



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

**“Asociación entre la carga subgingival de *Porphyromonas gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado en individuos con periodontitis”.**

**Daniela Rehbein Raddatz**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTORA PRINCIPAL**

**Dra. Patricia Hernández**

Dpto. de Odontología Conservadora  
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

**TUTORAS ASOCIADAS**

**Prof. Dra. Marcela Hernández**

Dpto. de Patología y Medicina Oral  
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

**Dra. María Angélica Michea**

Dpto. de Odontología Conservadora  
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

**ASESORA**

**Dra. María José De La Quintana**

Dpto. de Odontología Conservadora  
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

**Adscrito a Proyectos IADR-RPD Chilean Division 2020 y**

**FONDECYT 1200098**

**Santiago – Chile**

**2023**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

**“Asociación entre la carga subgingival de *Porphyromonas gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado en individuos con periodontitis”.**

**Daniela Rehbein Raddatz**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

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

**TUTORA PRINCIPAL**

**Dra. Patricia Hernández**

Dpto. de Odontología Conservadora  
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

**TUTORAS ASOCIADAS**

**Prof. Dra. Marcela Hernández**

Dpto. de Patología y Medicina Oral  
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

**Dra. María Angélica Michea**

Dpto. de Odontología Conservadora  
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

**ASESORA**

**Dra. María José De La Quintana**

Dpto. de Odontología Conservadora  
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

**Adscrito a Proyectos IADR-RPD Chilean Division 2020 y**

**FONDECYT 1200098**

**Santiago – Chile**

**2023**

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

### **Dedico este logro a:**

- Mis padres al ser un gran ejemplo, por entregarme valores y enseñanzas. Por el amor, confianza y por darme fuerzas para cumplir cada reto en mi vida, por eso han sido un pilar fundamental.
- Mi hermano por siempre estar ahí, por reírnos y por aconsejarme.
- Mi tío Alejandro y a mis Omas por el apoyo y el cariño que me han entregado.
- Mi pareja Andrés por el amor, los consejos y el apoyo que me ha dado en los momentos difíciles.
- A todos los profesores que fueron parte del proceso universitario (Dr. Juan Francisco Sánchez, Dr. Pablo Milla, Dra. Elizabeth Astorga) que me entregaron enseñanzas y consejos para ser una mejor profesional.
- A todos mis compañeros y amigos que hicieron de este proceso más grato.

### **Agradecer a:**

- La Dra. Patricia Hernández, por darme la posibilidad de trabajar con ella en este trabajo de investigación, también por la paciencia y dedicación en todo este proceso.
- La Dra. Marcela Hernández, a la Dra. María Angélica Michea y a la Dra. María José Bordagaray por darme todo el apoyo durante las distintas fases de este proceso.
- La Dra. Anilei Hoare por sus consejos para mejorar este trabajo de investigación.
- La Dra. Alejandra Fernández y a la Dra. María José De La Quintana por ser parte del proceso de la tesis.
- Bernardita Parada, Elizabeth Pellegrini, Paula, Gabriel y Fernando por ser parte del equipo, por las risas, por ayudarme y enseñarme a ser mejor persona.
- Al Proyecto IADR-RPD Chilean Division: *“Bacterial translocation signatures in periodontitis: A new paradigm for the relationship between periodontal-gut microbiota and non-communicable diseases”* y a FONDECYT 1200098.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1. Etiopatogenia de la enfermedad periodontal .....	3
2.2. Microbiología de la enfermedad periodontal y <i>P. gingivalis</i> .....	6
2.3. Asociación entre <i>P. gingivalis</i> y enfermedades sistémicas inflamatorias. ....	8
2.4. Inflamación sistémica de bajo grado y proteína C reactiva (CRP) .....	9
2.5. Asociación entre CRP y periodontitis .....	10
3. HIPÓTESIS.....	12
4. OBJETIVO GENERAL .....	12
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
6. METODOLOGÍA .....	13
6.1. Diseño .....	13
6.2. Cálculo muestral.....	13
6.3. Selección de la muestra y población de estudio.....	13
6.4. Examen y mediciones clínicas generales.....	14
6.5. Examen bucal y radiográfico .....	14
6.6. Muestras sanguíneas y microbiológicas.....	15
6.7. Análisis estadístico.....	17
7. RESULTADOS.....	18
7.1. Características demográficas, clínicas y séricas de los participantes. ....	18
7.2. Detección y cargas subgingivales de <i>P. gingivalis</i> y de bacterias totales en individuos con periodontitis. ....	20
7.3. Correlación entre la carga subgingival de bacterias totales y carga subgingival de <i>P. gingivalis</i> en periodontitis. ....	21

7.4. Correlación entre los niveles de hsCRP sérica con la carga subgingival de <i>P. gingivalis</i> en periodontitis. ....	22
8. DISCUSIÓN .....	24
8.1. Presencia de <i>P. gingivalis</i> en individuos con periodontitis.....	24
8.2. Carga de bacterias totales y de <i>P. gingivalis</i> .....	25
8.3. Asociación entre carga de <i>P. gingivalis</i> y Proteína C reactiva de alta sensibilidad.....	26
8.4. Fortalezas, debilidades y proyecciones.....	27
9. CONCLUSIONES .....	29
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
11. ANEXOS .....	37
11.1. Anexo 1: Certificado del Comité Institucional de Bioseguridad. ....	37
11.2. Anexo 2: Acta de aprobación del Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. ....	39
11.3. Anexo 3: Documento de consentimiento informado. ....	41
11.4. Anexo 4: Registro clínico de los participantes. ....	45

## RESUMEN

**Introducción:** *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es un patobionte clave en la periodontitis y desencadena una respuesta inmunoinflamatoria periodontal. Sin embargo, se desconoce la relación entre *P. gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado.

**Objetivo:** Determinar la asociación entre presencia y carga subgingival de *P. gingivalis* y los niveles de inflamación sistémica de bajo grado, determinados mediante proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP), en individuos con periodontitis.

**Metodología:** Se realizó un estudio clínico observacional, descriptivo, transversal. Se incluyeron individuos mayores de 18 años, con periodontitis etapa II-IV con profundidad al sondaje  $\geq 5$  mm (N=11) y ausencia de enfermedades sistémicas. Se excluyeron individuos con lesiones apicales endodónticas, obesidad (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), tratamiento antiinflamatorio y/o antibiótico 3 meses previos al estudio, embarazo y lactancia. Se obtuvieron muestras de biopelícula subgingival, se aisló ADN bacteriano y se determinó la carga bacteriana total y *P. gingivalis* (número de copias del gen 16S ARN ribosomal o ARNr por  $\mu$ l) mediante qPCR. La inflamación sistémica se determinó sobre la base de la concentración sérica de hsCRP (mg/L). El análisis estadístico se realizó mediante STATA v16. El estudio fue aprobado por un comité de ética institucional y se realizó siguiendo las pautas de la declaración de Helsinki.

**Resultados:** *P. gingivalis* se detectó en 6 de los 11 individuos. La carga subgingival de bacterias totales fue de un  $1,4 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$  número de copias del gen 16S ARNr / $\mu$ l (promedio  $\pm$  desviación estándar). La carga subgingival de *P. gingivalis* fue de  $9,2 \times 10^4$  ( $2,5 \times 10^6$ ) número de copias del gen 16S ARNr / $\mu$ l [mediana (rango intercuartílico)]. La concentración sérica de hsCRP fue de 1,1 (3,1) mg/L [mediana (RIC)]. No se encontró asociación entre las cargas subgingivales de *P. gingivalis* y de bacterias totales (Rho=0,4; p=0,2) y ni entre las

cargas subgingivales de *P. gingivalis* y los niveles séricos de hsCRP (Rho=0,1; p=0,7).

**Conclusión:** No se encontró asociación entre carga subgingival de *P. gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado (media por hsCRP) en individuos con periodontitis.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales son patologías que afectan a los tejidos que rodean y sostienen los dientes (Thomson et al., 2019). Éstas son altamente prevalentes a nivel mundial (Nazir, 2017) y alcanzan un 90% en la población chilena (Gamonal et al., 2010).

Entre las enfermedades periodontales, la gingivitis inducida por biopelícula oral es la forma más leve y reversible. Sin embargo, si se mantiene en el tiempo podría progresar a periodontitis que se define como una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial caracterizada por la presencia de una biopelícula bacteriana disbiótica, que produce una destrucción progresiva del aparato de soporte del diente (Papapanou et al., 2018). Esta destrucción está mediada en última instancia por la respuesta inmunitaria individual del hospedero (Kumar, 2019), en particular las subpoblaciones de macrófagos activados clásicamente (M1), Th1 y Th17 (Alvarez et al., 2019; Garlet, 2010; Tsukasaki, 2021).

A nivel del surco gingival se pueden encontrar más de mil especies bacterianas en forma de biopelícula entre ellas, patógenos periodontales en salud periodontal. Cuando la biopelícula subgingival se mantiene por largo tiempo, se puede generar una disbiosis capaz de desencadenar una respuesta proinflamatoria por parte del hospedero (Silva et al., 2015). Así, dentro de esta biopelícula disbiótica se encuentra *P. gingivalis*, patobionte predominante en la periodontitis (Al Batran et al., 2014). Este patobionte es capaz de desencadenar una respuesta inmunoinflamatoria, tanto local como sistémica (Carrion et al., 2012). La carga bacteriana de *P. gingivalis* se podría asociar con un aumento de la inflamación sistémica de bajo grado, medida a través de Proteína C Reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) en sangre. Existe evidencia sólida que respalda una correlación positiva entre enfermedad periodontal y los niveles séricos de Proteína C Reactiva (CRP). En efecto, los pacientes con periodontitis presentan niveles más altos de CRP en suero que los pacientes en estado de salud periodontal (Chang et al., 2020; Papapanou et al., 2018; Sezgin et al., 2019).

Considerando lo anterior, el problema a investigar es: ¿Cuál es la asociación entre la carga subgingival de *P. gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado (medida a través de hsCRP) en individuos con periodontitis?

El objetivo de esta investigación es determinar la asociación entre presencia y carga subgingival de *P. gingivalis* y los niveles de inflamación sistémica de bajo grado, determinados mediante hsCRP, en pacientes con periodontitis.

## **2. MARCO TEÓRICO**

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, asociada a una biopelícula bacteriana disbiótica, y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte del diente (tejido conectivo, ligamento periodontal, cemento radicular y el hueso alveolar subyacente) (Papapanou et al., 2018). Esta enfermedad constituye una de las principales causas de pérdida dentaria en la población, y origina múltiples secuelas a nivel de la masticación, estética, confianza y calidad de vida del paciente que la padece (Nazir et al., 2020). Además, la periodontitis se asocia con otras enfermedades no transmisibles a nivel sistémico, como la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y efectos adversos en el embarazo (Nazir et al., 2020).

Las enfermedades periodontales son patologías altamente prevalentes, que afectan entre un 20% a un 50% de la población mundial entre 15 a 74 años (Nazir, 2017). La periodontitis es la sexta enfermedad más común en el mundo, con una prevalencia general del 11,2% en su forma severa (Kassebaum et al., 2014) , y cifras que se elevan más en el sexo masculino, por sobre el femenino (Meisel et al., 2019). En Chile, la enfermedad periodontal está presente en más del 90% de la población adulta, donde el 39% y 69% de los grupos de 35-44 años y 65-74 años, respectivamente, presentan pérdida del nivel de inserción mayor a 6 mm (Gamonal et al., 2010).

### **2.1. Etiopatogenia de la enfermedad periodontal**

Desde el punto de vista clínico, la gingivitis inducida por biopelícula oral es la forma más leve y reversible de enfermedad periodontal (Kumar, 2019). Actualmente, se establece que toda periodontitis es precedida por una gingivitis; sin embargo, no todas las gingivitis progresan a periodontitis, ya que independientemente del factor etiológico principal y factores locales, la evolución de esta patología multifactorial depende en gran parte de la respuesta inmunoinflamatoria individual del hospedero (Kumar, 2019). El equilibrio entre la

respuesta inmune desencadenada y los microorganismos presentes en la cavidad oral determinan el estado de salud, y la pérdida de este equilibrio conduce al estado de enfermedad (Kumar, 2019).

La profundización patológica del surco gíngivo-dentario conlleva a la formación del saco periodontal (Bosshardt, 2018), en el cual se producen eventos inflamatorios que comprometen a las células y mediadores de la inmunidad innata (Yucel-Lindberg y Båge, 2013). Los neutrófilos polimorfonucleares son reclutados primariamente en el sitio de infección, fagocitando a los microorganismos con el objetivo de limitar la infección. Esta línea celular defensiva, no obstante, puede al mismo tiempo contribuir al daño de los tejidos periodontales, al liberar niveles elevados de enzimas y mediadores proinflamatorios, como especies reactivas de oxígeno, lisozima, colagenasas, elastasa, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, responsables de la destrucción tisular (Garlet, 2010).

Dentro de la inmunidad innata participan también los macrófagos, fagocitos capaces de iniciar o resolver procesos inflamatorios, activar la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos, y contribuir tanto a procesos de reparación como de destrucción tisular. Los macrófagos se dividen en dos subtipos funcionalmente diferentes: macrófagos activados por la vía clásica (M1), producidos en respuesta al interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF)- $\alpha$ , interleuquina (IL) 1 $\beta$  e IL-6, con funciones proinflamatorias, antibacterianas y antivirales; y los macrófagos activados por la vía alterna (M2), producidos en respuesta a IL-4 e IL-13, con funciones antiinflamatorias y de reparación/regeneración de tejidos. En pacientes con periodontitis, tanto M1 como M2 aumentan en comparación a los individuos sanos. Sin embargo, algunos estudios reportan que una mayor relación M1/M2 podría asociarse a una mayor expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Alvarez et al., 2019), favoreciendo un microambiente destructivo, la digestión de los componentes de la matriz extracelular y, por lo tanto, la progresión de la periodontitis (Pereira Prado et al., 2016).

Cuando la respuesta inmune innata no es capaz de contener el desafío bacteriano, se activa la respuesta inmune adaptativa. En ella, se pueden describir dos importantes ejes a nivel periodontal: eje Th1/Th17, proinflamatorio y osteodestructivo; y eje Th2/linfocitos T reguladores (Treg), inmunomodulador y osteoprotector (Alvarez et al., 2019). Las células Th1 producen citoquinas proinflamatorias, tales como Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-12, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La respuesta de tipo Th1, mediada por la producción de IFN- $\gamma$ , es necesaria para el control de la invasión microbiana, y a la vez es una de las principales responsables de la pérdida ósea alveolar (Alvarez et al., 2019). Las células Th17 son un subconjunto de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> los cuales, en individuos sanos, se acumulan naturalmente en la mucosa gingival, desempeñando un papel clave en la defensa del hospedero contra bacterias y hongos extracelulares, así como en el reclutamiento de neutrófilos e inflamación local. Además, durante la periodontitis, el subtipo Th17 produce IL-17, lo cual induce directamente la expresión de RANKL, promueve la diferenciación de osteoclastos y, por lo tanto, la resorción ósea alveolar (Alvarez et al., 2019; Tsukasaki, 2021).

Las células Th2, por su parte, producen IL-4, IL-5 e IL-13, así como también median la activación de los mastocitos e inmunidad humoral. Ésta se manifiesta a través del aumento de los linfocitos B y células plasmáticas, así como la producción de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, también se ha planteado la hipótesis de que la activación policlonal de las linfocitos B en las lesiones periodontales podría representar un sistema inmunitario celular frustrado, el cual podría ser capaz de generar una producción de anticuerpos exagerada (Loos y Van Dyke, 2020).

Las células Treg producen IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Son cruciales para la mantención de la homeostasis inmunitaria y la reparación de tejidos y son capaces de inhibir la diferenciación y actividad de los osteoclastos (Alvarez et al., 2019).

## 2.2. Microbiología de la enfermedad periodontal y *P. gingivalis*

Según la base de datos Human Oral Microbiome Database (HOMD), se han identificado más de 700 especies en la biopelícula subgingival (*HOMD: Base de datos del microbioma oral humano*, s. f.). No obstante, investigaciones recientes sugieren la posibilidad de la existencia de más de mil especies distintas en este micoambiente oral (Kumar, 2019). Entre ellas, se podrían encontrar patobiontes presentes en salud periodontal, en un estado de simbiosis. Sin embargo, cambios ambientales y una inadecuada remoción de la biopelícula en el tiempo podrían producir la maduración, colonización y coagregación de patobiontes, disbiosis y una respuesta proinflamatoria exacerbada por parte del hospedero (Silva et al., 2015). La disbiosis, en conjunto con la respuesta inflamatoria consiguiente podrían, eventualmente, reforzarse mutuamente, formando un círculo vicioso (Loos y Van Dyke, 2020).

En la maduración de la biopelícula oral intervienen bacterias colonizadoras tardías, principalmente pertenecientes a los complejos naranja y rojo. Este proceso está caracterizado por la presencia de bacterias anaerobias Gram negativo, destacando especies como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* del complejo naranja, así como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* del complejo rojo (Thanakun et al., 2016). En pacientes con periodontitis, se ha observado un aumento significativo en los niveles de anticuerpos plasmáticos dirigidos contra bacterias periodontales específicas, entre las cuales se encuentran *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *Prevotella intermedia* (Thanakun et al., 2016). Además, otro estudio aporta información relevante al identificar la presencia de otras especies bacterianas en la biopelícula subgingival de pacientes con periodontitis, tales como *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas endodontalis* (Abusleme et al., 2021). Estos datos enfatizan la complejidad y diversidad de la microbiota asociada a la periodontitis.

*P. gingivalis* es un bacilo anaeróbico inmóvil Gram negativo, considerado un patobionte clave en la enfermedad periodontal (Al Batran et al., 2014). Esta

bacteria presenta una alta prevalencia y abundancia en los sacos periodontales de individuos con periodontitis. En un estudio de corte transversal en Chile, se detectó *P. gingivalis* en un 73,3% de los sacos periodontales en individuos con periodontitis crónica, así como se identificó en un 100% de los sujetos con la enfermedad en su forma severa (Rojas et al., 2017). Este patobionte juega un papel importante en la patogenia de la periodontitis, debido a que produce un cambio en la composición de la microbiota comensal (Eriksson et al., 2016) y desencadena una respuesta inmunoinflamatoria, tanto local como sistémica.

*P. gingivalis* posee componentes dentro de su estructura que dan su capacidad de virulencia, tales como las fimbrias, lipopolisacáridos (LPS) y las gingipaínas. Las fimbrias permiten que *P. gingivalis* se una específicamente a las células eucariotas y otras especies de bacterias, y le permiten la formación de biopelículas y la invasión celular (Mei et al., 2020). Tanto los LPS como las gingipaínas se encuentran en la membrana externa de *P. gingivalis*. Mientras que los LPS son capaces de generar una respuesta inmunológica y la liberación de citoquinas proinflamatorias (a niveles local y sistémico) (Huang et al., 2021), las gingipaínas, por su parte, constituyen mediadores de virulencia importantes que participan en el desarrollo de la biopelícula, la colonización bacteriana y la evasión de la defensa inmunitaria (Mei et al., 2020).

La liberación de citoquinas inducidas por *P. gingivalis* en el saco periodontal (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>) (Thanakun et al., 2016), está asociada a la inflamación y destrucción periodontal a largo plazo (Huang et al., 2021). Por otra parte, luego de procedimientos dentales, de higiene o masticación, tanto los mediadores inflamatorios como los productos bacterianos podrían eventualmente ingresar a la circulación sistémica desde el epitelio ulcerado, y viajar a través de los vasos sanguíneos y linfáticos para establecerse en órganos a distancia (Torrunguang et al., 2019; Carrion et al., 2012). De este modo, existe evidencia que *P. gingivalis* podría estar asociada con la presencia y progresión de enfermedades sistémicas al elevar los niveles de biomarcadores inflamatorios y perpetuar un estado inflamatorio a nivel general (Machado et al., 2021; Mei et al.,

2020; Thanakun et al., 2016; Torrungruang et al., 2019). Además, mediante la deglución de saliva, *P. gingivalis* y otras bacterias periodontales podrían ser capaces de migrar hacia sitios orofaríngeos u orodigestivos y colonizar ectópicamente el intestino, causando una reacción inflamatoria (Machado et al., 2021).

### **2.3. Asociación entre *P. gingivalis* y enfermedades sistémicas inflamatorias.**

La periodontitis y *P. gingivalis*, en particular, se han interrelacionado con múltiples enfermedades a distancia. Es así como algunos reportes han observado que *P. gingivalis* produce una exacerbación de la inflamación local y sistémica asociada con la artritis reumatoide, y podría desempeñar un papel en la progresión de esta enfermedad mediante la liberación de citoquinas inflamatorias y anticuerpos autorreactivos (Mulhall et al., 2020).

La evidencia señala, además, que la periodontitis eleva significativamente el riesgo de trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer. Se ha identificado que existe presencia de ADN de *P. gingivalis*, LPS y gingipaínas en el tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Las células infectadas con *P. gingivalis* liberan un conjunto de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, las cuales podrían alcanzar el sistema nervioso central mediante fenestraciones capilares o mediante la regulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Además, la inflamación sistémica podría aumentar el riesgo de inicio y progreso de la enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo (Mulhall et al., 2020).

Por otra parte, se ha visto que existe una relación bidireccional entre la periodontitis y enfermedades metabólicas, como la diabetes mellitus, de modo que la periodontitis podría ser un factor que incida en el estado de compensación y la progresión de la diabetes. Estudios en modelos animales han confirmado que *P. gingivalis* y sus factores de virulencia podrían inducir la resistencia a la insulina en ratones. Esto se produce por el aumento de citoquinas proinflamatorias y marcadores inflamatorios, tales como CRP e IL-6 (Mulhall et al., 2020).



La periodontitis y la infección crónica con *P. gingivalis* se han identificado como un posible factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, lesiones ateroscleróticas y disfunción endotelial. Esto ocurre debido a la activación de receptores en la membrana endotelial, inducida por mediadores de inflamación sistémica (como CRP, IL-6 y TNF- $\alpha$ ), además de la regulación positiva de la expresión de moléculas de adhesión celular (Viafara-García et al., 2019). El tratamiento periodontal, por su parte, ha demostrado mejorías en la función endotelial y reducción de los biomarcadores inflamatorios asociados a enfermedad aterosclerótica (CRP, IL-6, TNF- $\alpha$ , fibrinógeno y triglicéridos) (Mei et al., 2020); mientras que estudios en modelos murinos evidenciaron que *P. gingivalis* podría inducir una respuesta hipertensiva vía angiotensina II (Czesnikiewicz-Guzik et al., 2019).

#### **2.4. Inflamación sistémica de bajo grado y proteína C reactiva (CRP)**

La inflamación sistémica de bajo grado representa un concepto más bien reciente, que se reconoce como un factor de riesgo para una serie de enfermedades no transmisibles, entre las cuales se encuentran la diabetes, enfermedades cardiovasculares, patologías neurodegenerativas y cáncer (Cecoro et al., 2020). La inflamación sistémica de bajo grado se produce por un estado inflamatorio prolongado, que da como resultado alteraciones en la médula ósea y patrones sanguíneos característicos, en donde las células madre hematopoyéticas experimentan una diferenciación adaptada a la inflamación, que genera leucocitos hiperreactivos (neutrófilos y monocitos/macrófagos). Estas células hiperreactivas son capaces de migrar a través de la circulación general, exacerbar las reacciones inflamatorias en los tejidos periféricos y, eventualmente, contribuir a posibles enfermedades infecciosas e inflamatorias en curso (Machado et al., 2021).

La inflamación sistémica de bajo grado se caracteriza por la producción sistémica crónica y en niveles reducidos de factores inflamatorios, tales como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> y CRP, uno de sus marcadores más característicos (Cecoro et al., 2020). La CRP es una proteína plasmática producida por los hepatocitos ante la presencia de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , como parte de la respuesta de fase aguda

hepática (Podzimek et al., 2015). En presencia de calcio, la CRP se une específicamente a los LPS presentes en la superficie celular bacteriana, activa la vía clásica del complemento y prepara los ligandos para la fagocitosis. CRP contribuye también a dirigir y amplificar la respuesta inflamatoria local subsiguiente a la infección, trauma y necrosis, jugando un papel clave en la defensa del hospedero contra la infección (Bansal et al., 2014).

La determinación de la CRP de alta sensibilidad (hsCRP) se ha asociado a la capacidad para predecir futuros eventos vasculares como síndromes coronarios agudos, infarto al miocardio, accidente vascular encefálico, enfermedad arterial periférica y muerte cardíaca súbita en individuos aparentemente sanos, y representa el único marcador validado de riesgo cardiovascular (Gomes-Filho et al., 2011). Un valor menor a 1 mg/L representa un riesgo bajo, un valor entre 1 y 3 mg/L constituye un riesgo cardiovascular medio, mientras que valores mayores a 3 mg/L se asocian a un riesgo cardiovascular alto (Machado et al., 2021). Los niveles de hsCRP también pueden variar con el tabaquismo, obesidad, triglicéridos, diabetes y enfermedad periodontal, entre otros (Podzimek et al., 2015; Bansal et al., 2014).

## **2.5. Asociación entre CRP y periodontitis**

Existe evidencia sólida que respalda una relación confirmada entre enfermedad periodontal y los niveles séricos de CRP. En efecto, los pacientes con periodontitis presentan niveles más altos de CRP en suero que los pacientes en estado de salud periodontal (Cecoro et al., 2020; Chang et al., 2020), mientras que los niveles séricos de hsCRP se han correlacionado positivamente con un aumento en la profundidad al sondaje (Sezgin et al., 2019) y formas más agresivas de la enfermedad, donde podría presentarse una mayor carga inflamatoria (Machado et al., 2021).

Lo anterior podría explicarse debido a la liberación local o sistémica de mediadores proinflamatorios en periodontitis (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ), los que presentan la capacidad de estimular en los hepatocitos la producción de CRP

(Machado et al., 2021; Bansal et al., 2014). Por lo tanto, mientras que la periodontitis podría inducir un aumento en la inflamación sistémica de bajo grado (Cecoro et al., 2020), el tratamiento periodontal podría resultar en una disminución de los marcadores inflamatorios sistémicos y la CRP (Mulhall et al., 2020; Sezgin et al., 2019).

En base a lo anteriormente expuesto, los estudios arrojan una asociación entre periodontitis e inflamación sistémica de bajo grado, evidenciada por un aumento de proteína C reactiva. *P. gingivalis*, por su parte, constituye un patobionte periodontal clave en periodontitis, capaz de generar una respuesta inmunoinflamatoria, tanto local como a distancia. No obstante, hasta la fecha, no existen estudios que exploren la potencial relación entre la carga subgingival de *P. gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado en individuos con periodontitis. En el presente trabajo se planteó el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es la asociación entre la carga subgingival de *Porphyromonas gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado (medida a través de hsCRP) en individuos con periodontitis?

### **3. HIPÓTESIS**

La presencia y carga subgingival de *P. gingivalis* se asocian positivamente con la carga inflamatoria sistémica, determinada a través de hsCRP, en individuos con periodontitis.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la correlación entre la carga subgingival de *P. gingivalis* y los niveles de inflamación sistémica de bajo grado, determinados mediante hsCRP, en individuos con periodontitis.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Determinar la presencia de *P. gingivalis* y su abundancia en la biopelícula subgingival en individuos con periodontitis.
- b. Determinar la carga subgingival de bacterias totales en individuos con periodontitis, establecer su correlación con la carga subgingival de *P. gingivalis* y calcular su proporción en el saco periodontal.
- c. Establecer los niveles séricos de hsCRP y correlacionarlos con la carga subgingival de *P. gingivalis* en individuos con periodontitis.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Diseño

Se realizó un estudio clínico observacional, descriptivo, transversal.

### 6.2. Cálculo muestral

Debido a la ausencia de evidencia previa, se planteó un estudio exploratorio, en el que se efectuó un piloto con 11 participantes.

### 6.3. Selección de la muestra y población de estudio

El diagrama de flujo de reclutamiento y seguimiento se presenta en la **Figura 1**. Se realizó un muestreo por conveniencia entre individuos que consultaron a la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Santiago, entre los años 2021 y 2022. Se incluyeron individuos mayores de 18 años con ausencia de enfermedades sistémicas, presencia de periodontitis etapas II a IV (Papapanou et al., 2018), pérdida del nivel de inserción interdental  $\geq 3$  mm en  $\geq 2$  dientes no adyacentes y presencia de profundidades al sondaje  $\geq 5$  mm en boca.

Se excluyeron a aquellos individuos que presentaban las siguientes condiciones:

- a) Individuos con lesiones apicales endodónticas.
- b) Mujeres embarazadas o en proceso de lactancia.
- c) Obesidad, definida como índice de masa corporal (IMC)  $\geq 30$  kg/ m<sup>2</sup>.
- d) Individuos que hayan estado en tratamiento con antibióticos, antiinflamatorios o inmunomoduladores durante los 3 meses previos al estudio.
- e) Individuos que hayan recibido tratamiento periodontal en el último año.

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Bioseguridad y Comité Ético-Científico de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (**Anexos 1 y 2**). Tanto los objetivos como los procedimientos del estudio fueron

informados a los participantes, quienes firmaron un consentimiento informado (**Anexo 3**). Todos los procedimientos se realizaron en conformidad con las pautas éticas y legislación vigente, siguiendo lo establecido por la declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas posteriores.

#### **6.4. Examen y mediciones clínicas generales**

Se realizó una anamnesis clínica, cuyos datos fueron recolectados en un registro clínico especialmente diseñado para el estudio, que incluía datos generales, edad, sexo, nivel educativo, tabaquismo, alcohol y antecedentes médicos (**Anexo 4**). El IMC se calculó basándose en el peso (kg) dividido por la altura al cuadrado (m<sup>2</sup>). El IMC fue categorizado como normopeso (IMC<25 kg/m<sup>2</sup>) y sobrepeso (25<IMC<30 kg/m<sup>2</sup>).

#### **6.5. Examen bucal y radiográfico**

A todos los participantes se les efectuó un examen clínico periodontal, por una especialista calibrada (PH). A cada individuo se le efectuó un periodontograma de boca completa, mediante un espejo intraoral y una sonda periodontal manual Carolina del Norte (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). Se registró movilidad dentaria y compromiso de furcas; así como profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica e índice dicotómico de sangrado del surco gingival en 6 sitios por diente: mesiovestibular, mediovestibular, disto-vestibular; mesiolingual, mediolingual y distolingual (o palatino).

El índice dicotómico de sangrado del surco se definió como el porcentaje de sitios que sangraban hasta 15 segundos después de introducir una sonda periodontal hasta el fondo del surco gíngivo-dentario. La profundidad al sondaje fue registrada como la distancia en milímetros desde el margen gingival hasta la base del surco gíngivo-dentario, y el nivel de inserción clínica se definió como la distancia en milímetros desde la unión amelo-cementaria hasta la base del surco gíngivo-dentario.

Posteriormente, los voluntarios fueron examinados con una sonda de caries para determinar el índice COPD (dientes cariados, obturados y perdidos). Adicionalmente, se solicitó un set de radiografías retroalveolares periapicales totales a cada uno de los participantes del estudio, con el fin de identificar la presencia de reabsorción ósea marginal y descartar la existencia de lesiones periapicales.

### **6.6. Muestras sanguíneas y microbiológicas**

Se obtuvieron muestras sanguíneas y microbiológicas de todos los participantes del estudio, mediante estricta asepsia. Se recolectó sangre en ayunas mediante venopunción de la vena antecubital en tubos Vacutainer®. Se obtuvo el suero sanguíneo mediante centrifugación para el análisis de hsCRP. La hsCRP se cuantificó mediante el método turbidimétrico estandarizado en el Laboratorio Clínico del Hospital Clínico Universidad de Chile, y se utilizó como resultado de la inflamación sistémica (Craig et al., 2003).

Además, se recolectaron muestras de biopelícula subgingival del sitio dentario con la mayor profundidad al sondaje de cada cuadrante de la boca, empleando curetas estériles mini-Gracey y realizando un pool por individuo (Abusleme et al., 2013). Las muestras fueron transferidas a un medio de transporte (Tris-EDTA) y almacenadas a -80°C o transportadas en hielo seco al Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Las muestras de biopelícula subgingival se homogeneizaron en un tampón de lisis con lisozima 20 mg/mL a 37°C durante 30 minutos y proteinasa K toda la noche a 56°C. Se extrajo el ADN usando un kit comercial DNEasy (QIAGEN inc., Valencia, CA, USA) para obtener ADN bacteriano, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Diaz et al., 2012). La concentración y la calidad del ADN se confirmaron mediante la relación 260:280 en un espectrofotómetro (Bio-Tek, Winooski, VT) (Diaz et al., 2012).

Con el objetivo de determinar las cargas bacterianas subgingivales y frecuencias de detección de bacterias totales y *P. gingivalis*, se llevó a cabo una reacción de polimerasa en cadena cuantitativa (qPCR). Los sets de partidores se muestran en la **Tabla 1**. Las bacterias totales se cuantificaron usando partidores específicos dirigidos al gen de ARN ribosómico (ARNr) 16S publicado previamente (Nadkarni et al., 2002). *P. gingivalis* se identificó mediante el uso de partidores contra la región variable del gen 16S ARNr, previamente validados (Byrne et al., 2009). El conjunto de partidores para apuntar a *P. gingivalis* incluía ARNr 16S de la base 729 a 1192 (GenBank: L16492.1).

**Tabla 1: Partidores utilizados para determinar la carga bacteriana total y de *P. gingivalis* (Bordagaray et al., 2021).**

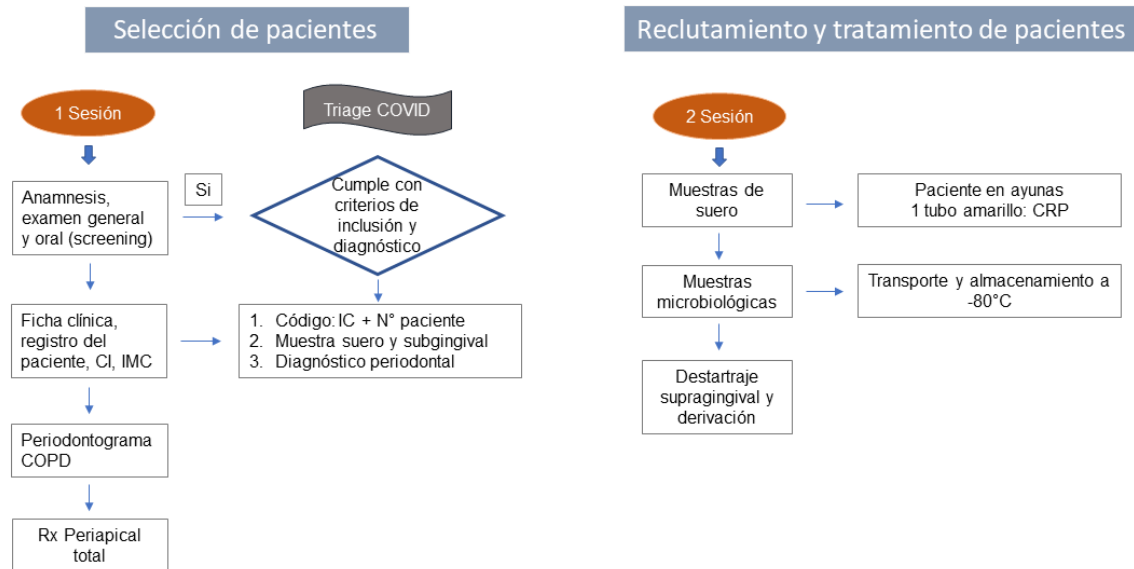
Bacteria objetivo	Gen objetivo	Partidor directo	Partidor inverso
Bacterias totales	16S rRNA	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
<i>P. gingivalis</i>	16S rRNA	AGGCAGCTTGCCATACTGCG	ACTGTTAGTAACTACCGATGT

Para la obtención de cada qPCR se empleó KAPA SYBR® Fast qPCR Kits (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EE. UU.). En cada experimento se incluyeron controles positivos que consistieron en ADN de *P. gingivalis* ATCC 33277 y un control negativo (sin ADN). La amplificación del ADN para las bacterias totales consistió en 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 3 min, una amplificación a 95°C durante 15 s y una elongación a 60°C por 1 min; mientras que para *P. gingivalis*, el procedimiento consistió en 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 3 min, una amplificación a 95°C durante 1 s y una elongación a 58°C por 1 min.

Las cuantificaciones absolutas de las cargas bacterianas totales y de *P. gingivalis* se llevaron a cabo comparando los valores del ciclo umbral (Dorn et al., 2002) de las muestras con curvas estándar de números de copias del gen 16S ARN ribosomal (ARNr) conocidas de *P. gingivalis*. Todos los experimentos se realizaron



con un rango de detección cuantitativa lineal. Las cargas bacterianas se expresaron en número de copias del gen 16S ARNr / $\mu$ l.



**Figura 1: Flujograma de selección y reclutamiento de los participantes.** *CI: Consentimiento informado, IMC: Índice de Masa Corporal, IC: Código asignado a los participantes del estudio, N° paciente: Número asignado a cada individuo del estudio, COPD: Dientes con caries/obturados/perdidos, Rx: Radiografía, CRP: Proteína C Reactiva.*

## 6.7. Análisis estadístico

La detección de *P. gingivalis* se expresó como frecuencia (cualitativa, dicotómica). La carga de bacterias totales y de *P. gingivalis* se expresaron en número de copias del gen 16S ARNr / $\mu$ l, mientras que hsCRP sérica se expresó como concentración en mg/L (cuantitativa). La distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para asociar la presencia de *P. gingivalis* con carga bacteriana total subgingival y concentración sérica de hsCRP se utilizó la correlación de Spearman, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico STATA v16.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Características demográficas, clínicas y séricas de los participantes.

Se incluyeron un total de 11 individuos con periodontitis en etapas II, III o IV y con presencia de profundidades al sondaje  $\geq 5$  mm en la boca. En la **Tabla 2** se observa la distribución de la enfermedad de acuerdo con la clasificación del Workshop (Papapanou et al., 2018). La mayoría de los individuos presentaron periodontitis etapa III, mientras que un participante presentó periodontitis etapa II y uno fue diagnosticado como etapa IV.

**Tabla 2: Severidad de la periodontitis en los participantes del estudio**

<i>Severidad de la periodontitis</i>	<i>Frecuencia</i>
<i>Etapa II</i>	1
<i>Etapa III</i>	9
<i>Etapa IV</i>	1

Los datos demográficos se presentan en la **Tabla 3**. El promedio  $\pm$  desviación estándar (DE) de la edad fue de  $37,8 \pm 9,8$  años. El 27,7% de los participantes eran de género femenino, con una mediana de nivel educacional “superior completa”.

Con relación a los factores de riesgo sistémicos y cardiovasculares, la muestra estuvo compuesta por un 45,5% de fumadores, con una mediana [rango intercuartílico (RIC)] de IMC de  $27,9 (6,0)$  kg/m<sup>2</sup> y un promedio  $\pm$  DE de  $3,3 \pm 6,3$  gr/día de consumo de alcohol. Con respecto a la presión arterial, solo un individuo presentó un valor mayor a 140/90 mm de Hg, mientras que 6 individuos presentaron dislipidemia en los exámenes séricos.

Ante la evaluación intraoral, el COPD promedio  $\pm$  DE fue  $6,5 \pm 6,1$ , con un índice de sangrado al sondaje de  $69,8\% \pm 13,0\%$ , una profundidad al sondaje expresada

como mediana (RIC) de 2,6 (0,6) mm y un promedio  $\pm$  DE pérdida de inserción clínica de  $2,1 \pm 2,0$  mm.

**Tabla 3. Datos demográficos, clínicos y séricos de los participantes del estudio.**

<b>Parámetros</b>	<b>Periodontitis n=11</b>
<i>Edad (años, promedio <math>\pm</math> DE)</i>	37,8 $\pm$ 9,8
<i>Género [(femenino, (%))]</i>	3 (27,7%)
<i>Nivel educacional (mediana, RIC)</i>	3 (1)
<i>Tabaquismo [N, (%)]</i>	5 (45,5%)
<i>Alcohol [gr/día, promedio (<math>\pm</math> DE)]</i>	3,3 $\pm$ 6,3
<i>IMC [kg/m<sup>2</sup>, mediana (RIC)]</i>	27,9 (6,0)
<i>HTA [N, (%)]</i>	1 (9,1%)
<i>PA diastólica [mm de Hg, promedio (<math>\pm</math> DE)]</i>	76,9 $\pm$ 13,4
<i>PA sistólica [(mm de Hg, promedio (<math>\pm</math> DE)]</i>	122,3 $\pm$ 20,9
<i>Dislipidemia [N, (%)]</i>	6 (54,6%)
<i>Colesterol total (mg/dL, promedio <math>\pm</math> DE)</i>	175,1 $\pm$ 50,8
<i>Colesterol HDL (mg/dL, promedio <math>\pm</math> DE)</i>	40,8 $\pm$ 7,1
<i>Colesterol LDL [mg/dL, mediana (RIC)]</i>	103,8 (52,5)
<i>Triglicéridos (mg/dL, promedio <math>\pm</math> DE)</i>	155,5 $\pm$ 133,0
<i>COPD (promedio <math>\pm</math> DE)</i>	6,5 $\pm$ 6,1
<i>SS (promedio <math>\pm</math> DE)</i>	69,8 $\pm$ 13,0
<i>PS [mm, mediana, RIC]</i>	2,6 (0,6)
<i>NIC (mm, promedio <math>\pm</math> DE)</i>	2,1 $\pm$ 2,0

*DE: Desviación Estándar, N: Frecuencia absoluta, %: Frecuencia Relativa, RI: Recorrido intercuartílico, HTA: Hipertensión Arterial, PA: Presión Arterial, IMC: Índice de Masa Corporal, SS: índice de Sangrado al Sondaje, PS: Profundidad al sondaje, NIC: Promedio del Nivel de Inserción Clínica, COPD: Dientes con caries/obturados/perdidos, HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad, LDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad.*

## 7.2. Detección y cargas subgingivales de *P. gingivalis* y de bacterias totales en individuos con periodontitis.

La detección de *P. gingivalis* y de bacterias totales en la biopelícula subgingival en los individuos del estudio (periodontitis) se presentan en las **Tablas 4 y 5**, respectivamente. Como era esperable, la detección de bacterias totales fue positiva en todos los individuos con periodontitis (100%), mientras que *P. gingivalis* se identificó en 6 de los 11 individuos del estudio (54,5%).

**Tabla 4: Detección subgingival de bacterias totales y de *P. gingivalis* en individuos con periodontitis.**

<i>Periodontitis (N=11)</i>		
<i>Detección</i>	<i>Bacterias totales</i>	<i>P. gingivalis</i>
<b>Positivo</b>	11	6
<b>Negativo</b>	0	5

*P. gingivalis*: *Porphyromonas gingivalis*.

La carga subgingival de bacterias totales y de *P. gingivalis* se presenta en la **Tabla 5**. La carga subgingival de bacterias totales presentó un promedio  $\pm$  DE de  $1,4 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$  número de copias del gen 16S ARNr / $\mu$ l, mientras que la carga expresada en términos de mediana (RIC) de *P. gingivalis* fue de  $9,2 \times 10^4$  ( $2,5 \times 10^6$ ) número de copias del gen 16S ARNr / $\mu$ l. En la misma tabla se observa una concentración de hsCRP expresada como mediana (RIC) de 1,1 (3,1) mg/L.

**Tabla 5: Carga subgingival de bacterias totales, carga subgingival de *P. gingivalis* y concentración de hsCRP sérica, en individuos con periodontitis.**

<i>Parámetro</i>	<i>Periodontitis (N=11)</i>
<i>Carga subgingival total de bacterias (número de copias del gen 16S ARNr /<math>\mu</math>l, promedio <math>\pm</math> DS)</i>	$1,4 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$
<i>Carga subgingival de <i>P. gingivalis</i> [número de copias del gen 16S ARNr /<math>\mu</math>l, mediana (RIC)]</i>	$9,2 \times 10^4$ ( $2,5 \times 10^6$ )
<i>Concentración sérica de hsCRP [mg/L, mediana (RIC)]</i>	1,1 (3,1)

*hsCRP*: Proteína C Reactiva de alta sensibilidad. *P. gingivalis*: Porphyromonas gingivalis. *DS*: Desviación Estándar, *RIC*: Recorrido intercuartílico.

En la **Tabla 6**, se observa el porcentaje de *P. gingivalis* en la biopelícula subgingival de cada participante del estudio. El porcentaje expresado en mediana (RIC) fue de 0,4% (7,2).

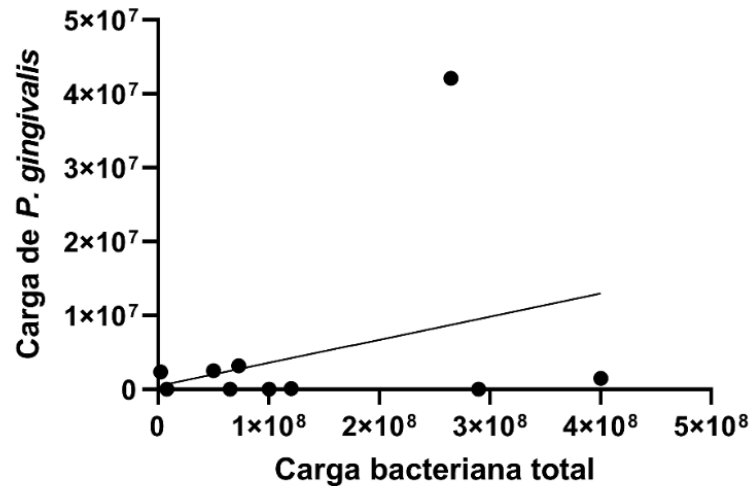
**Tabla 6: Proporción entre la carga subgingival de *P. gingivalis* en la biopelícula subgingival.**

<i>Individuo</i>	<i>Porcentaje de P. gingivalis en la biopelícula subgingival</i>
<i>IC1</i>	7,6%
<i>IC2</i>	4,3%
<i>IC3</i>	0%
<i>IC4</i>	0%
<i>IC5</i>	5%
<i>IC6</i>	100%
<i>IC7</i>	0,4%
<i>IC8</i>	16,1%
<i>IC9</i>	0%
<i>IC10</i>	0%
<i>IC11</i>	0%

*IC*: Código asignado a los participantes del estudio

### **7.3. Correlación entre la carga subgingival de bacterias totales y carga subgingival de *P. gingivalis* en periodontitis.**

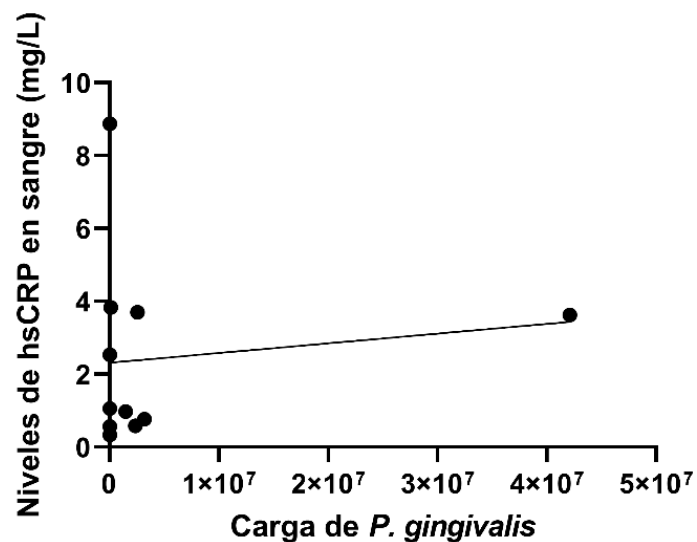
Con el objetivo de evaluar si existe una correlación entre la carga subgingival de *P. gingivalis* con la carga subgingival de bacterias totales, se realizó una prueba de correlación de Spearman. Tal como se observa en la **Figura 2**, se encontró una correlación positiva entre la carga subgingival de bacterias totales y la carga subgingival de *P. gingivalis*, ( $Rho=1$ ;  $p=0,0000$ ).



**Figura 2: Correlación entre la carga subgingival de bacterias totales y carga subgingival de *P. gingivalis* en periodontitis. *P. gingivalis*: *Porphyromonas gingivalis*. Rho=1; p=0,0000.**

#### **7.4. Correlación entre los niveles de hsCRP sérica con la carga subgingival de *P. gingivalis* en periodontitis.**

No se encontró correlación entre la carga subgingival de *P. gingivalis* y los niveles séricos de hsCRP, tal como se aprecia en la **Figura 3** (Rho=0,1; p=0,7).



**Figura 3: Correlación entre los niveles de hsCRP sérica y la carga subgingival de *P. gingivalis* en periodontitis. *P. gingivalis*: *Porphyromonas gingivalis*. hsCRP: Proteína C reactiva de alta sensibilidad.  $Rho=0,1$ ;  $p=0,7$ .**

## 8. DISCUSIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, asociada a una biopelícula bacteriana disbiótica, y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte del diente (Papapanou et al., 2018). Uno de los patobiontes claves en esta enfermedad, pertenecientes al complejo rojo de Socransky, es *P. gingivalis* (Al Batran et al., 2014; Thanakun et al., 2016). Esta bacteria es un bacilo Gram negativo anaeróbico estricto e inmóvil (Al Batran et al., 2014), capaz de desencadenar una respuesta inmunoinflamatoria, tanto local como sistémica (Carrion et al., 2012). De este modo, un estado de inflamación sistémica de bajo grado, evaluado a través de la proteína C reactiva, podría reportar asociaciones con la carga subgingival de *P. gingivalis*. En el presente estudio se determinó, por primera vez, la asociación entre la carga subgingival de *P. gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado, medida por hsCRP.

### 8.1. Presencia de *P. gingivalis* en individuos con periodontitis

En el presente estudio, se realizó un muestreo de biopelícula subgingival para determinar la detección y carga de bacterias totales y de *P. gingivalis* mediante qPCR. *P. gingivalis* se detectó en un 54,5% de los participantes del estudio. Previamente la prevalencia de *P. gingivalis* se ha reportado en un rango entre 82-92% en individuos con periodontitis, lo cual demuestra una alta prevalencia de este patobionte en los sacos periodontales (Belibasakis et al., 2014; Checchi y Pascolo, 2018; Rojas et al., 2017; Yong et al., 2015). En Chile, la prevalencia de *P. gingivalis* se encontró entre 73 a un 100% de los individuos con periodontitis, dependiendo de la severidad de la enfermedad (Gajardo et al., 2005; Rojas et al., 2017), con un rango similar a lo observado en otros países (Belibasakis et al., 2014; Checchi y Pascolo, 2018; Yong et al., 2015).

La discrepancia del presente estudio en relación con algunos reportes previos podría explicarse, en parte, por la técnica de muestreo microbiológico subgingival utilizado. En nuestro trabajo, la muestra de biopelícula subgingival fue obtenida mediante curetas mini-Gracey, mientras que otros estudios utilizaron conos de



papel para el mismo propósito (Checchi y Pascolo, 2018; Gajardo et al., 2005; Rojas et al., 2017; Yong et al., 2015). A pesar de que existen autores que demuestran concordancia en la detección de *P. gingivalis* al utilizar ambos métodos de muestreo (Belibasakis et al., 2014; Jervøe-Storm et al., 2007), un estudio reportó una carga significativamente mayor en la extracción de muestras de biopelícula subgingival con conos de papel en comparación con el uso de curetas periodontales (Belibasakis et al., 2014). Esto podría deberse a que los conos de papel absorben una mayor cantidad de fluido crevicular, el cual presenta bacterias planctónicas (Belibasakis et al., 2014). *P. gingivalis*, en particular, podría encontrarse en mayor proporción en el fluido crevicular, ya que es un colonizador tardío (Kolenbrander, 2000) y se desprende más fácilmente de la biopelícula (Loomer, 2004).

## **8.2. Carga subgingival de bacterias totales y de *P. gingivalis***

La carga subgingival de bacterias totales y de *P. gingivalis* se expresaron en número de copias del gen 16S ARNr / $\mu$ l. En el presente trabajo, la carga bacteriana total fue de un promedio  $\pm$  DE de  $1,4 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$ , lo que se condice con un reporte anterior, que determinó una carga de  $1,4 \times 10^8$  de bacterias totales (Checchi y Pascolo, 2018). La carga subgingival de *P. gingivalis* obtenida en este estudio fue de  $9,2 \times 10^4$  ( $2,5 \times 10^6$ ) copias del gen 16S ARNr / $\mu$ l [mediana (RIC)], menor que en otras investigaciones previas ( $2 \times 10^5$  -  $7,2 \times 10^6$ ) (Checchi y Pascolo, 2018; Yong et al., 2015).

Una de las posibles explicaciones de los resultados obtenidos podría ser la profundidad al sondaje que presentaron los voluntarios en el presente estudio [mediana (RIC)=2,6 (0,6) mm.], además de la extensión de los sacos periodontales profundos. Si bien los criterios de inclusión consideraban profundidades al sondaje  $\geq 5$  mm en todos los participantes, en algunos de ellos los sacos profundos se encontraban distribuidos de forma localizada. En investigaciones anteriores, se observó una asociación directa entre la profundidad al sondaje y la carga subgingival de *P. gingivalis* (Chigasaki et al., 2021; Gambin et al., 2021). Esto se debe a que a mayor profundidad al sondaje, la tensión de oxígeno disminuye, lo

cual podría favorecer la proliferación de bacterias anaerobias estrictas, como *P. gingivalis* (How et al., 2016). Además, la ausencia de barreras mecánicas como la lengua, las mejillas y el flujo salival crea un ambiente propicio para el crecimiento de este patobionte en el surco gingival. Asimismo, los factores de virulencia, tales como las fimbrias, LPS y gingipaínas juegan un papel importante al facilitar la colonización, permanencia y crecimiento de *P. gingivalis* dentro del surco gingival (Orrego-Cardozo et al., 2015).

### **8.3. Asociación entre carga subgingival de *P. gingivalis* y Proteína C reactiva de alta sensibilidad.**

Hasta la fecha, no hay evidencia que correlacione la carga de *P. gingivalis* con los niveles séricos de hsCRP mediante estudios clínicos. Sin embargo, se ha reportado una asociación entre periodontitis y niveles de CRP en sangre (Cecoro et al., 2020; Chang et al., 2020). CRP es una proteína de fase aguda que se ha establecido como un marcador validado para evaluar la inflamación aguda y la inflamación sistémica de bajo grado (<10 mg/L) (Podzimek et al., 2015). Niveles elevados de CRP han sido detectados en varias enfermedades sistémicas no transmisibles (Herrera et al., 2020), además de ser un marcador validado de riesgo cardiovascular, que contribuye a predecir futuros eventos vasculares (Gomes-Filho et al., 2011).

De este modo, diversos estudios que comparten criterios de inclusión y exclusión similares reportan mayores niveles séricos de CRP en individuos con periodontitis en comparación con individuos sanos. Estos estudios presentan variaciones en un rango promedio de 0,5-4,1 mg/L en individuos con periodontitis (Botelho et al., 2021; Isola et al., 2019; Morozumi et al., 2018), en concordancia con los resultados de nuestro estudio [mediana (RIC)=1,1 (3,1)]. Más aún, la asociación entre CRP y periodontitis está avalada por estudios mecanísticos. De este modo, la terapia periodontal reduce significativamente los niveles de CRP séricos (Lobão et al., 2019; Shah et al., 2023) en individuos con periodontitis.

Si bien en este estudio los niveles de CRP no se correlacionaron con la carga subgingival de *P. gingivalis*, la literatura ha establecido una correlación directa entre los niveles séricos de hsCRP y la presencia de profundidades al sondaje mayores o iguales a 5 mm en individuos sin enfermedades sistémicas (Chang et al., 2020). Además, se encontró una asociación positiva entre la profundidad al sondaje, supuración y compromiso de furca con los niveles de hsCRP séricos (Shah et al., 2023). Un estudio determinó que la profundidad al sondaje, pérdida de hueso alveolar y el NIC, se asociaron positivamente con los títulos de anticuerpos anti *P. gingivalis*; sin embargo estos últimos no se asociaron con los niveles de hsCRP en sangre (Miyashita et al., 2012). Adicionalmente, estudios anteriores de nuestro grupo encontraron un aumento significativo de CRP en el fluido crevicular y una correlación positiva con sus niveles séricos en individuos con periodontitis en comparación con los sujetos controles (Da Venezia et al., 2021).

#### **8.4. Fortalezas, debilidades y proyecciones**

Este es el primer estudio que explora la asociación entre la carga de *P. gingivalis* e inflamación sistémica de bajo grado, determinada a través de los niveles de hsCRP sérica, en pacientes sin enfermedades sistémicas y con presencia de periodontitis. Mecanismos de translocación bacteriana, así como la inducción local y sistémica de citoquinas pro-inflamatorias por parte de *P. gingivalis*, podrían sugerir una posible relación entre esta bacteria y el desarrollo de enfermedades sistémicas no transmisibles (Machado et al., 2021; Mei et al., 2020; Thanakun et al., 2016; Torrungruang et al., 2019), relevante para continuar siendo explorada. Si bien *P. gingivalis* se ha asociado a una mayor severidad de la periodontitis en la literatura (Belibasakis et al., 2014; Checchi y Pascolo, 2018; Rojas et al., 2017; Yong et al., 2015), en nuestro estudio la carga subgingival de *P. gingivalis* no se asoció directamente con la inflamación sistémica de bajo grado, lo cual podría implicar a otros factores involucrados en este proceso, como el número de sujetos en el grupo estudiado, entre algunos.

Cabe mencionar que este estudio piloto es parte de un estudio multicéntrico internacional, con un mayor tamaño muestral, mayor diversidad demográfica, mayor cantidad de grupos de estudio y con presencia de un grupo control. Los resultados presentes y futuros de este proyecto podrían contribuir al desarrollo de futuras investigaciones referentes a *P. gingivalis* y otros patobiontes capaces de causar inflamación local y/o a distancia, así como a una mayor comprensión de la potencial relación entre periodontitis y otras enfermedades crónicas no transmisibles, de alta morbimortalidad a nivel global.

## 9. CONCLUSIONES

En relación con los resultados obtenidos en el presente estudio, se pueden desprender las siguientes conclusiones:

- a) *P. gingivalis* se detectó en el 54,5% de las muestras subgingivales de los individuos con periodontitis.
  
- b) Existe una correlación positiva entre la carga subgingival de bacterias totales y la carga subgingival de *P. gingivalis* en individuos con periodontitis.
  
- c) No se encontró una correlación entre carga subgingival de *P. gingivalis* y la inflamación sistémica de bajo grado, medida por hsCRP, en individuos con periodontitis.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA y cols. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*, 7(5), 1016-1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
- Abusleme L, Hoare A, Hong B y Diaz P. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. In *Periodontology 2000* (Vol. 86, Issue 1). doi: 10.1111/prd.12362
- Al Batran R, Al-Bayaty F, Al-Obaidi MMJ, Hussain SF y Mulok TZ. (2014). Evaluation of the Effect of Andrographolide on Atherosclerotic Rabbits Induced by *Porphyromonas gingivalis*. *BioMed Research International*, 2014, e724718. <https://doi.org/10.1155/2014/724718>
- Alvarez C, Monasterio G, Cavalla F, Córdova LA, Hernández M y cols. (2019). Osteoimmunology of Oral and Maxillofacial Diseases: Translational Applications Based on Biological Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 10, 1664. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01664>
- Belibasakis GN, Schmidlin PR y Sahrman, P. (2014). Molecular microbiological evaluation of subgingival biofilm sampling by paper point and curette. *APMIS*, 122(4), 347-352. <https://doi.org/10.1111/apm.12151>
- Bosshardt, D. D. (2018). The periodontal pocket: Pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontology 2000*, 76(1), 43-50. <https://doi.org/10.1111/prd.12153>
- Bordagaray M, Fernández A, Garrido M, Astorga J, Hoare y cols. (2021). Systemic and Extraradicular Bacterial Translocation in Apical Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fcimb.2021.649925
- Botelho J, Machado V, Leira Y, Proença L y Mendes JJ. (2021). Periodontal Inflamed Surface Area Mediates the Link between Homocysteine and Blood Pressure. *Biomolecules*, 11(6), 875. <https://doi.org/10.3390/biom11060875>
- Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B y cols. (2009). Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque.

- Oral Microbiology and Immunology*, 24(6), 469-477.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00544.x>
- Carrion J, Scisci E, Miles B, Sabino GJ, Zeituni AE y cols. (2012). Microbial Carriage State of Peripheral Blood Dendritic Cells (DCs) in Chronic Periodontitis Influences DC Differentiation, Atherogenic Potential. *The Journal of Immunology*, 189(6), 3178-3187.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201053>
- Cecoro G, Annunziata M, Iuorio MT, Nastri L y Guida L. (2020). Periodontitis, Low-Grade Inflammation and Systemic Health: A Scoping Review. *Medicina*, 56(6), 272. <https://doi.org/10.3390/medicina56060272>
- Chang YQ, Fang FF, Qin SS, Dong YC y Chen B. (2020). [Effect of scaling and root planing on serum C-reactive protein levels in patients with moderate to severe chronic periodontitis: A systematic review and Meta-analysis]. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China journal of stomatology*, 38(4), 385-392. <https://doi.org/10.7518/hxkq.2020.04.006>
- Checchi V y Pascolo G. (2018). Microbiological Response to Periodontal Therapy: A Retrospective Study. *The Open Dentistry Journal*, 12, 837-845.  
<https://doi.org/10.2174/1874210601812010837>
- Chigasaki O, Aoyama N, Sasaki Y, Takeuchi Y, Mizutani K y cols. (2021). Porphyromonas gingivalis, the most influential pathogen in red-complex bacteria: A cross-sectional study on the relationship between bacterial count and clinical periodontal status in Japan. *Journal of Periodontology*, 92(12), 1719-1729. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0011>
- Craig RG, Yip JK, So MK, Boylan RJ, Socransky SS y cols. (2003). Relationship of Destructive Periodontal Disease to the Acute-Phase Response. *Journal of Periodontology*, 74(7), 1007-1016.  
<https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.7.1007>
- Czesnikiewicz-Guzik M, Nosalski R, Mikołajczyk TP, Vidler F, Dohnal T y cols. (2019). Th1-type immune responses to Porphyromonas gingivalis antigens exacerbate angiotensin II-dependent hypertension and vascular dysfunction. *British Journal of Pharmacology*, 176(12), 1922-1931.  
<https://doi.org/10.1111/bph.14536>

- Da Venezia C, Hussein N, Hernández M, Contreras J, Morales A y cols. (2021). Assessment of Cardiovascular Risk in Women with Periodontal Diseases According to C-reactive Protein Levels. *Biomolecules*, 11(8), 1238. <https://doi.org/10.3390/biom11081238>
- Diaz P, Dupuy A, Abusleme L, Reese B, Obergfell C y cols. (2012). Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Molecular Oral Microbiology*, 27(3). doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00642.x
- Dorn BR, Harris LJ, Wujick CT, Vertucci FJ y Progulsk-Fox, A. (2002). Invasion of vascular cells in vitro by *Porphyromonas endodontalis*. *International Endodontic Journal*, 35(4), 366-371. <https://doi.org/10.1046/j.0143-2885.2001.00489.x>
- Eriksson K, Lönnblom E, Tour G, Kats A, Mydel P y cols. (2016). Effects by periodontitis on pristane-induced arthritis in rats. *Journal of Translational Medicine*, 14, 311. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1067-6>
- Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B y cols. (2005). Prevalence of Periodontopathic Bacteria in Aggressive Periodontitis Patients in a Chilean Population. *Journal of Periodontology*, 76(2), 289-294. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.2.289>
- Gambin DJ, Vitali FC, De Carli JP, Mazzon RR, Gomes BPF y cols. (2021). Prevalence of red and orange microbial complexes in endodontic-periodontal lesions: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 25(12), 6533-6546. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04164-4>
- Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I y cols. (2010). Clinical Attachment Loss in Chilean Adult Population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of Periodontology*, 81(10), 1403-1410. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100148>
- Garlet GP. (2010). Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89(12), 1349-1363. <https://doi.org/10.1177/0022034510376402>



- Herrera D, Molina A, Buhlin K, y Klinge B. (2020). Periodontal diseases and association with atherosclerotic disease. *Periodontology 2000*, 83(1), 66-89. <https://doi.org/10.1111/prd.12302>
- HOMD: Base de datos del microbioma oral humano. (s. f.). Recuperado 12 de noviembre de 2023, de <https://www.homd.org/>
- How KY, Song KP y Chan KG. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*, 7, 53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>
- Huang YK, Tseng KF, Tsai PH, Wang JS, Lee CY y cols. (2021). IL-8 as a Potential Therapeutic Target for Periodontitis and Its Inhibition by Caffeic Acid Phenethyl Ester In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3641. <https://doi.org/10.3390/ijms22073641>
- Isola G, Giudice A. L., Polizzi, A., Alibrandi, A., Patini, R., y Ferlito, S. (2019). Periodontitis and Tooth Loss Have Negative Systemic Impact on Circulating Progenitor Cell Levels: A Clinical Study. *Genes*, 10(12), 1022. <https://doi.org/10.3390/genes10121022>
- Jervøe-Storm PM, AlAhdab H, Koltzsch M, Fimmers R, y Jepsen, S. (2007). Comparison of Curet and Paper Point Sampling of Subgingival Bacteria as Analyzed by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Periodontology*, 78(5), 909-917. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060218>
- Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray C y cols. (2014). Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1045-1053. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>
- Kumar S. (2019). Evidence-Based Update on Diagnosis and Management of Gingivitis and Periodontitis. *Dental Clinics of North America*, 63(1), 69-81. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.08.005>
- Lobão WJ, Carvalho RC, Leite SM, Rodrigues VP, Batista JE y cols. (2019). Relationship between periodontal outcomes and serum biomarkers changes after non-surgical periodontal therapy. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 91, e20170652. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920170652>

- Loomer PM. (2004). Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 34(1), 49-56. <https://doi.org/10.1046/j.0906-6713.2002.003424.x>
- Loos BG y Van Dyke TE. (2020). The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontology* 2000, 83(1), 26-39. <https://doi.org/10.1111/prd.12297>
- Machado V, Botelho J, Escalda C, Hussain SB, Luthra S y cols. (2021). Serum C-Reactive Protein and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706432>
- Mei F, Xie M, Huang X, Long Y, Lu X y cols. (2020). Porphyromonas gingivalis and Its Systemic Impact: Current Status. *Pathogens*, 9(11), 944. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110944>
- Meisel P, Pink C, Nauck M, Völzke H y Kocher T. (2019). Construction of a Biological Age Score to Predict Tooth Loss over 10 Years. *Journal of Dental Research*, 98(10), 1096-1102. <https://doi.org/10.1177/0022034519861037>
- Miyashita H, Honda T, Maekawa T, Takahashi N, Aoki Y y cols. (2012). Relationship between serum antibody titres to Porphyromonas gingivalis and hs-CRP levels as inflammatory markers of periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 57(6), 820-829. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.11.008>
- Morozumi T, Yashima A, Gomi K, Ujiie Y, Izumi Y y cols. (2018). Increased systemic levels of inflammatory mediators following one-stage full-mouth scaling and root planing. *Journal of Periodontal Research*, 53(4), 536-544. <https://doi.org/10.1111/jre.12543>
- Mulhall H, Huck O y Amar S. (2020). Porphyromonas gingivalis, a Long-Range Pathogen: Systemic Impact and Therapeutic Implications. *Microorganisms*, 8(6), 869. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060869>
- Nadkarni M, Martin F, Jacques N, y Hunter N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257-266. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>

- Nazir M. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences*, 11.
- Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B y cols. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The Scientific World Journal*, 2020, 2146160. <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>
- Orrego-Cardozo M, Parra-Gil MA, Salgado-Morales YP, Muñoz-Guarín E y Fandiño-Henao V. (2015). Porphyromonas gingivalis y enfermedades sistémicas. *CES Odontología*, 28(1), 57-73.
- Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M y cols. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(S1), S173-S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>
- Rojas MA, Jacques J, Molinett S, Botelho JN y Padilla C. (2017). Distribución gen fimA de Porphyromonas gingivalis en pacientes chilenos con periodontitis crónica. *Rev. clín. periodoncia implantol. rehabil. oral (Impr.)*, 141-144.
- Sezgin Y, Bulut Ş, Bozalioğlu S y Sezgin A. (2019). Levels of High-Sensitivity C-Reactive Protein in Heart Transplant Patients With and Without Periodontitis. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 17(Suppl 1), 123-127. <https://doi.org/10.6002/ect.MESOT2018.O65>
- Shah B, Shah M, Geisinger M, Saleh MHA, Meghil M y cols. (2023). Effect of non-surgical therapy on plasma C-reactive protein levels in patients with periodontitis: A single arm prospective clinical trial. *Journal of Periodontology*, 94(3), 336-343. <https://doi.org/10.1002/JPER.22-0231>
- Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J y cols. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329-355. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>
- Thanakun S, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Gokyu M, Kobayashi H y Izumi Y. (2016). Inverse Association of Plasma IgG Antibody to Aggregatibacter actinomycetemcomitans and High C-Reactive Protein Levels in Patients

- with Metabolic Syndrome and Periodontitis. *PLoS ONE*, 11(2), e0148638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148638>.
- Torrunguang K, Katudat D, Mahanonda R, Sritara P y Udomsak, A. (2019). Periodontitis is associated with elevated serum levels of cardiac biomarkers—Soluble ST2 and C-reactive protein. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(8), 809-818. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13149>
- Tsukasaki M. (2021). RANKL and osteoimmunology in periodontitis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 39(1), 82-90. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01165-3>
- Viafara-García SM, Morantes SJ, Chacon-Quintero Y, Castillo DM, Lafaurie GI y cols. (2019). Repeated Porphyromonas gingivalis W83 exposure leads to release pro-inflammatory cytokines and angiotensin II in coronary artery endothelial cells. *Scientific Reports*, 9, 19379. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54259-y>
- Yashima A, Morozumi T, Yoshie H, Hokari T, Izumi Y y cols. (2019). Biological responses following one-stage full-mouth scaling and root planing with and without azithromycin: Multicenter randomized trial. *Journal of Periodontal Research*, 54(6), 709-719. <https://doi.org/10.1111/jre.12680>
- Yong X, Chen Y, Tao R, Zeng Q, Liu Z y cols. (2015). Periodontopathogens and human  $\beta$ -defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. *Journal of Periodontal Research*, 50(3), 403-410. <https://doi.org/10.1111/jre.12220>
- Yucel-Lindberg T y Båge T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.8>

## 11. ANEXOS

### 11.1. Anexo 1: Certificado del Comité Institucional de Bioseguridad.



Comité Institucional de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte  
FDO N° 144

Santiago, 08 de Septiembre de 2020.

#### **C E R T I F I C A D O**

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto IADR's Regional Development Program 2020 titulado "**Bacterial translocation signatures in periodontitis: a new paradigm for the relationship between periodontal-gut microbiota and non-communicable diseases**". La Investigadora Responsable de este proyecto es la Dra. Patricia Hernández Ríos, Académica del Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Los ensayos propuestos en este Proyecto se realizarán en la Unidad Académica mencionada anteriormente e involucran el manejo de:

- o **Sustancia Químicas Peligrosas:**  
-Se utilizarán agentes químicos de riesgo de tipo corrosivos, inflamables, tóxicos agudos y peligros (graves) para la salud y medio ambiente.
- o **Material Biológico:**  
-Muestras Humanas: piezas dentarias (muestras de placa subgingival), sangre periférica y muestras subgingivales.
- o **Patógenos:**  
-La bacteria Gram negativo *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (grupo de riesgo 2); bacterias Gram negativo (si fuera necesario cultivar): *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406, *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 y *Eikenella corrodens* ATCC 23834, todas las anteriores pertenecientes al grupo de riesgo 2; *Treponema denticola* ATCC 35405, *Filifactor alocis* ATCC 35896 (Gram positivo) y *Veillonella parvula* ATCC 10790, todas las anteriores pertenecientes al grupo de riesgo 1.

o **Radiaciones ionizantes:**

-Se utilizará radiación ionizante del tipo rayos X para la toma de radiografías convencionales.

Los ensayos se realizarán principalmente en el Laboratorio de Biología Periodontal (a cargo de la Dra. Marcela Hernández) y también en el Laboratorio de Microbiología Bucal (a cargo de la Dra. Anilei Hoare) ambas Co-investigadoras del presente proyecto. Además, los sujetos a enrolar en el estudio se examinarán y se realizarán sus seguimientos en la Clínica Odontológica.


El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados, Conicyt 2018. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad junto al Manual de Procedimientos para el Manejo y Desechos de Residuos biológicos y RESPEL de la Facultad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Hernández para ser presentado al Concurso IADR's Regional Development Program 2019, en el que fue adjudicado el presente proyecto.


**Dra. Carla Lozano M.**  
**Presidenta**

## 11.2. Anexo 2: Acta de aprobación del Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.



1

**ACTA DE APROBACION N° 05**

Santiago, 13 de enero de 2021.

El Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dra. Teresa Massardo Vega. Especialista en Medicina Nuclear. Presidenta  
 Sr. Mauricio Venegas Santos. Bioquímico. Vicepresidente.  
 Dra. Aida Verónica Araya Quintanilla. Médico Endocrinóloga. Secretaria de actas.  
 Dr. Sergio Valenzuela Puchulu. Médico Gineco-Obstetra. Integrante.  
 Dr. Juan Carlos Prieto Domínguez. Médico Farmacología Clínica. Integrante.  
 Dra. Ana María Madrid Silva. Gastroenteróloga. Integrante.  
 Srta. Rina Sepúlveda Alfaro. Abogado. Integrante.  
 Dra. Gloria López Stewart. Médico Endocrinóloga. Integrante.  
 Dr. Juan Jorge Silva Solís. Médico Cirujano. Integrante.  
 Dr. Melchor Lemp Miranda. Médico Neurocirujano. Integrante.  
 Sra. Ginette Zúñiga Navarrete. Miembro de la comunidad.

Ha analizado el Proyecto: **“Bacterial translocation signatures in periodontitis: A new paradigm for the relationship between periodontal-gut microbiota and non-communicable diseases”**, cuya Investigadora Principal es la Dra. Patricia Hernández Ríos, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Participa como Investigadora Responsable, la Dra. Marcela Hernández Ríos, del Servicio Dentomaxilofacial. El proyecto será desarrollado en de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Para estos efectos se tuvo a la vista los siguientes documentos:

- Carta de presentación de proyecto.
- Carta de compromiso de la investigadora principal.
- Carta de compromiso de los co-investigadores.
- Curriculum vitae de la investigadora principal.
- Formulario de solicitud de evaluación de proyecto.
- Proyecto en extenso.
- Documento de Consentimiento Informado Versión 2.0, fechado 11 de enero de 2020.
- Revocación del Consentimiento Informado Versión 1.0, fechado 10 de diciembre de 2020.
- Ficha de registro clínico.

El Proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la investigación Biomédica en Seres humanos CIOMS 2002, de las Guías de Buenas prácticas Clínicas de ICH y Normativa Nacional Vigente.

---

Comité Ético Científico - Teléfono: (+56) 22978 9008 - Email: comiteetico@hucuch.cl  
 Santos Dumont 999, Independencia - RM

[www.redclinica.cl](http://www.redclinica.cl)

2

**a) Carácter de la población estudiada**

Terapéutica.

**b) Utilidad del Proyecto**

Adecuada.

**c) Riesgos**

Controlados.

**d) Beneficios**

Adecuados.

**e) Confidencialidad del Estudio**

La investigadora principal asegura la confidencialidad de todos los datos.

Por lo tanto, el Comité estima que el Estudio propuesto estuvo bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores.

El consentimiento informado es adecuado en forma y fondo.

**En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la Aprobación Ética del estudio propuesto, en sesión extraordinaria del 13 de enero de 2021, la que se extiende por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha. Se adjunta Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.**

**Se debe tener presente que se debe realizar:**

- Envío para aprobación o toma de conocimiento de nueva documentación relacionada al estudio.
- Cambio en los Delegados del Director de la Institución.
- Notificación de reacciones adversas serias o no serias, en que las serias deben ser notificadas en un plazo de 72 horas hábiles de ocurrido el evento.
- Enviar anualmente avances del Proyecto.
- Solicitud de Extensión de plazo de aprobación.
- Enviar Informe Final del Proyecto.

**Los ítems mínimos que deben contener los informes semestrales y finales, son los siguientes:**

- Cumplimiento de los objetivos.
- Numero de Sujetos enrolados.
- Número y motivo de los sujetos que abandonan o se retiran.

Saluda atentamente a Ud.



13-01-2021

Teresa Massardo Vega  
Presidenta del Comité Ético Científico  
Hospital Clínico de la Universidad de Chile



### 11.3. Anexo 3: Documento de consentimiento informado.

#### **DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

##### **Título del Proyecto:**

**"Señales de translocación bacteriana en periodontitis: un nuevo paradigma para la asociación de la microbiota periodontal-intestinal y enfermedades crónicas no transmisibles".**

Nombre del Investigador: Patricia Hernández Ríos  
 Servicio o Departamento: Departamento de Odontología Conservadora  
 Institución patrocinadora: Facultad de Odontología, Universidad de Chile  
 Dirección: Olivos 943, Independencia, Santiago  
 Teléfonos: 229781839, 988299380

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "*Señales de translocación bacteriana en periodontitis: un nuevo paradigma para la asociación de la microbiota periodontal-intestinal y enfermedades crónicas no transmisibles*", debido a que usted cumple con los criterios necesarios para ser parte de él.

Antes de tomar la decisión de participar lea atentamente este documento.

**Introducción:** La periodontitis es una enfermedad que produce inflamación en las encías y destrucción en los tejidos que insertan los dientes debido a la presencia de microorganismos (bacterias) sus encías. Esta enfermedad también podría afectar la salud general, e incluso intestinal.

En este estudio evaluaremos la presencia de bacterias intestinales y bacterias que causan la periodontitis en sangre y encía, y su relación con la presencia de inflamación en la circulación sanguínea general.

Se invitará a participar a personas con y sin periodontitis (sanos), haremos un examen clínico y radiográfico por especialistas, tomaremos muestras de bacterias de encía y de sangre. El estudio no involucra intervención alguna más allá del examen y muestras, por lo tanto no implica riesgo para los participantes, y permitirá explorar de manera internacional el conocimiento de la interrelación y rol de las enfermedades bucales sobre otras enfermedades médicas.

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivo determinar la asociación entre la inflamación presente en la circulación general y presencia de bacterias del intestino y encía en sangre. Para esto, se incluirá a un número mínimo de 60 sujetos provenientes del Centro de salud de San Bernardo, Clínica Universidad de los Andes, Pontificia Universidad Javeriana, y Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología Universidad de Chile, donde usted será reclutado (20 personas en cada centro universitario).

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar, sea del grupo con periodontitis o sin ella, usted será sometido a los siguientes procedimientos, por una única vez: entrevista y registro de datos generales y médicos, examen clínico odontológico (de encías y caries) y radiografías dentales de todos los dientes. Además, se tomarán muestras de placa bacteriana (bacterias bucales), mediante instrumentos específicos, desde el surco presente en su encía. Un técnico especializado registrará su índice de masa corporal (calculado en base al peso y la altura), y tomará una muestra sanguínea de su brazo (aprox. 45 ml). Sus muestras serán utilizadas para determinar la presencia de bacterias o sus componentes, y respuesta inflamatoria general, mediante el examen de laboratorio clínico de niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad en sangre.

**Riesgos:** Durante la extracción de sangre, usted podría experimentar ligeras molestias, tales como dolor leve, mareos o sensación de debilidad general, así como hematomas o "moretones" ocasionales en la zona de punción. La toma de muestras sanguíneas, así como el resto de los procedimientos, serán realizados por personal calificado y acreditado, de manera de disminuir los riesgos para usted.

Las radiografías dentales poseen un nivel muy bajo de irradiación, por lo que se consideran seguras. De todos modos, para limitar la exposición, se le cubrirá el resto del cuerpo con un delantal del plomo. La radiación puede ocasionar alteraciones en el feto, por lo que si usted está embarazada o sospecha de embarazo, por favor informe y absténgase de participar en el estudio.

El examen bucal y la toma de muestras de placa bacteriana, por su parte, no conllevan mayores molestias ni riesgos propios de su obtención.

Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de la toma de muestras sanguíneas o del estudio, deberá comunicarlo a la Dra. Patricia Hernández Ríos, en el teléfono 988299380 o mail phernandezrios@gmail.com

**Costos:** Los insumos, exámenes clínico-radiográficos, exámenes sanguíneos y microbiológicos, con sus técnicas de muestreo y análisis, serán aportados por la investigación y su financiamiento (Proyecto IADR Regional Development), sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto. Su participación no le representará gastos adicionales.

**Beneficios:** Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, como beneficios, cada voluntario obtendrá un examen dental clínico bucal y diagnóstico periodontal gratuito, derivación a tratamiento dental, así como set de radiografías dentales gratuitas y cepillos y pastas dentales sin costo. Adicionalmente, podrá conocer los resultados del análisis de sus niveles de proteína C reactiva sin costo, si usted lo desea.

**Alternativas:** Si Ud. decide no participar en esta investigación recibirá la evaluación que se aplica habitualmente en forma particular y con los costos normalmente asociados, sin existir ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención y/o participación.

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio. Sin embargo, se le otorgará una colación inmediatamente después de haber donado sangre.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad y Revocación:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador (mediante un formulario de revocación del consentimiento opcional) y a su médico tratante, sin que ello signifique sanciones o pérdida de beneficios en nuestra institución o modificaciones en el tratamiento habitual de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

**Complicaciones:** En el improbable caso de que Ud. presente complicaciones directamente dependientes de la toma de muestras o del estudio mismo, Ud. recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación, financiado por el equipo de investigación, y sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.

**Derechos del participante:** Usted recibirá una copia de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con la investigadora Dra. Patricia Hernández (988299380), o la Sra. Bernarda Parada (999699428).

**Otros Derechos del participante:**

En caso de duda sobre sus derechos comunicarse con el Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico Universidad de Chile, Teléfono: 229789008, Email: comiteetica@hcuch.cl, ubicado en Santos Dumont N° 999, 4 Piso Sector D,

Comuna de Independencia, Santiago.

**Conclusión:**

Después de haber leído y comprendido la información de este documento, de haber podido aclarar todas mis dudas, entiendo que me puedo retirar cuando lo desee. Otorgo mi consentimiento libre, informado y voluntario para participar en el proyecto mencionado, "IADR Regional Development Program".

_____ Nombre del sujeto Run.	_____ Firma	_____ Fecha y Hora
------------------------------------	----------------	-----------------------

_____ Nombre del Investigador Run.	_____ Firma	_____ Fecha y Hora
--	----------------	-----------------------

_____ Nombre del Director o Delegado Run.	_____ Firma	_____ Fecha y Hora
---	----------------	-----------------------

*Si se trata de un sujeto iletrado, no vidente u otra situación, registrar nombre del sujeto y de su apoderado (Testigo).*

_____ Nombre del Testigo Run.	_____ Firma	_____ Fecha y Hora
-------------------------------------	----------------	-----------------------

## 11.4. Anexo 4: Registro clínico de los participantes.

### FICHA DE REGISTRO CLÍNICO Proyecto IADR-RDP

*"Bacterial translocation signatures in periodontitis: A new paradigm for the relationship between periodontal-gut microbiota and non-communicable diseases"* (Hernández-Ríos P, Hoare A, Hernández M, Chaparro A, Suárez L).

DATOS PERSONALES		
Nombre:		Nº Ficha:
e-mail:		ID muestra suero:
Fono:		ID muestra PB:
Fecha ingreso:		Fecha nacimiento:
Género: Femenino <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/>		Edad:
Nivel educacional: básica incompleta <input type="checkbox"/> básica completa <input type="checkbox"/> media completa <input type="checkbox"/> superior completa <input type="checkbox"/>		
ANAMNESIS Y EXAMEN FÍSICO		
Fumador (actual)	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	No cigarrillos:
Consumo alcohol	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Promedio grs/día:
Enfermedad sistémica actual	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Especificar:
Alergias	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Especificar:
Tratamiento médico los últimos 3 meses	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Especificar:
Tratamiento periodontal previo	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Especificar:
Peso (kg): Talla (m):	IMC (kg/m <sup>2</sup> ):	PCR-as (mg/ml):
EXAMEN CLÍNICO INTRAORAL Y RADIOGRÁFICO		
Periodontitis <input type="checkbox"/>	PS prom (mm):	Diagnóstico periodontal:
Sano <input type="checkbox"/>	NIC prom (mm):	
LPA	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Destartraje (fecha):
COPD	Cariados (Nº de dientes):	
	Obturados (Nº de dientes):	
	Perdidos (Nº de dientes):	
	COPD Total:	
MUESTRAS DE PLACA BACTERIANA		
Fecha:	Diente (sitio):	
	Diente (sitio):	
	Diente (sitio):	
	Diente (sitio):	

**EXAMEN PERIODONTAL**

Fecha:

V	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
Mov.														
Furca														
SS														
PE														
PS														
NIC														

L	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
Mov.														
Furca														
SS														
PE														
PS														
NIC														

V	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7
Mov.														
Furca														
SS														
PE														
PS														
NIC														

L	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7
Mov.														
Furca														
SS														
PE														
PS														
NIC														

 13-01-2021