneficios cardiovasculares y gastrointestinales, entre otras funciones donde se organizan como biopelículas (organizaciones microbianas formadas por uno o más microorganismos asociados a una superficie, con funciones y estructuras definidas). Estas biopelículas pueden establecerse sobre superficies dentarias como caras oclusales, surcos y fisuras, donde son comúnmente bacterias cocáceas Gram positivo, anaerobios facultativos, con un metabolismo preferentemente sacarolítico sobre los hidratos de carbono de la dieta; mientras que en territorio subgingival tenemos predominio de anaerobios estrictos, aerotolerantes Gram negativo, de metabolismo preferentemente proteolítico (Stewart y Costerton, 2001; Mitchell y cols, 2014).

La periodontitis se define como una “enfermedad inflamatoria crónica de los tejidos de soporte de los dientes, asociada a microorganismos particulares o grupos específicos, donde se produce la destrucción progresiva del ligamento

periodontal y hueso alveolar, con pérdida de inserción, formación de saco periodontal, y recesión gingival” (Armitage, 1999).

La periodontitis crónica, la forma más frecuente de esta patología, se caracteriza por tener un patrón de destrucción tisular relacionada a factores locales, de progresión lenta a moderada, con periodos de avance rápido y pausas, comúnmente asociada a enfermedades sistémicas y con un patrón microbiano variable (Carranza y cols, 2014).

Factores que modulan la expresión de la enfermedad son el género masculino, identificación racial afroamericana o hispánica, hábito tabáquico, obesidad, estrés, polimorfismos genéticos, diabetes mellitus descompensada, deficiencias nutricionales, y características de las colonias bacterianas presentes (Aas y cols, 2005).

Variedad de especies bacterianas están frecuentemente presentes en microbiota subgingival de pacientes con periodontitis crónica no tratada, las que incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas noxia*, *Selenomonas sputigena*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Filifactor alocis*, *Fretibacterium fastidiosum*, y *Dialister pneumosintes* (Rams y van Winkelhoff, 2017).

2.1.1 *Enterococcus faecalis*

Dentro de la microbiota normal de la cavidad oral, gastrointestinal y vaginal se encuentran bacterias de género *Enterococci*. Considerados a su vez como patógenos oportunistas, que pueden causar endocarditis bacteriana y bacteremias (Colombo y cols, 2002).

Como parte de este género, se encuentra la especie *Enterococcus faecalis*, siendo la más comúnmente aislada en infecciones orales asociada a canales radiculares, abscesos perirradiculares y periodontitis refractaria (Mundy y cols, 2000). Este microorganismo, coco Gram positivo, facultativo, inmóvil, de 0,5 a 0,8 μm , no esporulado y que se dispone en pares o cadenas, posee diversos factores de virulencia donde destacan:

- Ácido lipoproteico: estimula la liberación de mediadores proinflamatorios leucocitarios desde polimorfos nucleares neutrófilos y macrófagos.
- Adhesinas de superficie: proteínas de membrana relacionadas con formación de biopelículas y adherencia del microorganismo a proteínas de matriz extracelular y colágeno.
- Citolisina: afecta la tensión de oxígeno, generando un ambiente anaerobio, suprimiendo el desarrollo de otras bacterias, y favoreciendo a otros grupos.
- Gelatinasa: hidroliza colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina e inulina.
- Hemolisina: genera la lisis eritrocitaria, de neutrófilos y macrófagos.
- Hialuronidasa: degrada ácido hialurónico profiriendo daño tisular en tejidos blandos, aumenta la invasión bacteriana por la despolimerización de mucopolisacáridos del tejido conectivo, usado como fuente de nutrientes.
- Sustancia de agregación: facilita la adherencia a tejidos del hospedero, contacto con otras bacterias durante el intercambio de plásmidos, y la internalización en macrófagos.
- Radicales de oxígeno extracelulares: superóxido extracelular que genera daño celular (Kayaoglu y Ørstavik, 2004).

La importancia de identificar *Enterococcus faecalis* en la cavidad oral radica en su asociación a infecciones. Dependiendo de la condición en que se encuentre la cavidad oral de un individuo, es posible la colonización de sus tejidos por esta especie bacteriana, detectada en un 75% de muestras de tejido dentinario obtenida de sujetos con infecciones endodónticas; además, se ha reportado la presencia del microorganismo en el 29% de muestras de saliva, en el 55% de dorso de lengua y en el 22% de muestras de surcos gingivales de pacientes con infecciones endodónticas (Gold y cols, 1975; Brito y cols, 2012).

2.1.2 *Enterococcus faecalis* y su relación con la periodontitis crónica

En el caso de la periodontitis y de acuerdo al grado de avance de la patología y al tipo de muestra, la literatura evidencia porcentajes variables de aislamiento del microorganismo al identificarse por medio de PCR:

- Sujetos con periodontitis crónica: en muestras de fluido gingival crevicular, se aísla entre un 47 a 80%, y en un 40,3% desde muestras de saliva en pacientes sin tratamiento periodontal previo, y en un 47,8% en muestras de fluido crevicular gingival de pacientes con desfavorable respuesta al tratamiento.
- Pacientes ya tratados por esta enfermedad y con salud periodontal: en 17,1% de muestras de fluido crevicular gingival, y 14,7% en muestras de saliva.

La evidencia disponible postula que *E. faecalis* podría estar participando en la patogénesis de la enfermedad, basados en el porcentaje de detección, tomando en cuenta que en los sitios controles sanos de estos estudios se presentaba un menor porcentaje de detección de esta bacteria (Souto y cols, 2008; Balaei-Gajan y cols, 2010; Colombo y cols, 2013).

La detección de *E. faecalis* en personas con diagnóstico de periodontitis, se tiende a asociar con la presencia de inflamación periodontal, que favorece el establecimiento de la microbiota en sitios que proveen un amplio rango de nutrientes y sitios de unión, que colaboran al establecimiento y crecimiento de este microorganismo. También es necesario recalcar su capacidad de soportar condiciones adversas como la falta de nutrientes hasta por 4 meses, utilizando como fuente de nutrientes el fluido crevicular gingival y el hueso adyacente (Colombo y cols, 2002; Sedgley y cols, 2004; Fidgor y cols, 2003; Goncalves y cols, 2007; Souto y cols, 2008).

Su presencia asociada a periodontitis también es vinculada con el empeoramiento de parámetros clínicos clásicos de la enfermedad, como aumento en la profundidad al sondaje, pérdida de nivel de inserción clínica y presencia de sangrado (Colombo y cols, 2013).

Autores destacan la presencia de *E. faecalis* en muestras obtenidas de sacos periodontales en personas con diagnóstico de periodontitis asociados a alguna condición de base que los haga más susceptible a infecciones, tales como SIDA, que se presentan con lesiones necrotizantes a nivel gingival (Rams y cols, 1992; Aas y cols, 2005). Del mismo tipo de población se reporta mala respuesta al tratamiento mecánico convencional de la periodontitis, por lo que se recomienda el complemento farmacológico para tratar esta patología, por medio de la administración de antibióticos como ampicilina, ácido clavulánico, o ciprofloxacino (Rams y cols, 2013), el uso de amoxicilina en conjunto con metronidazol, y la no utilización de tetraciclina, eritromicina o clindamicina como coadyuvantes del tratamiento, producto de la baja sensibilidad descrita en estudios *in vitro* que muestra *E. faecalis* ante ellos, a pesar de estar descrito su uso en guías clínicas (Feres y cols, 2015).

Ahora bien, los hallazgos microbiológicos a través de técnicas clásicas como cultivo bacteriano de muestras subgingivales provenientes de sujetos con diagnóstico de periodontitis crónica, han exhibido diferencias marcadas en la prevalencia de este microorganismo dependiendo de la zona geográfica del planeta en la cual se ha estudiado. Si comparamos la evidencia actual con los datos de hace dos décadas en Europa, se puede asociar este cambio a una alta capacidad de generar resistencia antibiótica. Eso nos hace pensar que no necesariamente los resultados europeos o de otros territorios son homologables a la realidad nacional (Colombo y cols, 2013).

Es importante mencionar que no existen datos disponibles de la prevalencia de *E. faecalis* en población chilena con periodontitis. La literatura indica que ha ocurrido un aumento en la resistencia antibiótica de la microbiota oral a los antibióticos de uso más frecuente, donde las evidencias indican que este microorganismo posee la capacidad de adquirir, acumular y compartir material genético con otras bacterias, producto que el 25% de su ADN corresponde a segmentos móviles y transferibles, lo que favorece la variabilidad genética del microorganismo (Arias y Murray, 2008; Sun y cols, 2012).

En la actualidad, la mayoría de los protocolos antibióticos son prescritos por los profesionales competentes, según lo que dictan las guías clínicas de tratamiento pertinentes, basadas en análisis de poblaciones bacterianas subgingivales, sin considerar que un alto porcentaje de sujetos presentan patógenos periodontales con un alto potencial de generar resistencia antibiótica (Veloo y cols, 2012).

La importancia de caracterizar la microbiota oral de nuestra población radica en la necesidad de planificar en cómo afrontar las patologías asociadas a ellos desde un punto de vista multidisciplinario, buscando optimizar recursos involucrados en el diagnóstico y posterior manejo.

Respecto a la resistencia antibiótica, la Asociación Americana de Periodoncia (AAP) postula que previo a la prescripción de algún antibiótico, se recomienda solicitar un estudio de susceptibilidad antibiótica, buscando así realizar una prescripción más exacta, y disminuir la posibilidad de generar resistencia antibiótica (Slots y cols, 2004).

Enfrentada a esta postura es la sugerida por workshops europeos, que plantean simplemente un mayor control en la prescripción y acceso a los antibióticos a la población (Mombelli, 2003). En este contexto, estudios indican que sería inusual encontrar resistencia antibiótica en muestras subgingivales de sujetos diagnosticados con periodontitis crónica en poblaciones del norte de Europa, donde el uso de antibióticos es generalmente restringido e infrecuente; versus marcados niveles de resistencia antibiótica en patógenos periodontales en otras regiones del mundo, como España (sur de Europa), y Colombia (Sudamérica), donde está menos controlado el acceso y consumo de éstos (van Winkelhoff y cols, 2005; Ardila y cols, 2010).

Dada la facilidad de adquirir resistencia antibiótica que exhibe *E. faecalis*, su presencia y dificultades que conlleva esto respecto a su abordaje terapéutico, el objetivo de este estudio fue identificar *Enterococcus faecalis* en muestras de sujetos con diagnóstico de periodontitis crónica, en población chilena.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Enterococcus faecalis se identifica con alta frecuencia en muestras subgingivales de un grupo de pacientes chilenos con periodontitis crónica.

3.2 Objetivo General

Detectar la presencia de *Enterococcus faecalis* en muestras subgingivales en un grupo de sujetos chilenos con periodontitis crónica.

3.3 Objetivos Específicos

a. Identificar genotípicamente *E. faecalis* en muestras subgingivales de sujetos chilenos de sitios con profundidad al sondaje mayor a 5 milímetros, con y sin sangrado al sondaje.

b. Identificar genotípicamente *E. faecalis* en muestras subgingivales de sujetos chilenos de sitios con profundidad al sondaje menor a 5 milímetros.

c. Comparar la frecuencia de aparición del *E. faecalis* en la enfermedad entre los distintos tipos de sitios.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Tipo de Estudio

Estudio observacional analítico.

4.2 Grupo de Estudio

Los pacientes participantes del estudio fueron por demanda espontánea que acudían a la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile en búsqueda de tratamiento. De un total de 96 pacientes examinados, 36 no cumplieron los criterios de inclusión por lo que no fueron considerados en el estudio. A los 58 pacientes restantes, donde todos aceptaron ser parte del estudio, se le entregó un consentimiento informado para su firma (Anexo 1), el cual fue leído y explicado previamente por los investigadores. El protocolo del estudio de encuentra adscrito al Proyecto Fondecyt 1530750 “Biological plaque control in periodontal diseases: understanding variability of microbiome/immune response and implementation of a conventional periodontal treatment combined with probiotics”, y fue aprobado por los Comité de Ética y de Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 2 y 4, respectivamente). Del total de muestras obtenidas de los 58 pacientes, 30 fueron utilizadas en otras investigaciones asociadas al proyecto, lo que dejó un total de muestras provenientes de 28 pacientes, que fueron utilizadas en su totalidad en el estudio (ver Figura 1).

Los criterios de inclusión de los participantes fueron:

- Tener al menos 35 años de edad.
- Presentar 14 dientes naturales o más, excluyendo los 3ros molares.
- El diagnóstico de periodontitis crónica se confirmó si el participante poseía en un sitio o más una profundidad al sondaje igual o mayor a 5 milímetros, índice de placa igual o mayor a 20%, pérdida de inserción clínica igual o mayor a 3 milímetros, sangrado al sondaje y pérdida ósea alveolar determinada radiográficamente.
- La clasificación de los sitios usada entre sitios fue:
 - PS (profundidad al sondaje) mayor o igual a 5 milímetros e IS (sangrado al sondaje) positivo.
 - PS mayor o igual a 5 milímetros e IS negativo.
 - PS menor a 5 milímetros.

Los criterios de exclusión de los participantes fueron:

- Pacientes que hayan recibido tratamiento periodontal previo al estudio.
- Presencia de enfermedades sistémicas, tratamientos farmacológicos o estados que afectaran el curso natural de la enfermedad durante los últimos 6 meses previo al estudio (diabetes mellitus no controlada, estar bajo tratamiento anticoagulante oral, antibióticos o antiinflamatorios no esteroideos o embarazo).

En la ficha clínica se registraron las características generales y clínicas de cada paciente como edad, sexo y estado coronario (Anexo 3).

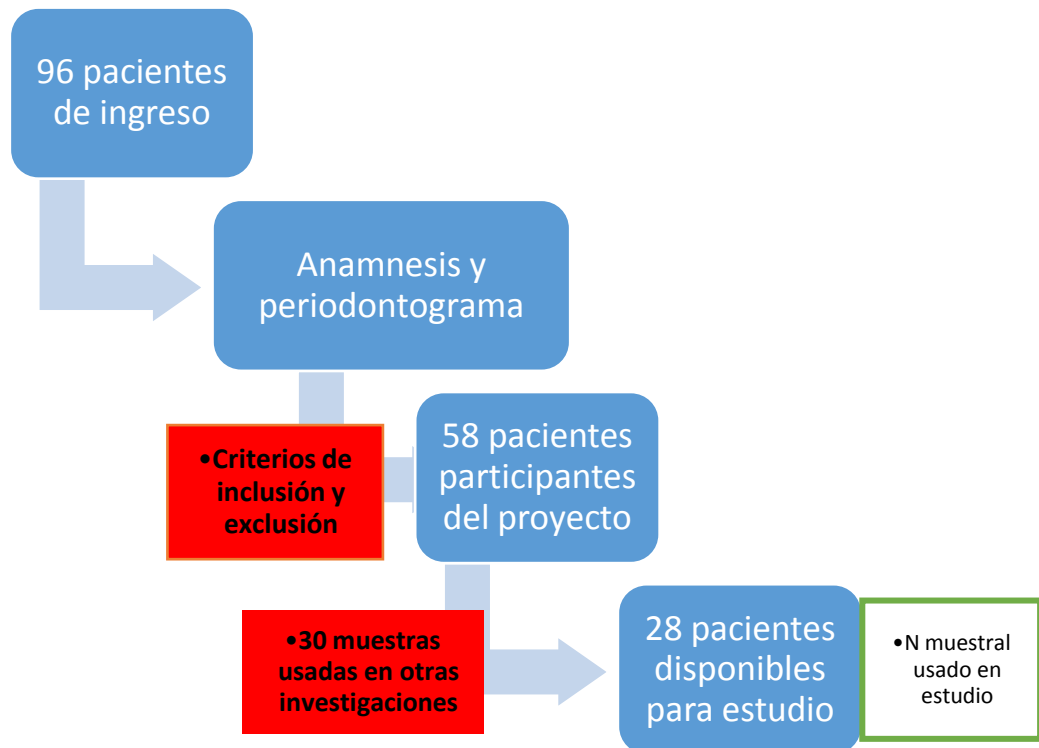


Figura 1. Origen y filtración de participantes de estudio.

4.3 Obtención de las muestras

Por cada paciente se tomaron 4 muestras de placa bacteriana subgingival, una por cada cuadrante, desde los sitios con mayor profundidad al sondaje de cada cuadrante, de sujetos atendidos en la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile, Santiago, Chile.

El procedimiento fue realizado aislando el área con tómulas de algodón y secando con aire. Depósitos duros de cálculo supra y subgingival fueron removidos con curetas (HuFriedy, Chicago, IL, USA) para facilitar la toma de muestras. Las muestras fueron tomadas de la parte más profunda del saco periodontal mediante la inserción de 2 conos de papel n°30 estandarizadas y estériles (Johnson & Johnson, Tokyo, Japon) durante un tiempo de 20 s, después lo cual fueron retiradas y depositadas en un vial con 1 mL de fluido de transporte prereducido (RTF) sin EDTA a 4°C (Ver Figura 2). Los viales fueron transportados al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.



Figura 2. Vial de transporte con conos en 1 mL de medio de transporte RTF (Armijo, 2013).

4.4 Procesamiento Molecular

4.4.1 Extracción de ADN

Las muestras en los viales fueron homogeneizadas por 5 min, posterior a lo cual se extrajeron 200 μ L de cada muestra y transferidas a tubos Eppendorf. Estos fueron colocados en una placa calefactora (Thomas Scientific®) a 112 °C por 8 min, posteriormente trasladadas a -20 °C por 10 min. Posterior a ello, las muestras fueron centrifugadas a 13500 rpm por 5 min (centrífuga Eppendorf®, modelo 5417R). El sobrenadante fue retirado y alicuotado en un tubo Eppendorf estéril y libre de ADNasa y ARNasa, para su uso como templado en la amplificación de ADN mediante PCR (Siquiera y Rocas, 2004).

4.4.2 Técnica de PCR

En la técnica PCR, se usaron 2 partidores específicos, ubicados en la posición 165-187 (directa) y 457-474 (reverso) del genoma de *E. faecalis*, que amplifican un fragmento de aproximadamente 310 pares de bases (pb), utilizado para la identificación de *E. faecalis*, usando como sitio de amplificación el ARNr 16S, polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleotidos codificado por el gen *rrs*, producto de su gran conservación dentro de las especies, de cuya secuencia se puede obtener importante información filogenética y taxonómica.

La reacción de PCR se realizó en 25 µl de mezcla que contiene: 2,5 µl de Buffer 10x, 1 mM de MgCl₂, 0,625 µl de TaqADN polimerasa (Bioline®), 0,1 mM de dNTPs y 0,5 µl de cada partidore específico 50 mM/ µl (*E. faecalis* F – GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG, *E. faecalis* R – CCG TCA GGG GAC GTT CAG), y 5 µl del sobrenadante proveniente de la muestra. En el control positivo se usó una muestra de ADN de *E. faecalis* de 310 pb, y como control negativo se usó agua nanopura.

Los tubos contenedores de mezclas a usarse en la amplificación de ADN fueron insertos en el termociclador (Axygen®, modelo Maxygene Gradient), donde pasaron por una desnaturación inicial a 95 °C por 2 min, 36 ciclos de amplificación (95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min), y un periodo final a 72°C 2 min.

4.4.3 Electroforesis

De los productos provenientes de la amplificación, se tomaron 4 µl que fueron mezclados con 2 µl de Loading Buffer GDLX 5x (Bioline®), y posteriormente cargados en un gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE con gel Red®, inserto en una cámara de electroforesis (Labnet® USA, modelo Enduro).

5 µl del marcador de peso molecular 100 pb ADN Ladder (Favorgen®) fueron cargados en cada primer carril de cada carga dispuesta en la cámara. La electroforesis corrió por 2 hr a 55 V, posterior a lo cual el gel fue transferido a un transiluminador (Dyna Light, Labnet®) y los productos cargados visualizados bajo luz ultravioleta de 300 nm.

La presencia de copias de ADN de *E. faecalis* se estableció mediante comparación visual con el primer carril, donde la reacción se considera positiva al detectar bandas del mismo tamaño molecular (ver Figura 3).

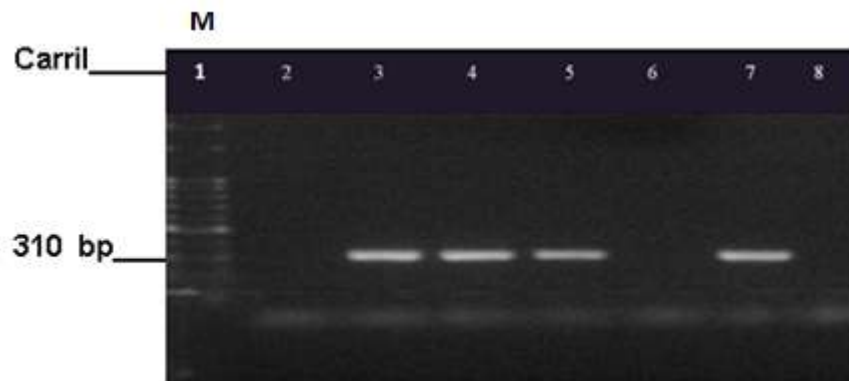


Figura 3. Electroforesis de los productos de amplificación de *E. faecalis*. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 – 6: muestras clínicas. Carril 7: Control positivo (+) *E. faecalis* ATCC 29212. Carril 8: control negativo.

4.4.4 Análisis de Resultados

Los datos cuantitativos fueron registrados como media (\pm), y desviación estándar (DE) para todos los parámetros investigados. Los datos categóricos se informaron como frecuencia relativa y porcentaje. El test exacto de Fisher fue utilizado para comparar la prevalencia de *E. faecalis* en diferentes tipos de sitios periodontales; dividimos los sitios en 3 tipos tomando como parámetros de referencia la PS (profundidad al sondaje) e IS (índice de sangrado): sitios con PS < 5 mm, sitios con PS \geq 5 mm, IS negativo y con PS \geq 5 mm, IS positivo. Un nivel de 95% de confianza fue considerada como estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El análisis estadístico fue realizado usando Microsoft Excel® 2011, y el paquete estadístico de Stata® 11 (StataCorp, CollegeStation, TX).

5. RESULTADOS

El 100% de los pacientes presentaban periodontitis crónica. Los datos de la población en estudio y sus características clínicas se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de la población perteneciente al estudio y las características clínicas de su periodonto.

Indicador	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Características de la población en estudio	
Número de dientes	23,8	3,7	14	28	Hombres = 16 (69,2%)	Mujeres = 12 (31,8%)
Índice de Placa	60,9%	17,1%	18,9%	100%		
Índice de Sangrado	57,3%	14,3%	26,2%	81,5%	Fumadores = 21 (75%)	No fumadores = 7 (25%)
Profundidad de Sondaje	3	0,6	2,1	4,6		
Nivel de Inserción clínica	1,7	0,8	-0,3	3,4	Edad promedio = 48,5 ± 8,5 años	

Descripción de los sitios de muestra estudiados.

El total de sitios estudiados fue de 111, sus características se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de los sitios de muestra estudiados.

Indicador	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Índice de Placa	77,97%	22,47%	25%	100%
Índice de Sangrado	77,97%	24,23%	25%	100%
Profundidad de Sondaje	5,35	0,88	4	7
Nivel de Inserción clínica	6,3	1,3	4	10,3

En total se tomaron un total de 111 muestras provenientes de 28 pacientes (de un paciente solo se lograron obtener 3 muestras por ausencia de todo un cuadrante). El porcentaje de detección de *E. faecalis* entre todos los sitios estudiados fue de un 64,29%. El desglose por sitio se presenta en la figura 4.

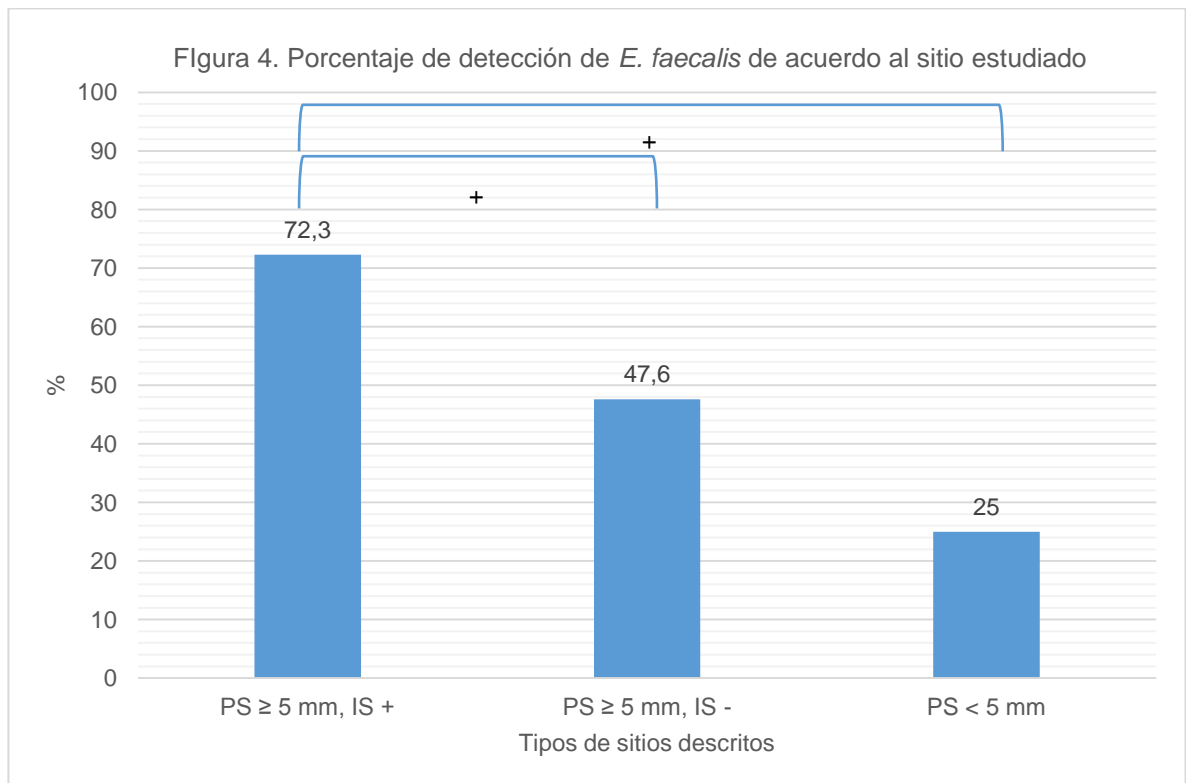


Figura 4. Porcentaje de detección de *E. faecalis* en los sitios en estudio (Sitios con PS \geq 5 mm, IS positivo; Sitios con PS \geq 5 mm, IS negativo; Sitios con PS < 5 mm)

En el grupo con PS \geq 5 mm e IS (+), la detección de *E. faecalis* ocurrió en el 72,3% de las muestras (47 sitios positivos sobre 65), teniendo una detección significativamente mayor al grupo PS \geq 5 mm e IS (-) con 47,6% de detección (10 sitios positivos sobre 21; $p = 0,005$) y que los sitios con PS < 5 mm, donde el porcentaje de detección fue del 25% (6 sitios positivos sobre 25; $p = 0,038$). No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de detección entre sitios con PS \geq 5 mm e IS (-) con sitios PS < 5 mm ($p = 1$).

6. DISCUSIÓN

El mayor uso que se le han dado a las técnicas de cultivo e identificación microbiológica en odontología está asociado a enfermedad periodontal y caries, su diagnóstico, caracterización y tratamiento. Iniciando desde fines de los años 70 con análisis morfológicos y de motilidad microbiana, llegando hasta la actualidad con análisis genómicos de muestras, buscando una identificación más precisa de la microbiota presente. Cada técnica con sus ventajas y desventajas ha aportado información para la comprensión de estas patologías periodontales, ya sea definiendo la configuración base de sus complejos bacterianos, o la sensibilidad ante fármacos específicos para la planificación de protocolos de acción en esta patología. Con la actualización y complemento de esta misma información, ayudado por el advenimiento de nuevas tecnologías, se ha ayudado al investigador y al clínico a tomar mejores decisiones terapéuticas (Rams y van Winkelhoff, 2017).

La investigación desarrollada tuvo por objetivo determinar la presencia de *E. faecalis* en pacientes con diagnóstico de Periodontitis Crónica, ya que si bien, se ha identificado en pacientes con esta enfermedad, la frecuencia de detección encontrada en otros estudios a nivel mundial hace necesario evaluar este parámetro en nuestra población, siendo este trabajo el primero realizado en nuestro país. Además, nuestro estudio también nos permitió evaluar, si la presencia de esta bacteria se asocia a parámetros clínicos objetivos propios de la enfermedad. La información recopilada para plantear este trabajo proviene en su totalidad de trabajos realizados y publicados en el extranjero.

Los resultados obtenidos muestran una alta frecuencia de *E. faecalis* en el grupo de pacientes que presentaban diagnóstico de periodontitis crónica (64,29%), valor que confirma nuestra hipótesis principal de trabajo.

Datos similares son los obtenidos por Colombo y cols. (2002), quienes examinaron la presencia de *E. faecalis* en muestras subgingivales de microbiota bacteriana en un grupo de pacientes con periodontitis sin tratamiento previo y comparándolos con pacientes con salud periodontal, usando la técnica de PCR. En contraste, Rams y cols. (2003), detectaron este microorganismo solo en el

5,1% de los pacientes con periodontitis crónica usando técnicas de cultivo microbiológico, mientras que Souto y cols. (2008) encontraron una mayor prevalencia (80%) de esta especie en muestras de biofilm subgingival extraídas desde pacientes con periodontitis utilizando PCR como medio de detección. Adicionalmente, estos últimos autores observaron que esta bacteria es mucho más prevalente en sitios sanos de pacientes con periodontitis crónica que en sitios sanos de pacientes sin la patología.

La elevada frecuencia de *E. faecalis* en pacientes con periodontitis sugiere que el establecimiento de este microorganismo puede estar favorecido por la presencia de los complejos microbianos subgingivales y la inflamación gingival. Se puede asociar que los sacos periodontales presentan un ambiente propicio para la colonización por *E. faecalis*. Lo complejo y diverso de la microbiota asociada con el proceso inflamatorio persistente puede proveer de un amplio rango de nutrientes y sitios de unión que favorezcan el establecimiento del microorganismo, además de ser un ambiente altamente anaerobio que favorece su colonización (Sun y cols, 2012).

Johnson y cols. (2006), en un estudio observaron interacciones de coagregación entre *E. faecalis* y *F. nucleatum* en muestras de periodontitis apical recurrente. *Fusobacterium spp.* son descritas como parte del “Complejo naranja” de la periodontitis descrito por Socransky y cols. (1998). Respecto a ello, se ha visto su aumento en frecuencia de aparición en sitios con sacos periodontales profundos, con pérdida de inserción periodontal y sangrado al sondaje, asociándose su presencia junto a *E. faecalis*.

Parte de las hipótesis que proponen una explicación al incremento de la prevalencia o severidad de la periodontitis están asociadas al efecto acumulativo de pérdida de soporte periodontal en el tiempo, alteraciones en la respuesta del sistema inmune o estatus inflamatorio, y a la composición de la microbiota oral (Feres y cols, 2016). Este último aspecto ha sido explorado en el presente trabajo.

Las diferencias significativas obtenidas al comparar la frecuencia de detección de *E. faecalis* entre distintos tipos de sitios estudiados, de acuerdo a su

grado de severidad, indicarían que la presencia del microorganismo podría estar asociada a la presencia de inflamación y de algún proceso de destrucción tisular activo. Hablamos de un proceso de destrucción tisular activo para diferenciarlos de los sitios que ya presentan algún grado de destrucción tisular, más sin signos inflamatorios, como de los sitios sanos de pacientes con periodontitis crónica. En este estudio no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de aparición de *E. faecalis* entre los sitios con PS \geq 5 mm e IS (-) y PS < 5 mm. Estos datos son comparables con la información obtenida de la literatura, donde se destaca la presencia aumentada de *E. faecalis* y una posible asociación al acrecentamiento de parámetros clínicos de destrucción periodontal e inflamación (profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica, sangrado al sondaje o posición de la encía) (Jett y cols, 1994). La presencia de *E. faecalis* nos hace sugerir que esta especie también podría jugar un rol en la severidad y/o progresión de la enfermedad.

Enterococci orales producen factores de virulencia con una posible relevancia en la patogénesis de la periodontitis, incluyendo sustancias de agregación bacteriana, adhesinas de superficie, ácido lipoteicoico, superóxidos extracelulares, enzimas líticas como la gelatinasa, hialuronidasa, citolisina y hemolisinas capaces de producir disfunciones neutrofílicas (Kayaoglu y cols, 2004). Cada uno de estos elementos puede estar asociado a varias etapas de la enfermedad periodontal.

La diferencia en la detección de *E. faecalis* observada en la literatura puede resultar de variaciones en la población en estudio, estatus oral o sistémico del paciente, tipo y número de muestras clínicas y métodos de detección. Estudios han mostrado que la microbiota periodontal varía en su frecuencia y proporción en poblaciones con distinta base étnica (Colombo y cols, 2002; Haffajee y cols, 2004). Yatsuneko y cols. (2012) reportaron que el microbioma de la faringe humana de distintas poblaciones (Estados Unidos, Venezuela y Malawi), tomando muestras de sujetos en un amplio rango de edades (desde recién nacidos hasta los 83 años), que determino la composición filogenética de los complejos bacterianos varía considerablemente durante los 3 primeros años de vida, y posterior a ello, se

estabilizan, más no tienden a igualarse en el tiempo, marcando a temprana edad diferencias en su composición, lo que puede conllevar a cursos y manejos distintos de las patologías asociadas a estos complejos. La frecuencia de detección de *E. faecalis* también puede ser influenciada por las condiciones de salud oral o sistémicas de los participantes en los estudios a nivel individuo o poblacional. Por ejemplo, estudios clínicos han mostrado que especies de este género bacteriano no son usualmente, o son en bajo grado, parte de la microbiota bacteriana de canales radiculares no tratados. Sin embargo, *E. faecalis* ha sido largamente asociado a la persistencia de infecciones en canales radiculares, y es la especie predominante en canales radiculares de dientes con tratamientos endodónticos fallidos (Rocas y cols, 2004; Sundqvist y cols, 1998). Esta especie bacteriana además está asociada a lesiones de mucosas en pacientes inmunocomprometidos. Goncalves y cols. (2007) han reportado que *E. faecalis* es comúnmente encontrado en microbiota subgingival de pacientes portadores del virus de la Inmuno deficiencia humana (VIH) en comparación con pacientes no portadores con periodontitis.

La microbiología molecular, a pesar de poseer limitaciones descritas por autores, como la posibilidad de otorgar resultados falsos negativos por la alteración del ADN proveniente de células muertas que harían no detectables ciertos rastros de material genético (Petti y cols, 2005; Siqueira y cols, 2005), la mayoría de las investigaciones concuerdan en que la biología molecular y PCR dan los resultados más exactos en la detección de *Enterococci*, producto de esta misma capacidad de captar ADN desde células ya muertas, que amplían el espectro de muestra disponible en comparación con la microbiología clásica (Haffalee y cols, 2004; Sedgley y cols, 2005; Sedgley y cols, 2006).

La presencia de este microorganismo en lesiones periodontales tiene implicaciones importantes respecto a las decisiones terapéuticas asociadas al manejo de esta enfermedad. Patógenos establecidos en el biofilm dental, van a ser de más difícil manejo, debido a su alta resistencia a antimicrobianos y mecanismos de defensa inmunológica, incrementando la probabilidad de reinfecciones y fracasos en tratamientos (Costerton, 1999).

Desde los años 80 se sabe que en biofilms subgingivales se han identificado beta-lactamasas enterococicas que pueden afectar la eficacia de antibióticos β -lactámicos en el tratamiento de la periodontitis (Murray y cols, 1986). Como también se sabe desde los años 90, gracias a estudios *in vitro*, de la habilidad de *E. faecalis* de inactivar el metronidazol, por lo que patógenos anaeróbicos que se encuentran en sitios infectados por *E. faecalis* tienden a presentar resistencia al metronidazol a niveles 4 a 8 veces más grandes que la concentración normal inhibitoria, antibiótico clave como complemento al tratamiento de la periodontitis crónica al usarse como coadyuvante del tratamiento mecánico convencional, sólo o junto con amoxicilina (Nagy y cols, 1990; Feres y cols, 2015).

Respecto a la resistencia antibiótica que puede presentarse, la aparición de este microorganismo en muestras gingivales de los pacientes en estudio sugiere revisar los protocolos de tratamiento mecánico de la periodontitis, buscando control sobre *E. faecalis*, ya que, según las características de este patógeno, se hace de muy difícil control en el espacio subgingival donde se encuentra. Sun y cols. (2016) evaluaron la capacidad migratoria de *E. faecalis* por túbulos sintéticos hechos con estereolitografía en grosores de 10, 5, 3 y 2 μm , intentando emular los grosores de los túbulos dentinarios, donde este microorganismo puede permanecer en estado inactivo por meses. Se observó que de acuerdo al grosor del espacio dispuesto, la profundidad de éste, y otras bacterias presentes en dichos experimentos, se estimula la migración de este microorganismo. Esto presentaría una mayor dificultad en su remoción por medio de las terapias tradicionales mecánicas, y por gran parte de los medios de irrigación periodontal y endodóntica.

Existe la necesidad por complementar los procesos diagnósticos y de análisis de riesgo de los pacientes con enfermedad periodontal, producto de las limitaciones que representa el solo análisis de datos clínicos y radiográficos, ya que se ha visto la poca utilidad predictora de futura destrucción periodontal en casos de enfermedad activa (Armitage, 2013).

En la década pasada, múltiples estudios se han concentrado en la relación entre las enfermedades periodontales, bacterias asociadas y enfermedades sistémicas (Reddy, 2007). Viceversa, como complejos bacterianos asociados a enfermedades de otra índole pueden colonizar la cavidad oral. Bahrani-Mougeot y cols. (2007) observaron que en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica se presentaban patógenos periodontales dentro de las vías de ventilación, como *E. faecalis* asociado a patógenos respiratorios como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Estos resultados son asociables a otras publicaciones, donde población adulto mayor postrada en residencias sin ventilación mecánica, pero con bajo cuidado de su salud oral, xerostomía, disfagia, y problemas motrices como en la enfermedad de Parkinson u otras discinesias motoras, presentaban colonización de patógenos respiratorios asociados a biofilms periodontales (El-Sohl y cols, 2004; Didilescu y cols, 2005).

La inflamación sistémica asociada al envejecimiento o “Inflammaging”, se asocia con un aumento de la morbilidad y mortalidad de los adultos mayores, y podría interferir en la microbiota residente natural de algunas áreas del organismo, tales como oro-faringe; sumado a esto último, la disminución de la respuesta inmune en el mismo tipo de población o “Inmunosenescencia”, puede contribuir además a una susceptibilidad aumentada de los adultos mayores a infecciones microbianas, los cuales pueden magnificar los efectos de la inflamación propia de ellos (Feres y cols, 2016).

Por otra parte, hay que revisar los protocolos antibióticos, a los cuales este patógeno sea susceptible, buscando contribuir al éxito del tratamiento periodontal y la disminución de reagudizaciones de la enfermedad que se mantiene en control, en los cuales este microorganismo se aísla mayoritariamente. Todo esto en búsqueda de mejorar el estado de salud general de los pacientes afectados, buscando disminuir el riesgo de infecciones oportunistas ocasionadas por este patógeno, como bacteremias, endocarditis y meningitis bacterianas, entre otras. Además, se ha reportado que *E. faecalis* tiene la capacidad de translocarse desde

el tejido periodontal infectado hacia la cadena de ganglios linfáticos submandibulares (De Meelo y cols, 2003).

En resumen, el resultado de este estudio muestra que la cavidad oral corresponde a un reservorio de *E. faecalis*; como también los hallazgos proveen de evidencia adicional de la distinta frecuencia de aparición del organismo de acuerdo a las características clínicas que se presenten en cada caso. Recordando que, al ser el primer estudio realizado en el país, se hace menester complementar la información dispuesta en este trabajo con más investigación, buscando entender a cabalidad el rol de esta bacteria en la enfermedad periodontal.

7. CONCLUSIÓN

El alto porcentaje de aislamiento de *E. faecalis*, sugiere que este patógeno forma parte de la microbiota en la periodontitis crónica en la población estudiada.

8. SUGERENCIAS

Se considera necesario el estudio de *E. faecalis* en la población chilena, a fin de conocer su rol en la patología periodontal, y controlar su acción dentro de la misma. Resulta imperiosa la regulación de la farmacología asociada a esta bacteria, producto de su capacidad adaptativa, al asociarse a otros complejos bacterianos, lo que dificulta el tratamiento a largo plazo de las patologías a las cuales se asocia. Finalmente se sugiere en futuros estudios el poder ampliar la muestra del estudio para poder comparar los resultados con similares en el extranjero que poseen un mayor tamaño muestral.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721-32.

Ali RW, Martin L, HAffajee AD, Socransky SS (1997). Detection of identical ribotypes of *Porphyromonas gingivalis* in patients residing in the United States, Sudan, Romania and Norway. *Oral Microbiol Inmunol* 12:106-111.

Armijo J (2013). Presencia de *Enterococcus faecalis* en dientes con diagnóstico de periodontitis apical asintomática. (Tesis de pregrado) Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Ardila CM, Granada MI, Guzmán IC (2010). Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* 45:557-63.

Arias CA, Murray BE (2008). Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6:637-55.

Armitage GC (1999): Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4:1-9.

Ashimoto A., Chen C., Bakker I, Slots J (1996). Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 11:266-73

Armitage GC (2013). Learned and unlearned concepts in periodontal diagnostics: a 50- year perspective. *Periodontol 2000* 62:20–36.

Bahrani-Mougeot F, Paster B, Coleman S, Barbuda S, Brennan M, Noll J, Kennedy T, Fox, P y Lockhart P (2007). Molecular Analisis of Oral and Respiratory Bacterial Species Associated with Ventilator-Associated Pneumonia. *J Clin Microbiol* 45:1588-93.

Balaei-Gajan E, Shirmohammadi A, Abashed R, Agazadeh M, Fara-marzue M (2010). Detection of *Enterococcus Faecalis* in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15: 3667-70.

Brito LC, Teles FR, Teles RP, Franca EC, Ribeiro-Sobrinho AP, Haffajee AD, y Socransky SS (2007). Use of multiple displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization to examine the microbiota of endodontic infections. *J Clin Microbiol* 45:39-49.

Carranza F, Klokkevold P, Newman M, Takei H (2014). *Periodontología Clínica de Carranza*. 11va ed. Amolca, Caracas.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém WJ, Mendes MC (2002). Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol*. 73:360-9.

Colombo AV, Barbosa GM, Higashi D, di Micheli D, Rodrigues PH y Simionato MR (2013). Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *J Med Microbiol* 62:1592-1600.

Costerton J (1999). Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11:217-21.

Didilescu A, Skaug N, Marica C y Dididescu C (2005). Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases. *Clin Oral Invest* 9:141-7.

El-Sohl A, Pietratori C, Bhat A, Okada M, Zambon J, Aquilina A y Berbary E (2004). Colonization of Dental Plaques. A Reservoir of Respiratory Pathogens for Hospital-Acquired Pneumonia in Institutionalized Elders. *Chest* 126:1575-82.

Feres M, Figuiereido L, Silva Soares G, Faveri M (2015). Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontology 2000* 67:131-86.

Feres M, Teles F, Teles R, Figuiereido L, Faveri M (2016). The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontology 2000* 72:30-53.

Fidgor JK, Davies GS (2003). Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immun.* 18:234-39.

Gold OG, Jordan HV, van Houte J (1975). The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Arch Oral Biol* 20:473-77.

Gonçalves L de S, Soares Ferreira SM, Souza CO, Souto R, Colombo AP (2007). Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive Brazilians undergoing highly active antiretroviral therapy and HIV-seronegative Brazilians with chronic periodontitis. *J Periodontol* 78:87-96.

Haffajee A, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez N, Socransky S (2004). Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 31:996-1002.

Jett B, Huycke M, Gilmore M (1994). Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7:462-78.

Johnson E, Flannagan S, Sedgley C (2006). Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod* 32:946-50.

Kayaoglu G, Ørstavik D (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:308-20.

Mitchell D, Mitchell L, McCaul L (2014). Oxford Handbook of Clinical Dentistry. 6th Edition; Oxford. Oxford University Press.

Mombelli A (2003). Antimicrobial agents in periodontal prevention, therapy and maintenance: Conclusions from the GABA Forum, 6 December 2002, Lyon, France. *Oral Dis* 9:71-2.

Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 13:513-22.

Murray B, Church D, Wanger A, Zscheck K, Levison M, Ingerman M (1986). Comparison of two b-lactamase-producing strains of *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 30:861-4.

Nagy E, Werner H, Heizmann W (1990). In vitro activity of daptomycin-metronidazole combinations against mixed bacterial cultures: reduced activity of metronidazole against bacteroides species in the presence of *Enterococcus faecalis*. *Eur J Clin Microbiol* 9:287-92.

Perea EJ (2004). La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Oral Patol Oral Cir Bucal* 9:1-10.

Petti C, Polage C, Schreckenberger P (2005). The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* 43:6123-5.

Rams T, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J (1992). Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 7:249-52.

Rams T, Feik D, Mortensen J, Degener J, van Winkelhoff A (2013). Antibiotic Susceptibility of periodontal *Enterococcus Faecalis*. *J Periodontol* 84:1026-33.

Rams T, van Winkelhoff A (2017). Introduction to Clinical Microbiology for the General Dentistry. *Dent Clin N Am* 61:179-97.

Reddy M (2007). Reaching a better understanding of non-oral disease and the implication of periodontal infections. *Periodontol 2000* 44:9-14.

Rocas I, Siqueira Jr J, Santos K (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30:315-20.

Rodrigues PH, Carvalho SA, Costa JE, Carvalho MAR, Farias LM, Petrillo-Pelxoto ML (1999). Black-pigmented Gram-negative anaerobes in Brazilian adults with periodontal disease. *Anaer* 5:267-68.

Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB (2004). Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 19:95-101.

- Sedgley CM, Nagel A, Shelburne C, Clewell D, Appelbe O, Molander A (2005). Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol* 50:575-83.
- Sedgley CM, Gwendolyn B, Appelbe O (2006). Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 32:104-9.
- Siqueria J, Rocas I (2004). Simultaneous Detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocisin* Endodontic Infections by 16S rDNA-directed Multiplex PCR. *J Endod* 12:851-54.
- Siqueira J, Rocas I (2005). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections. Part 1. Current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 31:411-23.
- Slots J (2004). Research, Science and Therapy Committee. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 75:1553-65.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque.
- Souto R, Colombo AP (2008). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol* 53:155-60.
- Stewart P, Costerton J (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358:135-38.
- Sun J, Sundsfjord A, Song X (2012). *Enterococcus faecalis* from patients with chronic periodontitis: Virulence and antimicrobial resistance traits and determinants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:267-72.
- Sundqvist G, Fidgor D, Persso S, Sjögren U (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:86-93.

van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M (2005). Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 32:893-98.

Veloo AC, Seme K, Raangs E, et al (2012). Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 40:450-54.

Yatsunenکو T, Rey F, Mnary M, Trehan I, Dominguez-Bello M, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano R, Anokhin A, Heath A, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso J, Lozupone C, Lauber C, Clemente J, Knights D, Knight R, Gordon J (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486:222-7.

10. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado



Facultad de Odontología
Universidad de Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Odontología – Departamento de Odontología Conservadora
Ed: 12/09/2012

Proyecto de Investigación Fondecyt
Académico Responsable: Jorge Gamonal

CONSENTIMIENTO INFORMADO – ADULTOS

Antecedentes Generales

Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio patrocinado por Fondecyt Regular, titulado "Control biológico en las enfermedades periodontales: conociendo la variabilidad de la respuesta microbioma/inmune y la implementación de un tratamiento periodontal convencional mas probióticos". Estas enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis) corresponden a una infección de los tejidos alrededor del diente y con el tiempo y sin tratamiento puede generar una lesión destructiva en los tejidos que rodean la raíz del diente. El tratamiento de estas lesiones es la eliminación de la placa bacteriana acumulada alrededor del diente, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas a esta enfermedad.

En términos generales, el objetivo del presente estudio es caracterizar la presencia de las bacterias localizadas alrededor del diente y conocer la presencia de algunos indicadores de la respuesta defensiva del sujeto, como la detección de ciertos mediadores involucrados en inflamación.

Con este fin se incluirán adultos con periodontitis crónica (enfermedad en estudio) y otros adultos sanos, en los que además del tratamiento periodontal de eliminar la placa bacteriana, el tártaro presente y efectuar la enseñanza de técnica de cepillado, se procederá a tomar muestras biológicas de la placa bacteriana y del fluido gingival crevicular. En el presente estudio habrá un grupo placebo, y las personas afectadas por gingivitis o periodontitis recibirán tratamiento estándar o experimental con probióticos.

Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

Procedimiento de toma de las muestras

Se incluirán pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica y controles sin la enfermedad, que no presenten enfermedades generales. Una vez realizado el diagnóstico se tomarán las muestras biológicas (mediante un cono de papel y una tira de papel absorbente en la unión de la encía con el diente) al inicio del estudio, luego a los 6 y 12 meses.

Durante el tratamiento en forma aleatoria se designara que grupo de pacientes estará usando probióticos (microorganismos vivos que al ingerirse ejercen efectos benéficos para la salud) durante 6 meses y que grupo de pacientes estara sin usar probióticos.

La duración del estudio será por tanto de un año en pacientes que se realicen tratamiento periodontal. El financiamiento del tratamiento será responsabilidad del estudio, y los análisis de muestras serán financiados por el proyecto, así como el estudio radiográfico requerido para éste.

El total de muestras y datos obtenidos serán registrados e identificados por el investigador responsable mediante códigos para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente

Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia 97818





estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales y se utilizarán códigos para mantener oculta la identidad de los participantes. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, sólo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

Los pacientes que luego de ingresar al estudio manifiesten después del análisis clínico que no han obtenido la mejoría deseada, serán atendidos profesionalmente sin costo alguno por los profesionales integrantes del proyecto de investigación.

Beneficios de participar en el estudio

Como ventaja de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les hará entrega de todos los elementos necesarios para la higiene bucal (cepillo denterio, cepillo interproximal, seda y enjuagatorios).

Otra ventaja es que se les dará a conocer y se consignará en su ficha clínica los resultados de los análisis que resultan de las muestras biológicas tomadas a los pacientes.

En relación con el tratamiento periodontal, en el tratamiento realizado por el suscrito, se hará una rebaja de un 50% del arancel que la Facultad tiene dispuesto cobrar para tales efectos.

Riesgos de participar el estudio

La desventaja de participar en el presente estudio, es que los pacientes seleccionados serán sometidos a la toma de muestra de fluido gingival crevicular y de placa bacteriana (que no requiere anestesia, y es inocua para el paciente).

En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable: Jorge Gamonal, son: 9781839, 9781838, y 2324232.

En la situación de tener un imprevisto gastrointestinal por el uso de probióticos, contactarse con el Investigador Principal, quién derivará inmediatamente al Dr. José Manuel Manríquez, integrante del presente proyecto de investigación.

Se señala además que en el presente estudio no hay retribución económica.





FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Dedaro haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mí entregados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Dr. Juan Cortés, en el fono: 9781701.

Además, se me ha aclarado, que en caso de no dar mi consentimiento, el profesional procederá de todas maneras a realizar el mencionado tratamiento periodontal.

Identificación Paciente

Nombre: _____
Rut: _____
Fono: _____
Firma _____ Fecha: _____

Identificación Testigo

Nombre _____
Fono: _____
Firma _____ Fecha: _____

Identificación del Investigador que toma el CI

Nombre _____
Fono: _____
Firma _____ Fecha: _____

Identificación Inv. Resp.

Nombre: _____
Fono: _____
Firma _____ Fecha: _____



Anexo 2. Carta de Aprobación del Comité de Ética



ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

12/09/2012

ACTA N°: 2012/08

1. Acta de aprobación de protocolo de estudio N° 2012/11
2. Miembros permanentes del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Juan Cortés
Presidente del CEC

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Dra. Karín Lagos
Miembro permanente del CEC

Dr. Alejandro Ecoobar
Miembro permanente del CEC

3. Fecha de Aprobación: 12/09/2012
4. Título completo del proyecto: "Biological plaque control in periodontal diseases: understanding variability of microbiome/immune response and implementation of a conventional periodontal treatment combined with probiotics" FONDECYT REGULAR Id_12566-3-1. Versión 04/07/2012
6. Investigador responsable: Dr. Jorge Gamonal Aravena, académico del Departamento de Odontología Conservadora Facultad de Odontología, Universidad de Chile
8. Institución: Facultad de Odontología, Universidad de Chile y Fondecyt
7. Documentación Revisada:
 - Protocolo versión en Inglés del Proyecto: "Biological plaque control in periodontal diseases: understanding variability of microbiome/immune response and implementation of a conventional periodontal treatment combined with probiotics" FONDECYT REGULAR Id_12566-3-1. Versión 04/07/2012
 - Documentos de Consentimiento Informado para Pacientes adultos, para padres de adolescentes y Asentimiento Informado versión 12/09/2012
 - Currículo del Investigador responsable y de Colaboradores



12/09/2012

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

8. Carácter del estudio y de la muestra: Ensayo Clínico Aleatorizado en doble ciego con uso de placebo. Se compararán dos tipos de tratamiento para la enfermedad periodontal en una población de adultos y de adolescentes.

9. Fundamentación de la aprobación ética

Este proyecto busca probar, basándose en el análisis de la microbiota oral, que un tratamiento para la enfermedad periodontal combinado con probióticos es mejor que los tratamientos estándares.

Los investigadores han incorporado en los documentos de consentimiento y asentimiento informado las siguientes modificaciones sugeridas por este Comité:

- > La Modalidad de Notificación de efectos adversos.
- > Un punto que señala que si los pacientes con periodontitis del grupo experimental no logran mejoría -como los pacientes del grupo control- serán tratados nuevamente sin costo asociado.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, aprueba el estudio "Biological plaque control in periodontal diseases: understanding variability of microbiome/immune response and implementation of a conventional periodontal treatment combined with probiotics" FONDECYT REGULAR id_12566-3-1, Versión 04 de Julio de 2012.


María Angélica Torres V
 DDS, MSc, PhD
 Presidente (S) del CEC



C/C,
 Investigador Responsable
 Secretaria C.E.C.

ESTADO PERIODONTAL

Maxilar inferior Vestibular

	47		46		45		44		43		42		41		31		32		33		34		35		36		37				
	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	M	C	D	M	C	D	M	C	D	M	C	D	M	C	D	
Poc. de la enca																															
Sondaje																															
Niv. Inserción																															
Indice Placa																															
Sangrado																															

Maxilar inferior Lingual

	47		46		45		44		43		42		41		31		32		33		34		35		36		37				
	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	M	C	D	M	C	D	M	C	D	M	C	D	M	C	D	
Poc. de la enca																															
Sondaje																															
Niv. Inserción																															
Indice Placa																															
Sangrado																															

INFORMACION COMPLEMENTARIA

1. Número de dientes perdidos:

Motivo de la pérdida de dientes:

Por caries

Por sueltos

Por indicación de ortodoncia

2. Tratamiento previo de ortodoncia:

No: 0

Si: 1

3. Uso de piercing en labios o lengua:

No: 0

Si: 1

Ubicación:

4. Biotipo de encía

Fino: 1

Grueso: 2

Anexo 4. Carta de Aprobación del Comité de Bioseguridad



C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha recepcionado el Proyecto de Investigación FONDECYT Regular 2013 titulado: "**Biological plaque control in periodontal diseases: understanding variability of microbiome/immune response and implementation of a conventional periodontal treatment combined with probiotics**", del cual el Dr. Jorge Gamonal Aravena es el Investigador Responsable. Dicho proyecto se someterá a evaluación por parte de este Comité.

Sin otro particular, le saluda atentamente,

Dra. Carla Lozano M.
Secretaría

Dra. Loreto Abusleme R.
Presidenta

Santiago, 18 de Junio de 2012,

Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 9781792-9781741, Fax: 9781748 - Casilla 1903 - Santiago
<http://odontologia.uchile.cl> E-mail: adm-campus-norte@u.uchile.cl