



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

**TIPIFICACIÓN DE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* Y  
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS* EN PACIENTES AFECTADOS CON  
PERIODONTITIS**

**Martina Cassandra Meléndez Stefony**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Johanna Contreras Balbontín**

**Prof. Dra. Patricia Hernández Ríos**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 11100298**

**Santiago - Chile**

**2013**

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo de investigación a mi familia, mi mamá Nelly, por inculcarme la responsabilidad, la rigurosidad y la perseverancia para lograr los objetivos en la vida, a mi hermano Maximiliano, gracias por estar cuando te necesité con todo el talento artístico que yo no heredé y tus conocimientos tecnológicos, y a mi papá Enrique, gracias por nunca dejar de creer en mí, por las horas de estudio que pasamos juntos y por todo lo que hiciste para que mi sueño se volviera una realidad.

A mis amigos, del colegio, de la universidad y de la vida, cada uno de ustedes aportó para que esta etapa que estoy culminando haya sido la más increíble e inolvidable de todas, solo queda esperar que depara el futuro.

Y especialmente a José Francisco, me acompañaste por 4 de los 6 años que dura esta carrera y solo me queda agradecerte por todo, sin tu apoyo, compañía y cariño incondicional no estaría terminando este proceso con éxito. Te quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi tutor principal, Dr. Rolando Vernal y a mis tutoras asociadas, Dra. Johanna Contreras y Dra. Patricia Hernández, por todo el tiempo, dedicación y paciencia para llevar a cabo este trabajo de investigación, además de consejos y recomendaciones que van más allá de lo académico, infinitas gracias.

A Andrea Arias, por toda la paciencia y tiempo que dedicaste para enseñarme todo lo que sabes, por las conversaciones, consejos y risas en el laboratorio, sin ti no habría sido lo mismo.

A todos los profesores y administrativos que aportaron en mi formación profesional, gracias por ayudar a convertirme en la persona que soy hoy. En especial al Dr. Miguel Fernández y a la Dra. Mónica Ricart, docentes como ustedes hacen de la Universidad de Chile la mejor del país, el mayor de los agradecimientos para ustedes, por todo lo enseñado mas allá de lo estudiantil, lo pondré en práctica cada día de mi vida profesional.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	Página 5
MARCO TEÓRICO.....	Página 7
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	Página 19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	Página 20
RESULTADOS.....	Página 27
DISCUSIÓN.....	Página 37
CONCLUSIONES.....	Página 46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Página 47
ANEXOS Y APÉNDICES.....	Página 54

## RESUMEN

**Introducción:** Las periodontitis son un conjunto de enfermedades infecciosas, caracterizadas por la destrucción de los tejidos de inserción de los dientes, cuya causa es el biofilm subgingival. *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* son bacterias periodonto-patógenas del biofilm subgingival que han sido ampliamente asociadas al inicio, progresión y severidad de la enfermedad. Sobre la base de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* y del O-polisacárido del LPS de *A. actinomycetemcomitans* se han descrito distintos serotipos bacterianos, denominados K1-K6 y a-f, respectivamente. En distintas poblaciones afectadas de periodontitis, se ha establecido que los serotipos bacterianos más frecuentemente detectados son los serotipos K5 y K6 de *P. gingivalis* y b-c de *A. actinomycetemcomitans*. En Chile no existen estudios que hayan analizado la frecuencia de detección de estos serotipos bacterianos.

**Objetivos:** Cuantificar la frecuencia de detección de los distintos serotipos de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en pacientes afectados de periodontitis crónica o periodontitis agresiva.

**Metodología:** Muestras microbiológicas del biofilm subgingival fueron obtenidas de 25 sitios periodontales distintos en pacientes con periodontitis crónica o agresiva. La presencia de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* se estableció identificando las características de las colonias microbianas en cultivo en agar sangre hemina/menadiona o agar TSVB, pruebas bioquímicas de metanol o catalasay por identificación mediante PCR de la subunidad 16S del RNA ribosomal (rRNA). Purificados bacterianos fueron aislados y la caracterización del serotipo de *P. gingivalis* y de *A. actinomycetemcomitans* se realizó mediante PCR utilizando partidores específicos.

**Resultados:** *P. gingivalis* fue identificado en el 40% de los pacientes afectados de periodontitis, tanto crónica como agresiva, y *A. actinomycetemcomitans* en un 16%. Cuando *P. gingivalis* fue detectado, el 60% fue serotipo K3 y el 50% K2 o K5. En el caso de *A. actinomycetemcomitans*, el 75% fue serotipo b y el 25% c.

**Conclusión:** En los pacientes con periodontitis existe una frecuencia variable de detección de los distintos serotipos bacterianos. En *P. gingivalis* los serotipos más frecuentemente detectados fueron el serotipo K3, K2 y K5 y en *A. actinomycetemcomitans* el serotipo b.

## MARCO TEÓRICO

Las periodontitis corresponden a enfermedades del periodonto de inserción de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa que se producen como consecuencia de la relación desfavorable entre hospedero y biofilm periodonto-patógeno. La enfermedad se caracteriza por la inflamación gingival, migración de la inserción epitelial hacia el ápice del diente, destrucción del tejido conectivo, reabsorción del hueso alveolar y formación del saco periodontal (Armitage, 1995).

Las periodontitis son enfermedades de alta prevalencia y se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo. En Estados Unidos la prevalencia alcanza el 47,2% (Eke y cols., 2012), en Brasil la prevalencia es de 9% en jóvenes, 10% en adultos y 19% en adultos mayores y en Argentina es de 5%, 30% y 49%, respectivamente (Gjermeo y cols., 2002), y en Chile la pérdida severa de inserción clínica es de 39% en adultos jóvenes entre 35-44 y 69% en adultos mayores entre 65-74 años (Gamonal y cols., 2010).

El rol bacteriano es una parte fundamental en la etiopatogenia de las periodontitis con alrededor de 735 tipos distintos de microorganismos involucrados, los cuales se organizan como un biofilm adherido a la superficie de los dientes. El biofilm se define como una agregación microbiana en un ambiente acuoso que es capaz de secretar sustancias que permiten su adhesión al diente y la coagregación de otras especies bacterianas (Socransky y cols., 1998). Desde el punto de vista de su localización, se describe un biofilm supragingival, localizado hacia coronal del margen gingival, y un biofilm subgingival, localizado en el surco gingivodentario o saco periodontal.

Mientras el biofilm supragingival posee una disposición columnar desde la superficie del esmalte a la superficie de la placa bacteriana y está constituido principalmente por especies Gram-positivo facultativas de morfología variada (bacilos y cocos), el biofilm subgingival está conformado principalmente por bacterias Gram-negativo anaerobias móviles, ubicadas adyacentes a la encía (Socransky y cols., 1998). Las variaciones en la composición del biofilm no sólo se

describen entre placa bacteriana supragingival y subgingival, sino también entre salud y enfermedad y entre los distintos niveles de severidad de la periodontitis.

Las asociaciones bacterianas del biofilm subgingival, llamados micronichos o comunidades bacterianas, se organizan compartiendo nutrientes y factores de coagregación. Teóricamente se han agrupado en distintas comunidades, identificadas mediante tamaños y colores particulares, los que guardan relación con la cantidad de bacterias que las componen y la prevalencia de cada una de ellas en individuos sanos y enfermos (Socransky y cols., 1998). Los complejos naranja y rojo incluyen a las bacterias periodonto-patógenas principalmente asociadas a la etiología de la periodontitis, en particular a las formas más severas de la enfermedad (Figura 1).

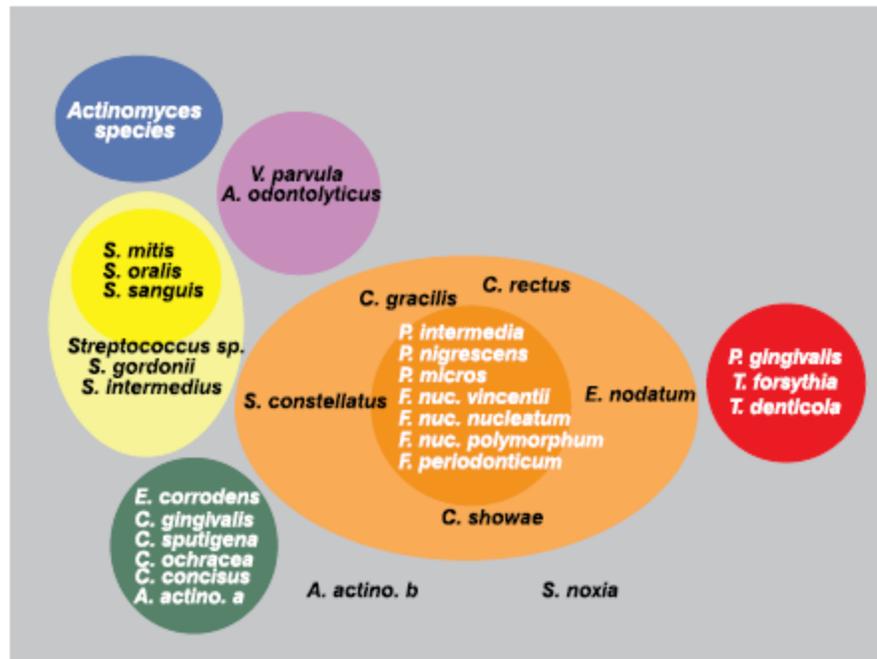


Figura 1. Esquema de las comunidades (complejos) bacterianas del biofilm periodonto-patógeno. Estas agrupaciones son secuenciales desde la superficie del diente a la superficie de la placa bacteriana, por lo que la formación y maduración de éste va a depender de la existencia de una comunidad previa, desde el azul hacia el rojo. (Socransky y cols., 1998).

Entre los microorganismos más prevalentes encontrados en individuos con periodontitis están *A. actinomyces comitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella*

*intermedia*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythensis* (Haffajee y Socransky, 1994).

Un estudio multicéntrico realizado en Chile, Colombia y España que evaluó a 114 pacientes afectados de periodontitis crónica generalizada, arrojó como resultado que los patógenos más prevalentes en los sacos periodontales de individuos chilenos fueron: *A. actinomycetemcomitans* (19,4%), *P. gingivalis* (83,8%), *Prevotella intermedia* (19,4%), *Fusobacterium spp* (63,9%) y *Parvimonas micra* (29,7%) (Herrera y cols., 2008). La investigación de Gajardo (Gajardo y cols., 2005) en pacientes con periodontitis agresiva localizada o generalizada dio como resultado que la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* era de un 16,6% y 33,3% y de *P. gingivalis* de un 86,6% y 100%, respectivamente. Se analizaron otras bacterias, tal como *Porphyromonas intermedia*, *Eikenella corrodens* y *Fusobacterium nucleatum*, encontrándose cada una en un 40% y 16,6%, 53,3% y 33,3%, y 46,6% y 33,3%, respectivamente.

*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* se asocian a una mayor destrucción periodontal, una mayor tasa de progresión de la enfermedad, resultados insatisfactorios de la terapia periodontal y periodontitis recurrente (Haffajee y Socransky, 1994). *P. gingivalis* se encuentra en sacos periodontales más profundos que las otras 2 bacterias del clúster rojo. Con respecto al sangrado al sondaje, las bacterias del complejo rojo se encontraron en mayor cantidad en estos sitios al comparar con aquellos que no sangraban al sondaje, siendo *P. gingivalis* el representante de este clúster con mayor prevalencia (Socransky y cols., 1998). *A. actinomycetemcomitans* se detectó en mayor cantidad en sacos periodontales activos en sitios periodontales con pérdida de inserción clínica >2 mm, asociándose con la progresión de la enfermedad. *A. actinomycetemcomitans* se define como patógeno principal en la periodontitis agresiva y como patógeno secundario en la periodontitis crónica, debido a que se ha detectado en menor frecuencia y cantidad en esta última forma de enfermedad (Haffajee y Socransky, 1994).

Además de su alta frecuencia de detección en las periodontitis, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* se han asociado al inicio y severidad de diversas otras

enfermedades y condiciones. *P. gingivalis* se ha relacionado con trastornos cardiovasculares y parto prematuro con bajo peso del neonato (Offenbacher y cols., 2001; Meurman y cols., 2004) y *A. actinomycetemcomitans* con aterosclerosis (Zhang y cols., 2010).

**A. actinomycetemcomitans y sus factores de virulencia:**

*A. actinomycetemcomitans* es un cocobacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo (capnófilico) e inmóvil de la familia de *Pasteurellaceae* (Norskov-lauritsen y Kilian, 2006). Al cultivarlo, las colonias presentan forma circular aplanada de borde festoneado, generalmente con una forma de estrella central (Chen y Slots, 1999; Fine y cols., 1999).

Varias investigaciones han evidenciado el rol etiológico de *A. actinomycetemcomitans* en la periodontitis agresiva (Suzuki y cols., 2001) y en las periodontitis asociadas a síndromes (Síndrome de Down, Síndrome de Papillon-Lefèvre, Síndrome de Cohen, etc.) (Armitage, 2005). *A. actinomycetemcomitans* expresa diversos factores de virulencia, entre ellos:

Leucotoxina A (LtxA): le permite eliminar leucocitos, evadir la respuesta inmune e invadir los tejidos del hospedero (Díaz y cols., 2006).

Toxina distensora citoletal (Cdt): exotoxina proteica con actividad DNAasa que genera una detención en el crecimiento celular, alteración de la morfología y muerte celular (Heywood y cols., 2005). Un 77% de los pacientes diagnosticados con periodontitis agresiva son *A. actinomycetemcomitans* Cdt-positivos (Xynogala y cols., 2009).

Lipopolisacárido (LPS): mantiene la integridad estructural de las bacterias Gram-negativo y forma una barrera selectiva que limita la entrada de moléculas hidrofóbicas y químicos tóxicos, como detergentes y antibióticos, además es esencial para el anclaje de proteínas externas de membrana (Jain y Darveau, 2010). Está compuesto de 3 dominios: lípido A, core de oligosacárido y el O-antígeno, que es un polisacárido. El lípido A es el componente interno del LPS, el que está conservado en estructura y forma. El O-polisacárido es el componente

externo del LPS y forma la superficie externa de la bacteria, su estructura es altamente variable e inmunogénica, lo que permite la tipificación para distinguir entre subespecies bacterianas que tengan diferentes composiciones de éste (Jain y Darveau, 2010).

Sobre la base de la antigenicidad y variabilidad del O-polisacárido componente del LPS de *A. actinomycetemcomitans*, se han identificado 6 serotipos bacterianos distintos, denominados a, b, c, d, e y f. Los serotipos más frecuentemente detectados en la cavidad oral de humanos son los serotipos a, b y c, siendo el serotipo b el más frecuente en pacientes afectados de periodontitis agresiva. La mayor detección del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* podría asociarse a un mayor potencial inmunogénico y patogénico del microorganismo que aún no se ha logrado dilucidar (Díaz-Zúñiga y cols., 2012).

Investigaciones recientes han analizado el papel de los diferentes serotipos de *A. actinomycetemcomitans* en células dendríticas así como en la activación y función de los linfocitos T, demostrando diferencias cuantitativas y cualitativas en la producción de citoquinas. Específicamente, las células dendríticas estimuladas con el serotipo b experimentaron un aumento en la producción de citoquinas en comparación con las mismas células estimuladas con los otros serotipos bacterianos (Vernal y cols., 2008; Díaz-Zúñiga y cols., 2013). Los linfocitos T estimulados con el serotipo b evidenciaron un incremento en la expresión de los factores de transcripción T-bet y RORC2, en la secreción de citoquinas asociadas a los fenotipos linfocitarios Th1 y Th17: interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y TNF- $\beta$ , así como también un aumento en la producción de RANKL, factor asociado a la activación de osteoclastos y la reabsorción del hueso alveolar, en comparación con los otros serotipos bacterianos (Díaz-Zúñiga y cols., 2013).

### **Prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* y su relación con los serotipos:**

La investigación multicéntrica en Alemania y Corea arrojó como resultado que, de 194 pacientes con periodontitis (98 coreanos y 96 alemanes), 45 (23,2%) (21 coreanos y 24 alemanes) dieron positivo para *A. actinomycetemcomitans*; en los

alemanes la distribución de serotipos fue la siguiente: b (33,3%), c (25%) y a (20,8%); en los coreanos fue: c (61,9%), d (19%) y b (4,8%) (Kim y cols., 2009). En Grecia, de 228 pacientes, solo en 151 de ellos, afectados con periodontitis no tratada o en terapia de soporte, pudo ser identificado *A. actinomycetemcomitans*, siendo el serotipo más prevalente el c (10,5%), seguido del a (5,2%) y el b (4,6%) (Sakellari y cols., 2011). En estudios realizados en Brasil se examinaron 486 sujetos con periodontitis crónica, pudiendo cultivar *A. actinomycetemcomitans* en 85 (17,5%) de los sujetos. En este estudio, el serotipo más prevalente fue el c (52,9%) seguido del a (31,8%) y del b (9,41%) (Gonçalves y cols., 2010) En Chile, de 53 pacientes con periodontitis, 13 fueron identificados como *A. actinomycetemcomitans* positivos (Gráfico 1-2) (Gajardo y cols., 2005).

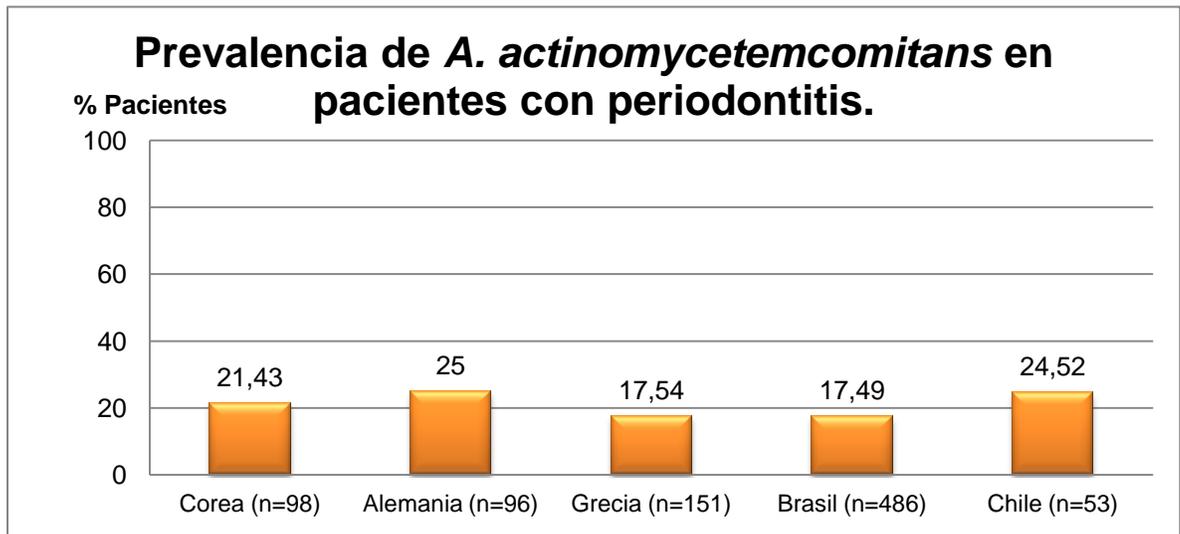


Gráfico 1. Prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis de distintas poblaciones. El porcentaje calculado se obtuvo del total de pacientes en estudio.

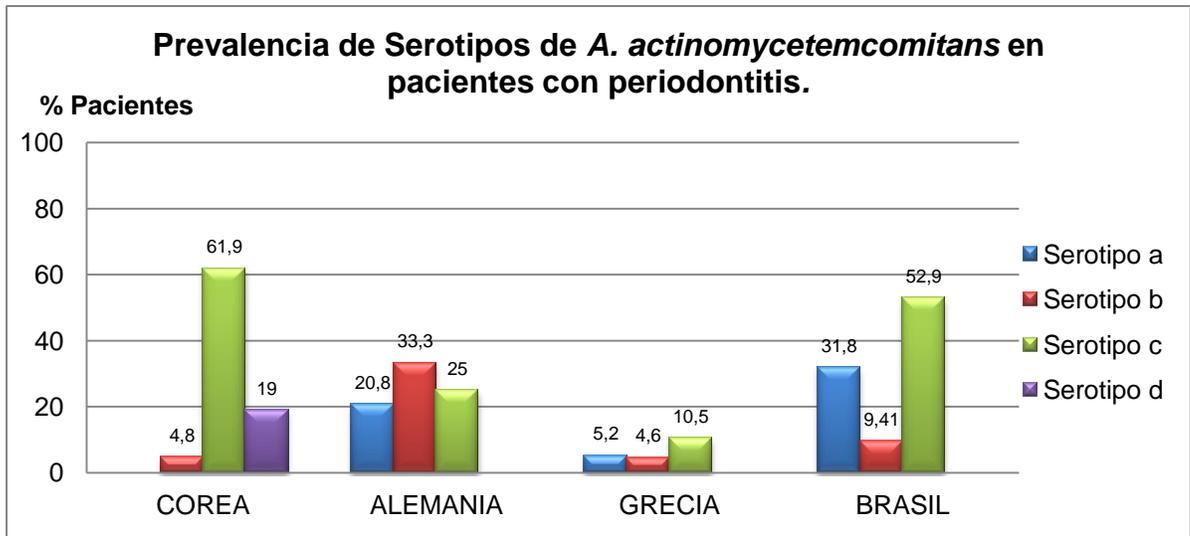


Gráfico 2. Prevalencia de los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis de distintas poblaciones. El porcentaje calculado se obtuvo considerando como el 100% los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, estipulados en el Gráfico 1.

### **P. gingivalis y sus factores de virulencia:**

*P. gingivalis* es un cocobacilo, anaerobio estricto, Gram-negativo. Expresa una serie de factores de virulencia, tales como fimbria, enzimas proteolíticas, hemaglutininas, LPS y cápsula extracelular (Yoshino y cols., 2007) y exhibe una diversidad genotípica y serotípica que permite una variabilidad intra-especie con la potencialidad de inducir distintos niveles de inflamación y destrucción periodontal (Teixeira y cols., 2009).

**Fimbria:** estructura filamentosa que se ubica en su superficie y le permite invadir los tejidos periodontales y colonizar la cavidad oral (Hiramine y cols., 2003). Se compone de una subunidad proteica llamada fimbriolina, codificada por el gen *fimA*, y otra subunidad llamada Mfa (Kuboniwa y cols., 2010). Sobre la base del *fimA* se han descrito 6 genotipos: I, Ib, II, III, IV y V (Amano y cols., 2004). En pacientes afectados con periodontitis crónica, los más frecuentemente detectados son el genotipo II y IV (Enersen y cols., 2008), mientras que en adultos sanos el genotipo más prevalente es el tipo I (Amano y cols., 2000), lo cual implicaría una especificidad genotípica del gen *fimA* asociada a salud o enfermedad periodontal.

Enzimas proteolíticas: las gingipaínas son un grupo de proteasas producidas por *P. gingivalis* en altos niveles. Las gingipaínas RgpA y RgpB son capaces de inactivar citoquinas y sus receptores, estimular la agregación plaquetaria, atenuar la actividad antibacteriana de los neutrófilos por medio de la inhibición del receptor de LPS, incrementar la permeabilidad vascular y la apoptosis de los queratinocitos gingivales y destruir macrófagos (Stathopoulou y cols., 2009). Aún no se establece claramente la asociación entre éstas enzimas y las periodontitis (Kubinowa y cols., 2000; Beikler y cols., 2005).

LPS: constituido de polisacáridos, oligosacáridos y lípido A, es altamente inmunogénico (Dixon y Darveau, 2005; Herath y cols., 2011). Durante las periodontitis, *P. gingivalis* tiene la potencialidad de liberar micro-vesículas que contienen LPS, las cuales pueden invadir los tejidos periodontales y activar la producción de citoquinas en macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales (Kocgozlu y cols., 2009). El LPS puede ser reconocido por las células presentadoras de antígenos mediante receptores tipo Toll (*toll-like receptor*, TLR) TLR2 y TLR4 (Poltorak y cols., 1998; Kikkert y cols., 2007), las cuales tienen la capacidad de presentar sus antígenos a los linfocitos T y desencadenar en el hospedero una respuesta inmune específica (Kocgozlu y cols., 2009; Herath y cols., 2011).

Polisacáridos capsulares: confieren estabilidad estructural al microorganismo, cumplen un rol importante en el reconocimiento e interacción con el hospedero, forman una barrera defensiva que permite evadir la respuesta inmune y mantienen la integridad bacteriana en ambientes con alta presión inmune (Poltorak y cols., 1998). La cápsula de *P. gingivalis* se compone principalmente de glucosa, glucosamina, galactosa, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosa, galactosamina y de los ácidos galactosaminurónico, manurónico, glucorónico y galacturónico (d'Empaire y cols., 2006). Sobre la base de su inmunogenicidad se han descrito 6 serotipos capsulares (K) diferentes, denominados K1, K2, K3, K4, K5 y K6 (Laine y cols., 1996).

En animales de experimentación, cuando los 6 serotipos capsulares se inocularon subcutáneamente, se observó un proceso infeccioso severo tipo flegmón, asociado a úlceras y/o necrosis de piel y muerte del animal. En contraste, al inocular una cepa de *P. gingivalis* carente de cápsula, sólo se observaron abscesos localizados, demostrándose así el potencial virulento de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* (Laine y van Winkelhoff, 1998).

En modelos murinos, se evaluó la respuesta de los macrófagos peritoneales ante los distintos serotipos K de *P. gingivalis*. Las quimioquinas MIP-2, JE/MCP-1, KC y RANTES se expresaron en niveles mayores en presencia del serotipo K1 comparado con los otros, sugiriendo una respuesta quimiotáctica diferente inducida por los distintos serotipos K (d'Empaire y cols., 2006).

Se ha establecido que los serotipos K5 y K6 se detectan con más frecuencia en los pacientes afectados de periodontitis (Laine y cols., 1997), los serotipos K1 y K3 poseen cápsulas con diferente composición molecular (Laine y cols., 1996; Laine y cols., 1997), el serotipo K4 posee una mayor capacidad adhesiva a células epiteliales obtenidas de sacos periodontales (Laine y cols., 1996) y los serotipos K1 y K2 muestran mayor resistencia a la fagocitosis y lisis por neutrófilos (Enersen y cols., 2008).

Cuando células dendríticas humanas fueron estimuladas con los distintos serotipos K de *P. gingivalis*, se detectó que los serotipos K1 y K2 indujeron una mayor expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  en comparación a los otros serotipos (Vernal y cols., 2008; Vernal y cols., 2009). En linfocitos T, ante los serotipos K1 o K2 se indujo un patrón de respuesta Th1 y Th17, mientras que ante los otros serotipos se indujo un patrón de respuesta Th2. En particular, los serotipos K1 y K2 indujeron mayor expresión de T-bet y RORC2, mayor secreción de citoquinas tipo Th1 y Th17 (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ) y mayor producción de RANKL que los otros serotipos de *P. gingivalis* (Vernal y cols., 2013). Diferencias estructurales capsulares entre los distintos serotipos de *P. gingivalis* podrían explicar las diferencias inmunogénicas descritas (Vernal y cols., 2009; Vernal y cols., 2013).

### **Prevalencia de *P. gingivalis* y su relación con los serotipos:**

En los Países Bajos, de 185 pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva, 84 (45,4%) poseían *P. gingivalis*, con predominio de serotipos K6 (51,1%), K5 (26,1%) y K1 (8,3%) (Laine y cols., 1997). En 158 pacientes con periodontitis de Indonesia, 106 fueron positivos para *P. gingivalis* y de ellos, 43 (40,5%), presentaron cápsula. Los serotipos más frecuentemente identificados fueron el K5 (58,1%) y K6 (18,6%), mientras que el K1 no fue identificado. En Chile, de 53 pacientes afectados con periodontitis, 45 (84,9%) fueron *P. gingivalis* positivos (Gráfico 3-4) (van Winkelhoff y cols., 1999).

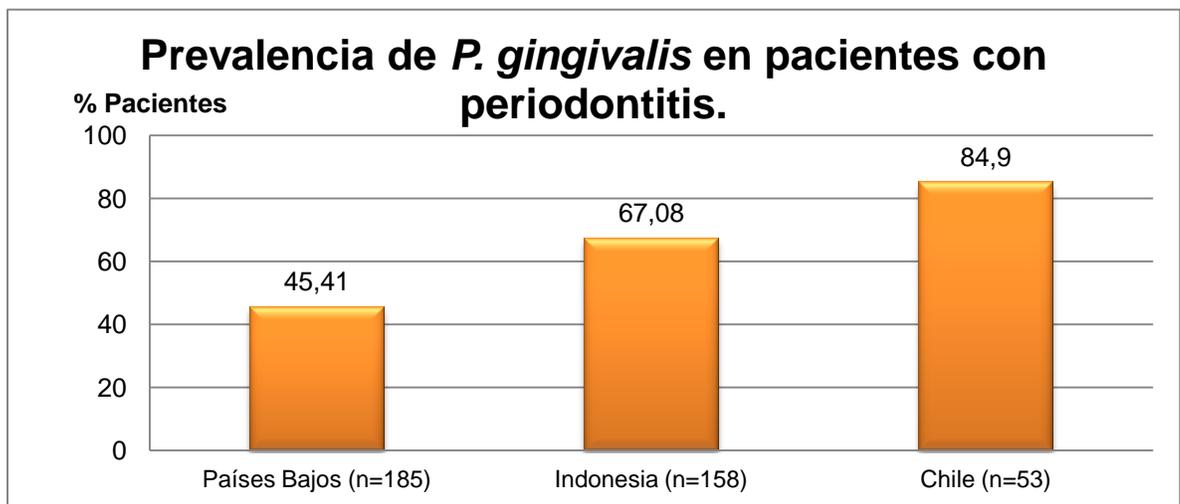


Gráfico 3. Prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes afectados de periodontitis en distintas poblaciones. El porcentaje calculado se obtuvo del total de pacientes en estudio.

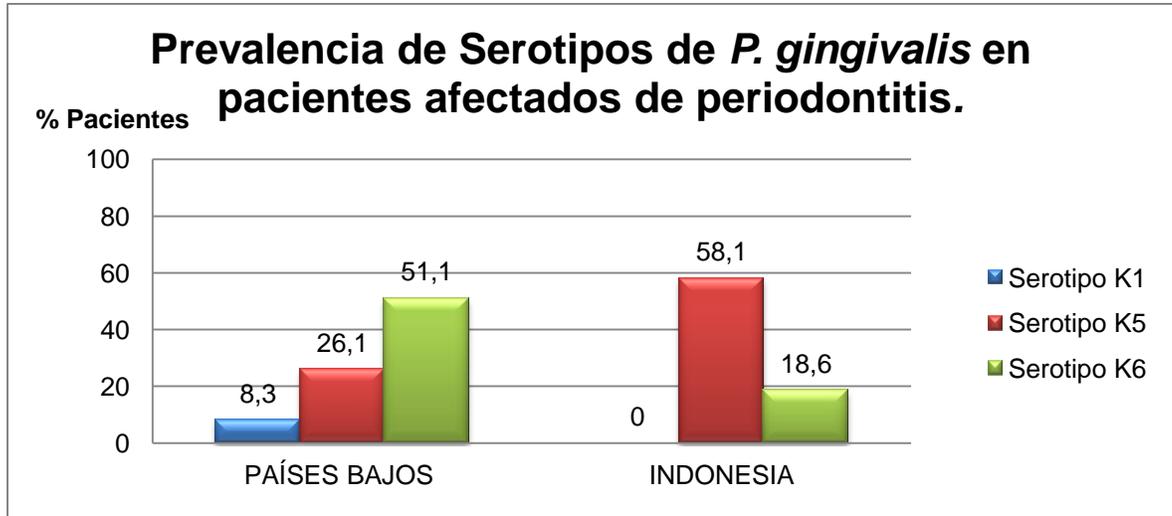


Gráfico 4. Prevalencia de los serotipos de *P. gingivalis* en distintas poblaciones. El porcentaje calculado se obtuvo considerando como el 100% los pacientes positivos para *P. gingivalis*, estipulados en el Gráfico 3.

En resumen, y de acuerdo a lo expuesto anteriormente, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* han sido ampliamente asociadas al inicio, progresión y severidad de las periodontitis. *P. gingivalis* se ha detectado en el 84,9% de los individuos chilenos afectados por la enfermedad, constituyendo el 34,01% de la flora bacteriana subgingival total. *A. actinomycetemcomitans* se ha asociado a la periodontitis agresiva, la que se caracteriza por una pérdida de inserción y destrucción periodontal rápida. Ambos poseen diversos factores de virulencia que tienen la potencialidad de generar una respuesta inmune en el hospedero; entre los factores más variables en relación a su estructura y sobre los cuales se realiza la tipificación de subespecies bacterianas, se describen la cápsula extracelular en *P. gingivalis* y el LPS-O-polisacárido en *A. actinomycetemcomitans*. Estos factores de virulencia, como se dijo anteriormente, permiten distinguir distintos serotipos bacterianos con distribución variable en la población, siendo los serotipos K5-K6 de *P. gingivalis* y el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* los más prevalentes en individuos afectados de periodontitis. No obstante, los serotipos K1 de *P. gingivalis* y b de *A. actinomycetemcomitans* se consideran los más virulentos *in vitro*, puesto que generan una inmunogenicidad variable en distintas células del hospedero, la que contribuiría a explicar potenciales diferencias de patogenicidad entre los serotipos.

En la población chilena se desconoce cuáles de los serotipos descritos son los más frecuentemente detectados en las lesiones periodontales y, considerando el potencial impacto de su determinación en el enfoque terapéutico, es que es importante tipificar los serotipos presentes en nuestra población.

## HIPÓTESIS

En los pacientes afectados de periodontitis y caracterizados por presentar *Porphyromonas gingivalis* y/o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en la placa bacteriana subgingival, los serotipos bacterianos más frecuentemente detectados son el serotipo K5-K6 y el serotipo b, respectivamente.

## OBJETIVO GENERAL

Tipificar el serotipo de *Porphyromonas gingivalis* y/o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* detectado en las lesiones periodontales de pacientes afectados de periodontitis.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y/o *Porphyromonas gingivalis* en las lesiones periodontales de pacientes afectados de periodontitis mediante cultivo bacteriano convencional, pruebas bioquímicas y amplificación por PCR de la subunidad 16S rRNA.
2. Tipificar el serotipo del LPS-O-polisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* detectado en las lesiones periodontales de pacientes afectados de periodontitis.
3. Tipificar el serotipo capsular de *Porphyromonas gingivalis* detectado en las lesiones periodontales de pacientes afectados de periodontitis.

## **MATERIALES Y METODOS**

### Selección de los sujetos:

En este estudio observacional descriptivo transversal, se seleccionaron pacientes mediante el método no probabilístico por conveniencia entre los sujetos que acudieron a la clínica de periodoncia de pregrado y postítulo de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile durante los meses de abril a junio de 2013. Los pacientes que fueron analizados firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética Institucional (Anexo 1).

Los criterios de inclusión fueron:

- Tener el diagnóstico de periodontitis crónica (moderada o severa) o periodontitis agresiva de acuerdo a los criterios establecidos por la Academia Americana de Periodoncia (en detalle más adelante).
- Ser mayor de 30 años para periodontitis crónica y menor o igual a 30 años para periodontitis agresiva.
- Tener al menos 17 dientes excluyendo los terceros molares.

Los criterios de exclusión fueron:

- Tener otras enfermedades tales como diabetes, inmunosupresiones o enfermedades infecciosas.
- Haber recibido tratamiento periodontal o profilaxis dental durante los 6 meses previos a su inclusión en el estudio.
- Haber consumido anti-inflamatorios esteroidales, no esteroidales y/o antibióticos.
- Haber utilizado antisépticos bucales como clorhexidina durante los 6 meses previos a su inclusión en el estudio.
- En el caso de ser mujer, estar embarazada o en período de lactancia (Casas y cols., 2007).

Los datos demográficos y clínicos de los pacientes que cumplieron con estos requisitos quedaron registrados en una ficha clínica ad-hoc (Anexo 2).

### Diagnóstico de periodontitis:

Para el diagnóstico de periodontitis crónica, se consideraron sólo las formas moderadas o severas de la enfermedad. Para la periodontitis crónica moderada se estableció como criterio diagnóstico una profundidad al sondaje (PS) de 3-4 mm en al menos el 30% de los sitios periodontales examinados y para la periodontitis crónica severa una PS  $\geq 5$  mm. Además, se consideraron el sangrado al sondaje (SS), el nivel de inserción clínica (NIC) y la presencia de placa bacteriana o cálculo dental supragingival y/o subgingival. Para el diagnóstico de periodontitis agresiva se consideraron pacientes sanos, sin otra enfermedad distinta a la periodontitis, con escasa o nula detección de placa bacteriana o tártaro supragingival y/o subgingival, progresión rápida de la pérdida de inserción periodontal y agregación familiar (Armitage, 2005).

### Selección de los sitios periodontales:

En cada sujeto seleccionado, muestras microbiológicas de la placa bacteriana subgingival se obtuvieron de los sitios periodontales mesio-vestibulares de 25 dientes diferentes (Chen y Slots, 1999). El orden de selección de los dientes fue de superior a inferior y de derecha a izquierda en forma correlativa, esto es: 1<sup>os</sup> molares, 2<sup>os</sup> premolares, 2<sup>os</sup> molares, 1<sup>os</sup> premolares, incisivos centrales, incisivos laterales y caninos. En caso que el paciente tuviera menos de 25 dientes, una vez obtenidas las muestras microbiológicas de todos los sitios mesio-vestibulares, se seleccionaron los sitios mesio-distales de los siguientes dientes: 1<sup>er</sup> molar superior derecho, 1<sup>er</sup> molar superior izquierdo, 1<sup>er</sup> molar inferior derecho, 1<sup>er</sup> molar inferior izquierdo, 2<sup>o</sup> premolar superior derecho, 2<sup>o</sup> premolar superior izquierdo, 2<sup>o</sup> premolar inferior derecho, 2<sup>o</sup> premolar inferior izquierdo, 1<sup>er</sup> premolar superior derecho, 1<sup>er</sup> premolar superior izquierdo, 1<sup>er</sup> premolar inferior derecho y 1<sup>er</sup> premolar inferior izquierdo, hasta obtener 25 muestras microbiológicas distintas.

### Obtención de la muestra microbiológica:

Los sitios periodontales seleccionados se aislaron en forma relativa con tómulas de algodón y se secaron suavemente con aire a presión. Luego de remover la placa bacteriana supragingival utilizando una cureta Gracey 11-12 o 13-14 estéril, un

cono de papel de endodoncia N°30 estéril se introdujo sub-gingivalmente hasta lograr una mínima resistencia tisular. El cono se mantuvo en posición durante 30 segundos e inmediatamente después se depositó en un tubo eppendorf que contenía 1mL de medio microbiológico RTF a pH 8 (Reduced Transport Fluid, que contiene: 200 mg/L de ditiotreitolo y 0,1mg/L de resazurina) para su transporte y procesamiento en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las muestras contaminadas con sangre o saliva fueron descartadas y el sitio periodontal involucrado no fue considerado entre los 25 seleccionados por paciente.

#### Procesamiento de la muestra microbiológica y cultivo bacteriano:

Antes de 2 horas de su obtención, las muestras microbiológicas se juntaron en un pool de muestras por cada paciente y se agitaron vigorosamente. A partir de este pool, fueron obtenidos 100 µL, diluidos  $\log_{10}$  en amortiguador fosfato salino (PBS) y 100 µL de la dilución se sembraron en medio de cultivo para la identificación de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Para la identificación de *A. actinomycetemcomitans*, las muestras microbiológicas de la dilución -1 fueron sembradas en medio de cultivo agar tripticasa de soya suplementado con 75 mg/L de bacitracina y 5 mg/L de vancomicina (TSBV, Oxoid Ltd), y se incubaron durante 3 a 7 días en condiciones capnofílicas (8% O<sub>2</sub> y 12% CO<sub>2</sub>), utilizando un generador de ambiente microbiano comercial (CampyGen™, Oxoid Ltd); este cultivo tiene una detección límite de 20 células viables/mL (Chen y Slots, 1999). En el caso de *P. gingivalis*, diluciones -2 y -3 se sembraron en medio de cultivo agar sangre de caballo al 5% (Oxoid N°2, Oxoid Ltd, Hampshire, England), suplementado con 5 mg/L de hemina y 1 mg/L de menadiona, y se incubaron durante 10 a 14 días a 37°C en condiciones anaerobias (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 10% H<sub>2</sub>), utilizando un generador de ambiente microbiano comercial (Anaerogen™, Oxoid Ltd); este cultivo tiene una detección límite de 1/500-1000 colonias (0,1%-0,2% del total viable) (Chen y Slots, 1999).

### Identificación microbiana:

Se estableció que la muestra microbiológica fue positiva para *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* de acuerdo al aspecto de las colonias microbiológicas formadas, usando pruebas bioquímicas específicas y mediante amplificación de la subunidad 16S rRNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en cultivo:

Se determinó que las colonias fueron concordantes con *P. gingivalis* cuando eran pequeñas, brillantes, convexas, con bordes nítidos y regulares y de color negro o café oscuro. Ocho colonias de estas características se seleccionaron y cultivaron individualmente en placas seccionadas en 8 partes iguales para confirmar su identificación como *P. gingivalis* mediante pruebas bioquímicas. Se estableció que la colonia fue compatible con *A. actinomycetemcomitans* cuando comprendía 0,5-1,0 mm de diámetro, superficie rugosa, aspecto translúcido, color amarillo claro, bordes festoneados e irregulares, fuertemente adherida al agary que mostrara una forma de estrella en el centro (Chen y Slots, 1999; Fine y cols., 1999).

### Pruebas bioquímicas:

Se realizaron las pruebas bioquímicas de la catalasa y el metanol. La prueba de la catalasa se realizó en las colonias concordantes con *A. actinomycetemcomitans* y se consideró confirmatoria de detección del microorganismo en caso de burbujeo en presencia de peróxido de hidrogeno, lo que demostró la actividad de la enzima catalasa en la muestra microbiológica. La prueba del metanol se utilizó como diagnóstico diferencial de microorganismos pigmentados de negro. Consistió en exponer la muestra microbiológica a luz UV de 366 nm para evaluar el tipo de fluorescencia emitida y así establecer la presencia del grupo HEM. Fue considerada negativa cuando emitió fluorescencia de color azul y así se estableció la presencia de *P. gingivalis* y fue positiva cuando emitió fluorescencia rojo-anaranjado y así se estableció la presencia de *Prevotella intermedia* o *Prevotella nigrescens*.

En este estudio, se incluyeron y analizaron sólo los pacientes en los que se comprobó la presencia de *P. gingivalis* y/o *A. actinomycetemcomitans* en la placa bacteriana subgingival, mediante las pruebas anteriormente descritas.

Identificación de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* mediante PCR:

La identificación definitiva de la presencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* se realizó mediante amplificación de la subunidad 16S rRNA por PCR. Se realizó la extracción de DNA total utilizando un kit de extracción estándar de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Favorgen Biotech Corp., Taiwán) y 100 ng de DNA se amplificaron mediante PCR convencional utilizando primarios específicos (Tabla 1) y el reactivo GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, WI, USA). Para la identificación de *P. gingivalis* se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos, y una incubación final para la inactivación enzimática de 72°C durante 10 minutos. Para la identificación de *A. actinomycetemcomitans* se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos, finalizando con una incubación para la inactivación enzimática de 72°C durante 10 minutos. La amplificación se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% revelado con GelRed<sup>™</sup> (Biotium, Hayward, CA, USA) y se fotografió usando un fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro (Carestream Gel Logic, Rochester, NY, USA). Como control positivo de *P. gingivalis* se usó DNA extraído de la cepa *P. gingivalis* ATCC<sup>®</sup> 49417<sup>™</sup> y como control positivo de *A. actinomycetemcomitans* se usó DNA extraído de la cepa *A. actinomycetemcomitans* ATCC<sup>®</sup> 43717<sup>™</sup> (Tabla 1).

Bacteria	Partidor Forward	Partidor Reverse
16S DNA	aaaccatctctgagttctcttc	atgccaactgacgttaaat
<i>P. gingivalis</i> ATCC® 49417™	aggcagcttgccatactcg	actgttagcaactaccgatg
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC® 43717™	gctgcagctcaactgtagtc	ccgctcatgtcaccatgtc
<i>P. gingivalis</i> K1	gcctgctggttctctggac	gcctgctggttctctggac
<i>P. gingivalis</i> K2	tccatcccagctatctgtt	agctccttgggtctgcac
<i>P. gingivalis</i> K3	ccagctgtgggtcctgaa	cacagccccacaaggctc
<i>P. gingivalis</i> K4	agctgatccgattcctgaaa	gttgcttccttcacaggac
<i>P. gingivalis</i> K5	caacaagatgcaggaagatcc	atggtctggtgcagttgca
<i>P. gingivalis</i> K6	tgggaagacctcattggtgt	ggatttcggtggattggtat
<i>A. actinomycetemcomitans</i> a	gcaatgatgtattgtctcttttga	cttcagttgaatgggattgactaaaac
<i>A. actinomycetemcomitans</i> b	cgaaatggaatgcttgc	ctgaggaagcctagcaat
<i>A. actinomycetemcomitans</i> c	aatgactgctgcggagt	cgctgaaggtaatgtcag
<i>A. actinomycetemcomitans</i> d	ttaccaggtgtctagtcgga	ggctcctgacaacattggat
<i>A. actinomycetemcomitans</i> e	cgtaagcagaagaatagtaaactg	aataacgatggcacatcagacttt
<i>A. actinomycetemcomitans</i> f	araaytytcwctcggaatg	cctttatcaatccagacagc

Tabla 1. Partidores utilizados para la identificación de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* y los distintos serotipos bacterianos.

Tipificación de *P. gingivalis*(K1-K6) y *A. actinomycetemcomitans* (a-c):

Los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis*(K1-K6) y los serotipos más frecuentemente detectados en humanos del LPS-O-polisacárido de *A. actinomycetemcomitans*(a-c) fueron identificados mediante PCR convencional utilizando partidores específicos (Tabla 1); 100 ng de DNA fueron amplificados utilizando el reactivo GoTaq® Green Master Mix y la amplificación se evaluó mediante electroforesis en gel agarosa 1,5% tal como se describió previamente. Como control positivo, se amplificó el DNA obtenido de cepas bacterianas de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* de serotipo conocido (Tabla 2).

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Serotipo bacteriano</b>
<i>P. gingivalis</i> W83	<i>P. gingivalis</i> K1
<i>P. gingivalis</i> HG184	<i>P. gingivalis</i> K2
<i>P. gingivalis</i> A7A1-28	<i>P. gingivalis</i> K3
<i>P. gingivalis</i> ATCC® 49417™	<i>P. gingivalis</i> K4
<i>P. gingivalis</i> HG1690	<i>P. gingivalis</i> K5
<i>P. gingivalis</i> HG1691	<i>P. gingivalis</i> K6
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC® 43717™	<i>A. actinomycetemcomitans</i> a
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC® 43718™	<i>A. actinomycetemcomitans</i> b
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC® 43719™	<i>A. actinomycetemcomitans</i> c

Tabla 2. Cepas de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* utilizadas como control positivo de los distintos serotipos bacterianos.

#### Análisis de los datos:

El número de pacientes positivos para *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* se expresó como porcentaje de pacientes por los totales analizados. La tipificación de cada microorganismo se expresó en porcentaje. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS v15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA), se compararon utilizando la prueba Chi-cuadrado y se consideraron estadísticamente significativos cuando  $p\text{-value} < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Características de los sujetos:

De los pacientes que acudieron a la clínica de periodoncia de pregrado y postítulo de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, sólo 25 cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos previamente y formaron parte del estudio (14 mujeres y 11 hombres). De éstos, 3 hombres y 7 mujeres fueron diagnosticados con periodontitis agresiva y el resto se diagnosticó con periodontitis crónica moderada o severa (8 hombres y 7 mujeres) (Tabla 3).

	Hombres	Mujeres	Total
Periodontitis Agresiva	12% (3 sujetos)	28% (7 sujetos)	40% (10 sujetos)
Periodontitis Crónica (Moderada o severa)	32% (8 sujetos)	28% (7 sujetos)	60% (15 sujetos)
Total Individuos participantes del estudio	44% (11 sujetos)	56% (14 sujetos)	100%(25 sujetos)

Tabla 3. Porcentaje de hombres y mujeres diagnosticados con periodontitis crónica (moderada o severa) y agresiva, respecto del total de pacientes.

### Cultivo de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*:

Se cultivó una placa por paciente para cada microorganismo, identificando cada placa con un número (P). El cultivo de *A. actinomycetemcomitans* (Imagen2A y 2B) mostró una alta selectividad para esta especie microbiana. El cultivo de *P. gingivalis* (Imagen2C y 2D) mostró un crecimiento bacteriano heterogéneo, observándose colonias pigmentadas de negro, colonias blanquecinas y colonias con características compartidas entre las dos anteriores. De este cultivo, se seleccionaron 8 colonias que concordaban con el aspecto descrito para *P. gingivalis* (Imagen 3) para cultivarlas en placas segmentadas en 8 y proceder a las siguientes pruebas diagnósticas.

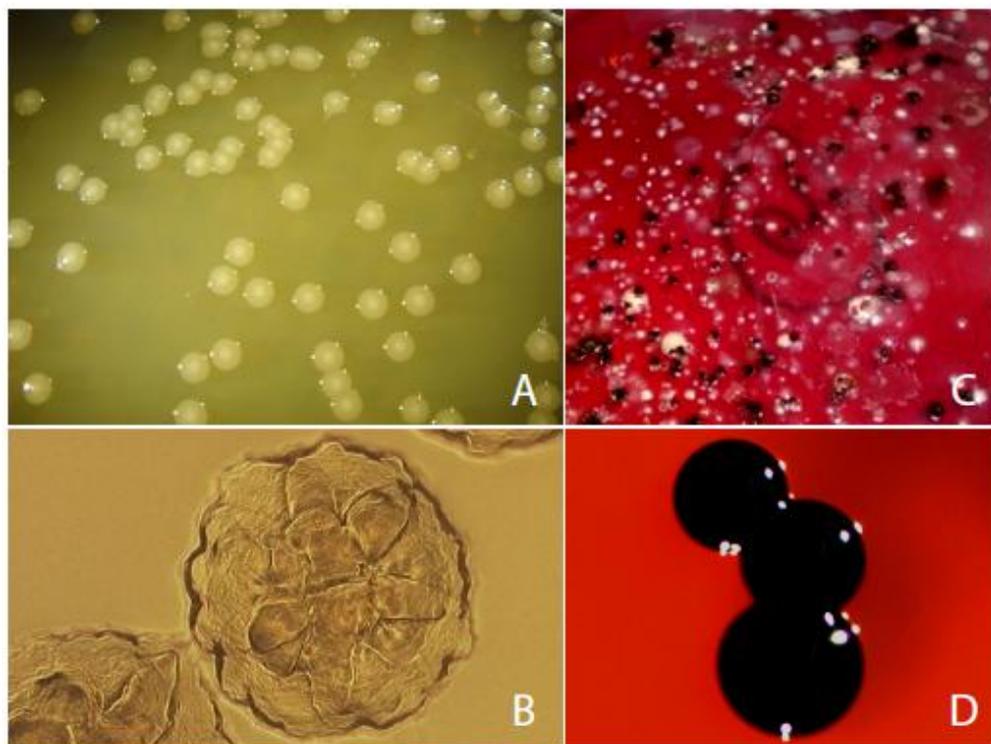


Imagen 2. Cultivos de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. A y B corresponden al cultivo de *A. actinomycetemcomitans*, siendo B una ampliación microscópica de las colonias observadas en A. C y D corresponden al cultivo de *P. gingivalis*, siendo D una ampliación microscópica y purificación de las colonias observadas en C.



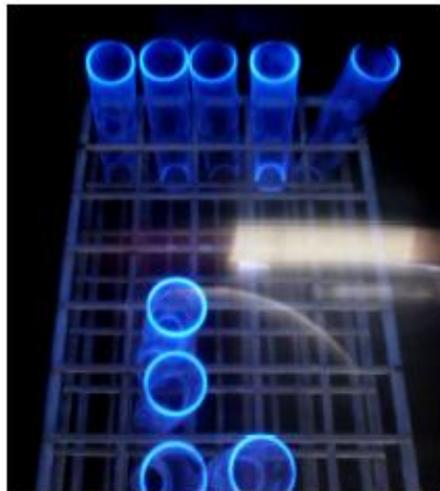
Imagen3. Cultivo de *P. gingivalis* en placa segmentada en 8 para purificar las colonias pigmentadas de negro compatibles con *P. gingivalis*, obtenidas en etapa previa.

### Pruebas bioquímicas:

Para *A. actinomycetemcomitans*, 4 pacientes arrojaron resultado positivo en la prueba de la catalasa (16%) (Imagen 4) y para *P. gingivalis* 10 pacientes fueron negativos en la prueba del metanol (40%) (Imagen 5).



*Imagen 4. Prueba bioquímica de la catalasa. Se observa el burbujeo de la muestra al añadirle peróxido de hidrógeno, resultando positiva para la detección de A. actinomycetemcomitans.*



*Imagen 5. Prueba bioquímica del metanol. Se observa una fluorescencia de color azul, por lo tanto, es negativa para metanol y, así, es positiva para P. gingivalis.*

Identificación de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* mediante amplificación de la subunidad 16S rRNA por PCR:

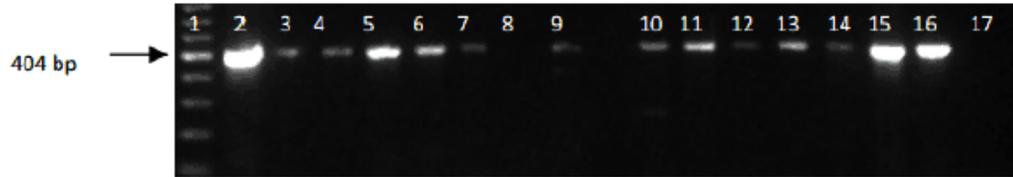
La Imagen6 muestra la identificación de *A. actinomycetemcomitans*. Los carriles 2 a 5 muestran el análisis de los 4 pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*. Para cada paciente, las muestras analizadas corresponden a lesiones periodontales mesio-vestibulares del 1<sup>er</sup> molar superior derecho.



Carril	1	2	3	4	5	6
Pcte.	Control (+) ATCC <sup>®</sup> 43717 <sup>™</sup>	P1	P2	P3	P4	Control (-)

Imagen6. Identificación de *A. actinomycetemcomitans* mediante amplificación de la subunidad 16S RNA por PCR. 4 pacientes afectados de periodontitis agresiva fueron positivos para *A. actinomycetemcomitans*. Carril 1: Cepa de *A. actinomycetemcomitans* ATCC<sup>®</sup> 43717<sup>™</sup>, utilizada como control positivo de amplificación. Carriles 2-5: Muestras microbiológicas analizadas. Carril 6: Agua, como control negativo de amplificación.

La Imagen 7 muestra la identificación de *P. gingivalis*. Los carriles 3-16 son las muestras microbiológicas de los pacientes analizados en este estudio. De ellas, los carriles 3 y 4 contienen 2 muestras obtenidas del mismo paciente (P16), al igual que los carriles 6 y 16 (P18) y 7 y 13 (P7). El carril 8, correspondiente al paciente 6, fue negativo para *P. gingivalis*. En el carril 9, correspondiente a la muestra del paciente 21, se observa el DNA disgregado, motivo por el cual no se incluyó en el análisis final de tipificación.



Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Pcte.	standar	Control (+) ATCC49417	P16	P16	P14	P18 (2)	P7	P6*	P21	P19	P17	P2	P7	P3	P5	P18 (1)	Control (-)

Imagen 7. Identificación de *P. gingivalis* mediante amplificación de la subunidad 16S rRNA por PCR. De las 14 muestras analizadas, 13 fueron positivas para *P. gingivalis*. Carril 1: Control de peso molecular. Carril 2: Cepa de *P. gingivalis* ATCC® 49417™, utilizada como control positivo de amplificación. Carriles 3-16: Muestras microbiológicas analizadas. Carril 17: Agua, como control negativo de amplificación.

La Tabla 4 resume la frecuencia de pacientes positivos tanto para *A. actinomycetemcomitans* como para *P. gingivalis* con respecto al total de pacientes estudiados. Hubo un porcentaje importante de sujetos (44%) en los que no fue identificado *A. actinomycetemcomitans* ni *P. gingivalis*. La Tabla 5 resume la frecuencia de detección de sujetos según el tipo de bacteria identificada y según enfermedad diagnosticada.

	Hombres	Mujeres	Total
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	8 % (2 sujetos)	8% (2 sujetos)	16% (4 sujetos)*
<i>P. gingivalis</i>	16% (4 sujetos)	24% (6 sujetos)	40% (10 sujetos)*
Bacterias no Identificadas	20% (5 sujetos)	24% (6 sujetos)	44% (11 sujetos)
	44% (11 sujetos)	56% (14 sujetos)	100% (25 sujetos)

Tabla 4. Detección de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis (n=25).

\* $p=0,25$ , mediante prueba de Chi-cuadrado.

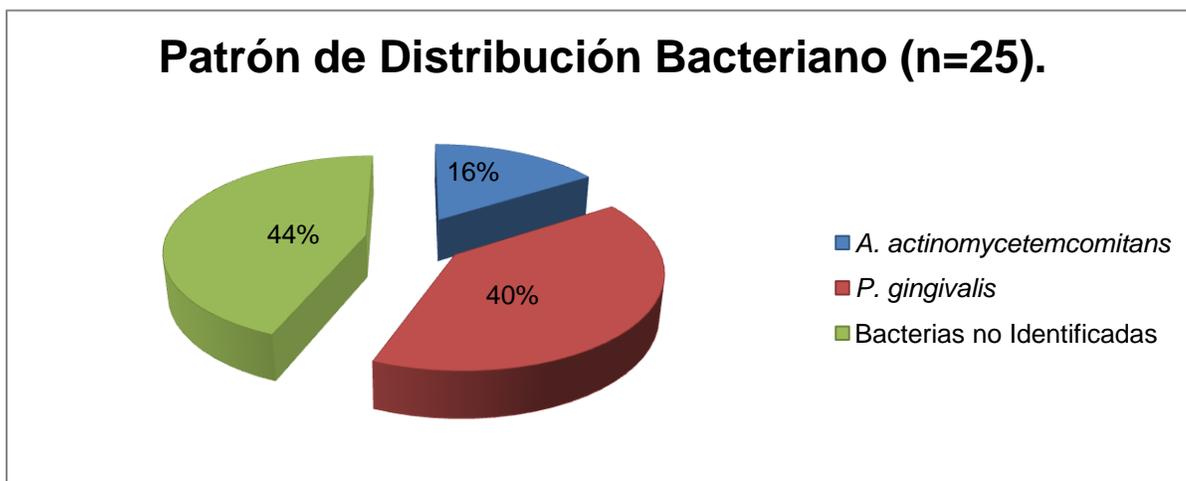


Gráfico 5. Patrón de distribución bacteriano obtenido en este estudio. Es importante destacar el alto porcentaje de bacterias no identificadas que no fueron parte de los resultados de identificación y tipificación de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*.

	P. Agresiva	P. Crónica	Total
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	40% (4 sujetos)	/	4 sujetos
<i>P. gingivalis</i>	40% (4 sujetos)	40% (6 sujetos)	10 sujetos
Bacterias no Identificadas	20% (2 sujetos)	60% (9 sujetos)	11 sujetos
	100% (10 sujetos)	100% (15 sujetos)	25 sujetos

Tabla 5. Detección de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis agresiva (n=10) y *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica (n=15) o periodontitis agresiva (n=10).

#### Tipificación de *A. actinomycetemcomitans*(a-c) por PCR:

Las imágenes 8A-D corresponden a la tipificación de los distintos serotipos (a-c) de *A. actinomycetemcomitans* para los 4 pacientes positivos para éste microorganismo. El carril 1 corresponde a muestras de 1<sup>er</sup> molar superior derecho, el carril 2 a muestras de 1<sup>er</sup> molar superior izquierdo, el carril 3 a muestras de 1<sup>er</sup> molar inferior derecho y el carril 4 a muestras de 1<sup>er</sup> molar inferior izquierdo de cada paciente. H<sub>2</sub>O fue utilizado como control negativo.

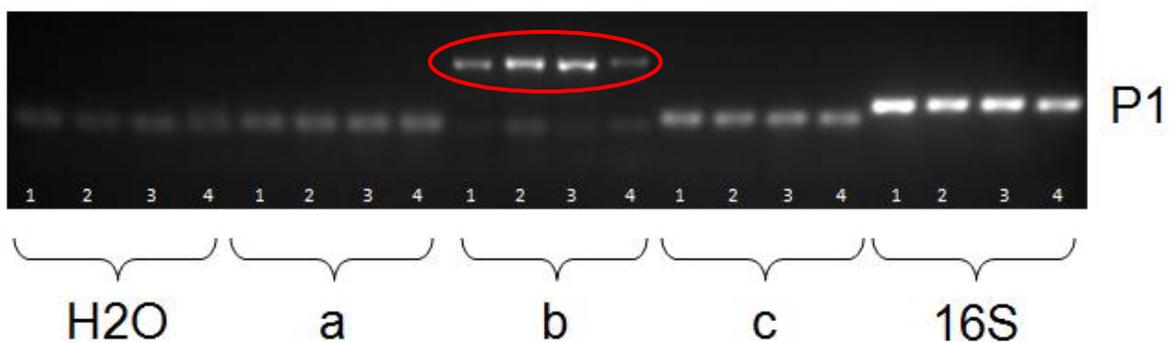


Imagen 8A. Tipificación de los distintos serotipos (a-c) de *A. actinomycetemcomitans* detectados en las superficies mesiovestibulares de los 1<sup>os</sup> molares del paciente 1 (P1). Los 4 sitios periodontales examinados fueron positivos para el serotipo b.

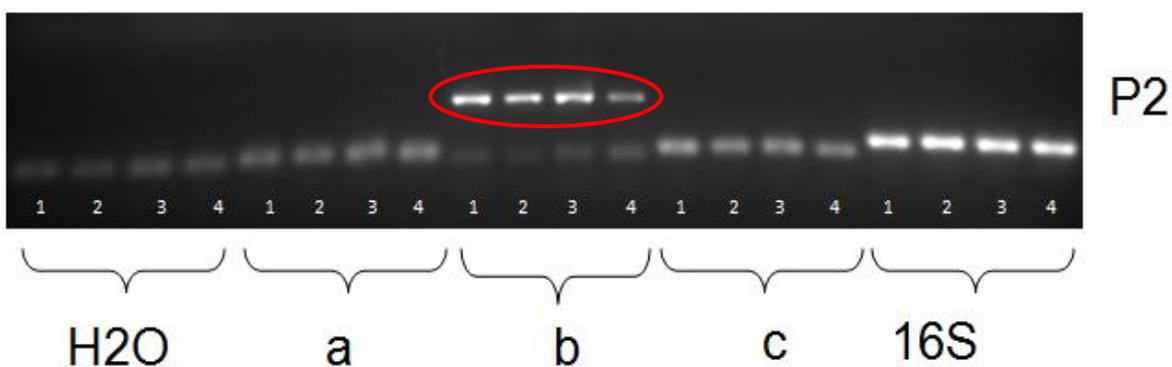


Imagen 8B. Tipificación de los distintos serotipos (a-c) de *A. actinomycetemcomitans* detectados en las superficies mesio-vestibulares de los 1<sup>os</sup> molares del paciente 2 (P2). Los 4 sitios periodontales examinados fueron positivos para el serotipo b.

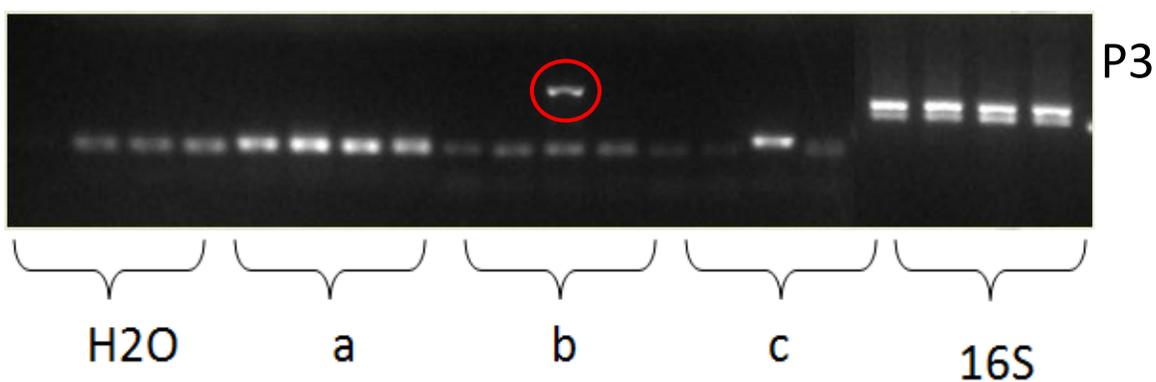


Imagen 8C. Tipificación de los distintos serotipos (a-c) de *A. actinomycetemcomitans* detectados en las superficies mesio-vestibulares de los 1<sup>os</sup> molares del paciente 3 (P3). El serotipo b fue detectado en la lesión periodontal mesio-vestibular del 1<sup>er</sup> molar inferior derecho.

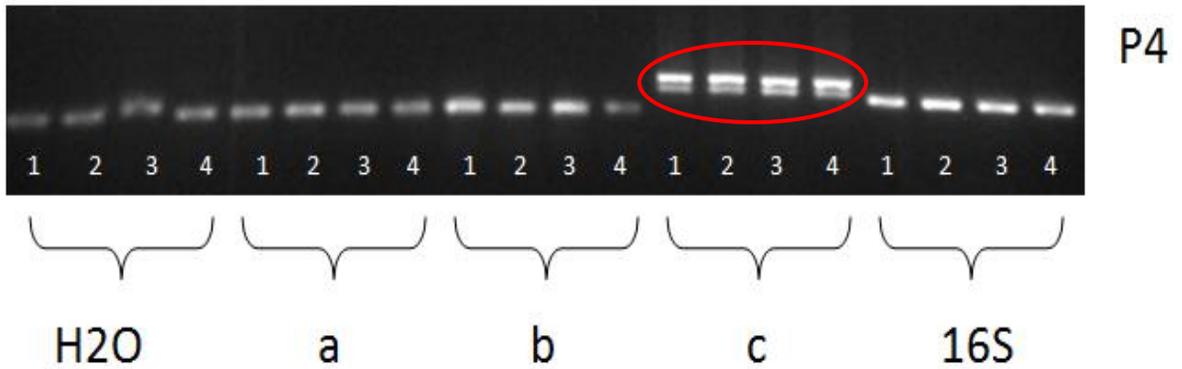


Imagen8D. Tipificación de los distintos serotipos (a-c) de *A. actinomycetemcomitans* detectados en las superficies mesio-vestibulares de los 1<sup>os</sup> molares del paciente 4 (P4). Los 4 sitios periodontales examinados fueron positivos para el serotipo c.

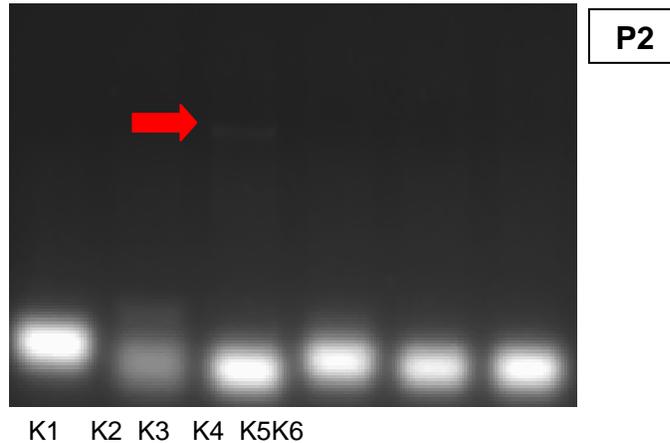
De los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, 3 (75%) sujetos fueron positivos para el serotipo b, indistintamente si era en una lesión periodontal examinada (P3) o en 4 lesiones periodontales (P1 y P2). Sólo 1 paciente (25%) (P4) fue positivo para el serotipo c en los 4 sitios periodontales examinados (Tabla 6).

<b>SEROTIPOS DE AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS</b>			
	a	b	c
Paciente 1	/	+	/
Paciente 2	/	+	/
Paciente 3	/	+	/
Paciente 4	/	/	+
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>3*</b>	<b>1*</b>

Tabla 6. Frecuencia de detección de los distintos serotipos (a-c) de *A. actinomycetemcomitans* en los pacientes *A. actinomycetemcomitans* positivos. \* $p=0,01$ , mediante prueba Chi-cuadrado.

Tipificación de *P. gingivalis*(K1-K6) por PCR:

La imagen muestra una tipificación representativa del paciente 2 (P2) del serotipo de *P. gingivalis* detectado. En el paciente 2 se detecta el serotipo K3.



*Imagen 9. Imagen representativa en el paciente 2 (P2) de la tipificación de los distintos serotipos de P. gingivalis (K1-K6). El paciente fue positivo para el serotipo K3.*

Los serotipos de *P. gingivalis* más frecuentemente detectados fueron el K3, en 6 sujetos (60%), el K2 y K5 en 5 sujetos (50%) y el K6 en 3 pacientes (30%). El serotipo K4 fue detectado sólo en 1 paciente (10%), mientras que el serotipo K1 no fue detectado. Un paciente no pudo ser tipificado (10%). Por otro lado, 1 paciente (10%) fue positivo para un serotipo, 5 sujetos (50%) para 2 serotipos y 3 pacientes para 3 serotipos (30%). El detalle de tipificación por paciente se observa en la Tabla 7.

	Tipo de Enfermedad	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Paciente 2	Periodontitis Agresiva	/	/	+	/	/	/
Paciente 3		/	+	+	/	/	/
Paciente 17		/	+	/	/	+	+
Paciente 5	Periodontitis Crónica	/	+	+	/	/	/
Paciente 7		/	+	+	/	+	/
Paciente 14		/	+	+	/	/	/
Paciente 16		/	/	/	/	+	+
Paciente 18		/	/	/	+	+	/
Paciente 19		/	/	+	/	+	+
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>5*</b>	<b>6*</b>	<b>1</b>	<b>5*</b>	<b>3</b>

Tabla 7. Frecuencia de detección de los distintos serotipos (K1-K6) de *P. gingivalis* en los pacientes *P. gingivalis* positivos. \* $p=0,08$ , mediante prueba Chi-cuadrado.

## DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue tipificar cuáles de los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y/o *P. gingivalis* son los más frecuentemente detectados en pacientes afectados de periodontitis, tanto crónica como agresiva, que presentaron estos microorganismos en su biofilm subgingival.

Es relevante precisar la baja prevalencia de la periodontitis agresiva en la población mundial. En la investigación de prevalencia de periodonto-patógenos de Gajardo y cols., se evaluaron 30 pacientes con periodontitis agresiva localizada y 6 con periodontitis agresiva generalizada; dentro del primer grupo *A. actinomycetemcomitans* fue aislado en 5 sujetos (16,6%) y dentro del segundo grupo en 2 sujetos (33,3%) (Gajardo y cols., 2005). A pesar de no ser un estudio de prevalencia, en la presente investigación se aisló *A. actinomycetemcomitans* en un 40% de los sujetos con periodontitis agresiva (n=10), pero en un 16% del total de pacientes (n=25); con estos antecedentes se podría elucubrar una cierta dificultad para obtener muestras de pacientes con periodontitis agresiva que, simultáneamente, posean *A. actinomycetemcomitans* en su biofilm subgingival. En el mismo trabajo de Gajardo y cols., en pacientes con periodontitis crónica *A. actinomycetemcomitans* fue aislado en 6 de 17 sujetos (35,3%) (Gajardo y cols., 2005), a diferencia del resultado del presente trabajo, donde no se aisló *A. actinomycetemcomitans* en muestras de pacientes con periodontitis crónica.

En el mismo estudio de Gajardo y cols., *P. gingivalis* fue aislado en el 76,5% de los pacientes con periodontitis crónica, en el 86,6% de los pacientes con periodontitis agresiva localizada y en el 100% de los pacientes con periodontitis agresiva generalizada (Gajardo y cols., 2005). En el presente trabajo *P. gingivalis* fue aislado en un 40% de los pacientes con periodontitis agresiva (n=10), en un 40% de los pacientes con periodontitis crónica (n=15) y en un 40% del total de pacientes (n=25). Con estos antecedentes es válido concluir que la presencia de *P. gingivalis* es mayor que la de *A. actinomycetemcomitans* en sujetos afectados de periodontitis.

Una posible explicación a la evidencia anterior es el reciente descubrimiento de una relación inversa entre los niveles de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, lo cual fue corroborado con un estudio que estipula una correlación negativa entre las proporciones de *A. actinomycetemcomitans* y las bacterias del complejo rojo (*T. forsythensis*, *P. gingivalis* y *T. dentícola*) en sujetos con periodontitis (Faveri y cols., 2009). Lo anterior está en concordancia con lo encontrado en la literatura, donde se ha establecido que *A. actinomycetemcomitans* está presente en <1% del total de bacterias subgingivales cultivables, en contraste con *P. gingivalis* que frecuentemente compromete >1%-10% del total de bacterias cultivables (Asikainen y Chen, 1999). Para explicar esto, se ha sugerido que *A. actinomycetemcomitans* podría estar involucrada con el inicio de la enfermedad y se encuentra en altos niveles en sacos periodontales de baja y mediana profundidad debido a su necesidad de capnofilia; mientras los patógenos del complejo rojo, como *P. gingivalis*, se asocian con la progresión de la periodontitis y se encuentran en sacos periodontales más profundos, debido a su necesidad de anaerobiosis estricta (Faveri y cols., 2009).

Los resultados de este trabajo establecen la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* en un 16% de los sujetos participantes (n=25). En Alemania y Corea, de 194 sujetos, 45 (23,2%) demostraron presencia de *A. actinomycetemcomitans* (24 alemanes y 21 coreanos) (Kim y cols., 2009); mientras en Estados Unidos, la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* fue de 27,45% (14 de 51 pacientes). En Grecia, investigaciones demostraron que *A. actinomycetemcomitans* está presente en 40 de 228 sujetos estudiados (17,54%) (Sakellari y cols., 2011); mientras que finalmente en Brasil, de 486 pacientes, 85 (17,5%) fueron positivos para *A. actinomycetemcomitans* (Gonçalves y cols., 2010). Estos antecedentes permiten elucubrar que las diferencias entre los resultados obtenidos en este estudio y los de Alemania, Corea y Estados Unidos, podrían atribuirse a las diferencias étnicas y geográficas, aunque esto no sería válido para el caso de Grecia y Brasil, ya que los porcentajes de detección son muy similares a los obtenidos en la presente investigación.

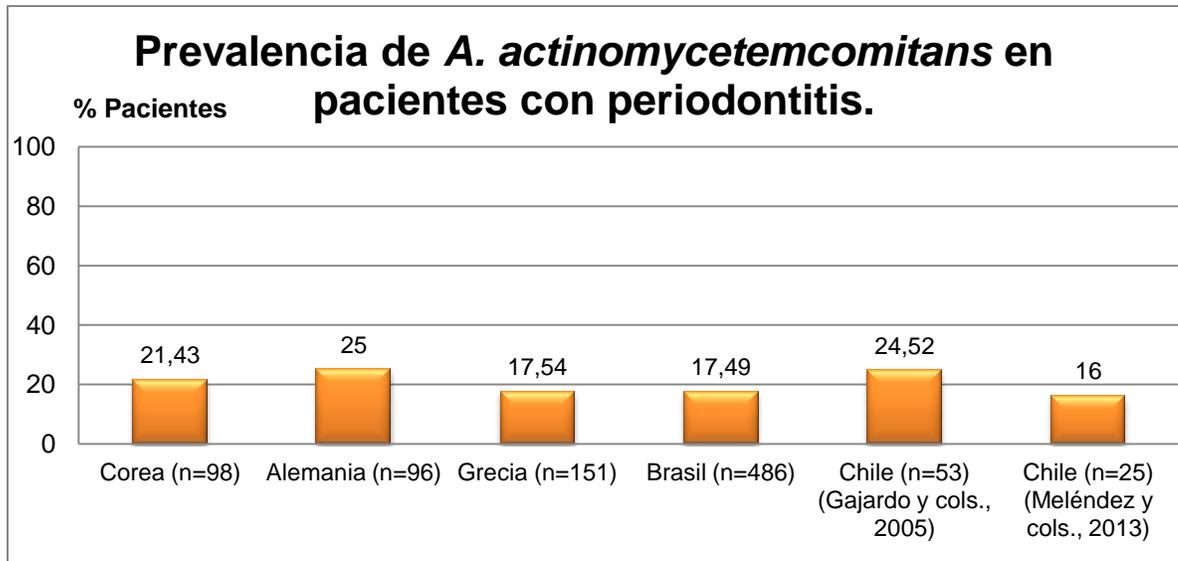


Gráfico 6. Prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis en distintas poblaciones y su frecuencia de detección en esta investigación. El porcentaje calculado se obtuvo del total de pacientes en estudio.

Con respecto a la frecuencia de detección de *P. gingivalis*, la presente investigación demostró su presencia en un 40% de los pacientes participantes (n=25), resultados que difieren con los encontrados en la literatura. En Indonesia, 106 de 158 sujetos (67%) dieron positivo para *P. gingivalis* (van Winkelhoff y cols., 1999), mientras que el estudio multicéntrico de Chile, Colombia y España se demostró que *P. gingivalis* fue aislado en más del 65% del total de sujetos (37 en Chile, 41 en Colombia y 36 en España) (Herrera y cols., 2008). Las posibles razones que explicarían esta diferencia de resultados, como se dijo anteriormente, serían las diferencias geográficas y étnicas, además de la estrategia de toma de muestra y la cantidad de pacientes analizados (158 en Indonesia, 114 en el estudio multicéntrico y 25 en esta investigación); pero principalmente se podría deber a la contaminación de la placa de cultivo de *P. gingivalis* que impidió aislar las colonias para su identificación mediante PCR, engrosando el porcentaje de bacterias no identificadas (44%) que podrían haber resultado ser *P. gingivalis* positivas.

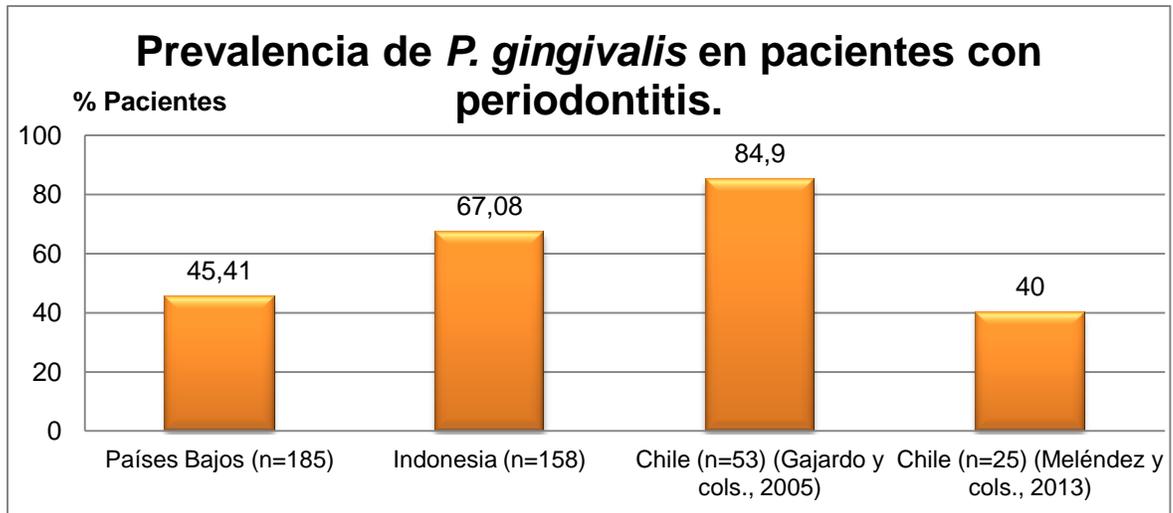


Gráfico 7. Prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis de distintas poblaciones y su frecuencia de detección en esta investigación. El porcentaje calculado se obtuvo del total de pacientes en estudio

Con respecto a la tipificación de *A. actinomycetemcomitans*, se han estudiado los patrones de distribución de sus serotipos en numerosos estudios. Éstos han concluido que los serotipos no se distribuyen de manera uniforme, si no que se ven influenciados por razones similares a las anteriormente expuestas, como variaciones geográficas y entre sujetos de la misma etnia, incluso se ha demostrado que el patrón de distribución de los serotipos dentro de la misma población puede cambiar en el tiempo, como se demostró en el estudio de van der Reijden donde se evaluó a sujetos con periodontitis en Indonesia desde 1994 a 2002 (van der Reijden y cols., 2008). Aún cuando no existe una distribución uniforme, se ha demostrado que los serotipos a, b y c son los más prevalentes en la cavidad oral de seres humanos, donde en conjunto superan el 70% o más de todos los aislados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* (Saarela y cols., 1992; Fine y cols., 2007).

Esta investigación demuestra que, de los 4 pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, 3 poseían el serotipo b (75%) y 1 el serotipo c (25%). Con respecto a la prevalencia del serotipo b, la evidencia describe porcentajes elevados, desde un 70% en el trabajo de Ioannou (Ioannou y cols., 2009) hasta un 87,5% en el estudio de Xajigeorgiou (Xajigeorgiou y cols., 2006). En Filadelfia, Estados Unidos, el 42,6% de los participantes dio serotipo b y el 29,5% serotipo c (Yang y cols., 2004). Por otro lado en Grecia (Sakellari y cols., 2011) y Brasil (Gonçalves y cols., 2010), los resultados fueron mayores para el serotipo c con un 37,5% y un 47,05%, respectivamente, mientras el serotipo b sólo fue aislado en un 10% y 7,05%, respectivamente.

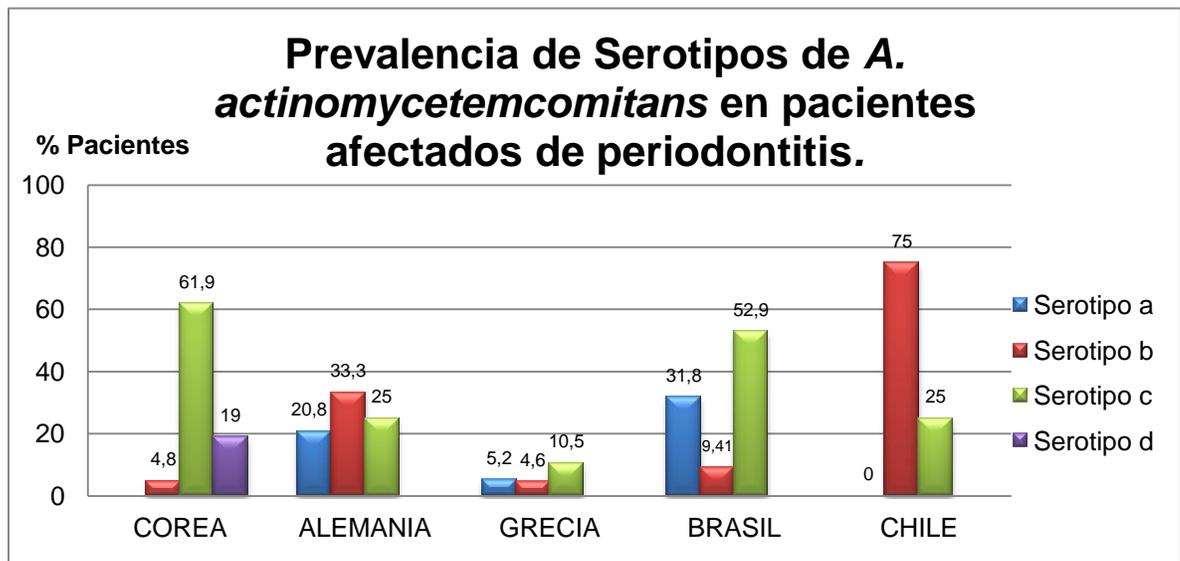


Gráfico 8. Prevalencia de los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes afectados de periodontitis en distintas poblaciones y sus frecuencias de detección en esta investigación. El porcentaje calculado se obtuvo considerando como el 100% los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, estipulados en el Gráfico 6.

Investigaciones recientes han demostrado que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* es capaz de estimular células dendríticas, las que experimentan un aumento en la producción de citoquinas (Díaz-Zúñiga y cols., 2013), mientras que en los linfocitos T se evidencia un incremento en la expresión de los factores de transcripción T-bet y RORC2, las citoquinas asociadas a Th1 y Th17 y el factor asociado a la reabsorción del hueso alveolar RANKL (Vernal y cols., 2013). Con la evidencia anterior es plausible pensar que la severidad de los pacientes con periodontitis, manifestada con una rápida destrucción del periodonto

de inserción y evaluados en este estudio, se explicaría en parte por la presencia de *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, el que fue detectado en un 75% de ellos.

Con respecto a la tipificación de *P. gingivalis*, los resultados de éste estudio establecen que los serotipos más frecuentemente detectados fueron el K3, en un 60%, el K2 y K5 en un 50% y el K6 en un 30%. El serotipo K4 fue detectado en un 10%, mientras que el serotipo K1 no fue detectado. Esto último está en concordancia con un estudio en Indonesia, donde el serotipo K1 tampoco fue detectado; sin embargo, los serotipos más prevalentes fueron el K5 (25%) y el K6 (8%) (van Winkelhoff y cols., 1999). Resultados obtenidos en los Países Bajos arrojaron que el serotipo más prevalente fue el K6 (23,2%), mientras que los serotipos K5, K3 y K1 se distribuyeron en un 12%, 1,1% y 3,7%, respectivamente. El serotipo K6 fue encontrado en similares porcentajes en Suecia (23%), donde el serotipo K1 alcanzó el 5% y el K3 resultó indetectable. La disparidad de resultados encontrados podría ser explicada debido a que los serotipos de *P. gingivalis* variarían entre individuos europeos, asiáticos y latinoamericanos, teniendo cápsulas con composiciones de polisacáridos distintas.

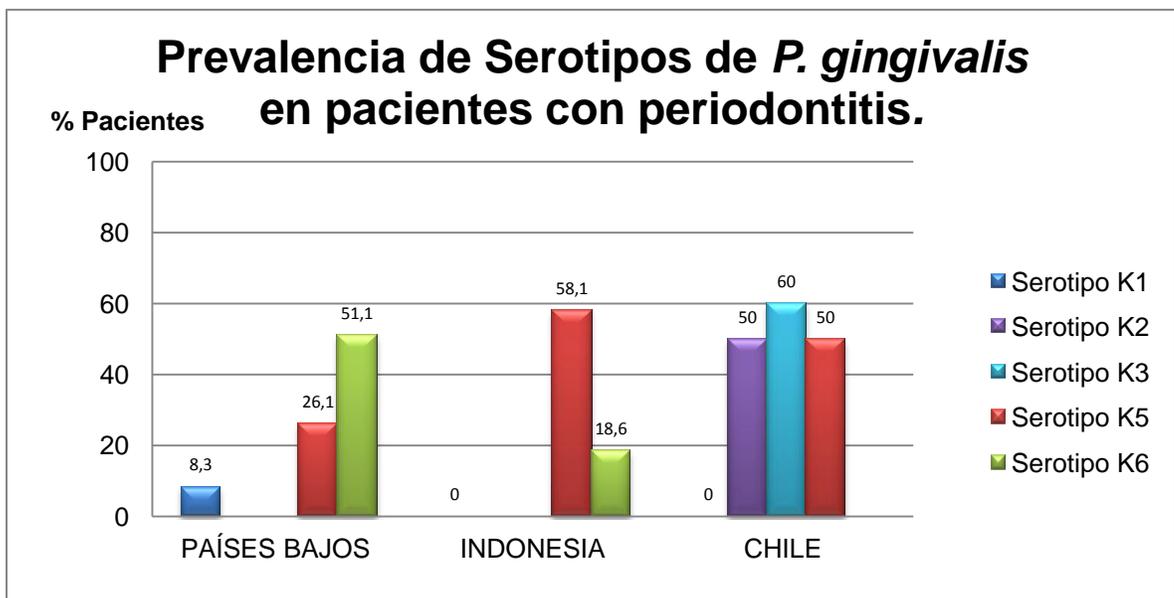


Gráfico 9. Prevalencia de los serotipos de *P. gingivalis* en pacientes afectados de periodontitis en distintas poblaciones y sus frecuencias de detección en esta investigación. El porcentaje calculado se obtuvo considerando como el 100% los pacientes positivos para *P. gingivalis*, estipulados en el Gráfico 7. Es relevante destacar que los altos porcentajes obtenidos en estudio se deben a que se aisló más de un serotipo por paciente.

Cabe destacar que este estudio demostró la presencia de más de un serotipo por paciente, lo que nos lleva a concluir que es posible la colonización de variados serotipos de *P. gingivalis* en el mismo sujeto, pero no se puede establecer con seguridad de que área muestreada provienen, puesto que se realizó un pool de muestras por paciente. Lo anterior no se cumple para *A. actinomycetemcomitans*, puesto que es una bacteria sitio-específica, desplazando a sus pares de su entorno e impidiendo aislar más de un serotipo por paciente. Es por esto que no se realizó un pool de muestras por sujeto y se analizó cada sitio por separado.

Los serotipos K1 y K2 son capaces de inducir una mayor respuesta en las células dendríticas humanas (Vernal y cols., 2008; Vernal y cols., 2009) y en linfocitos T una expresión elevada de T-bet y RORC2, un aumento en la secreción y producción de citoquinas Th1 y Th17 y del factor RANKL (Vernal y cols., 2013). Considerando lo anterior y los resultados obtenidos en este trabajo, con un predominio de los serotipos K3, K2 y K5, se concluye que no necesariamente los pacientes con periodontitis tienen el serotipo más virulento (K1), si no que pueden poseer otros serotipos capaces de generar inmunogenicidad pero a una menor escala (K3 y K5 en éste trabajo) con un patrón de destrucción menos agresivo, determinando la cronicidad característica de la enfermedad.

Las diferencias entre los resultados de la literatura recién presentados y los obtenidos en este estudio piloto en Chile, en relación a frecuencia de detección de serotipos bacterianos, se podría explicar por diferencias geográficas y de etnia, uso de una distinta metodología de obtención de muestras microbiológicas a las utilizadas en otros estudios y métodos de procesamiento de las mismas, muestra pequeña, poco representativa de participantes, y muestreo por conveniencia (éstas últimas debido al tiempo disponible para el estudio). Lo anterior podría implicar una limitación y un impedimento para extrapolar los resultados obtenidos a otras poblaciones e incluso dentro de la misma población chilena. Es por esto que se propone realizar nuevos estudios sobre el tema y así ampliar la evidencia obtenida en esta investigación.

Sin embargo, éste estudio es el primero en el país que intenta dilucidar qué serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* son los más prevalentes,

puesto que existen pocos estudios microbiológicos y, sobre todo, de prevalencia de periodonto-patógenos en Chile. En efecto, casi toda la evidencia disponible se basa en la de otros países, algunos lejanos y poco similares con la población chilena. Es por esto que resulta relevante éste estudio, ya que al ser conocida la etiopatogenia de la enfermedad y, además, determinados los serotipos más prevalentes, podremos enfocar de manera más dirigida los tratamientos. Lo último se podría aplicar, considerando que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* es más frecuente y más virulento, en los pacientes con periodontitis agresiva, los que tendrían enfermedades más severas y, por ende, sus tratamientos deberían ser más dirigidos y enfocados hacia terapias periodontales de soporte más frecuentes en el tiempo, poniéndose especial énfasis en la prevención y control de factores agravantes, tales como: tabaquismo, mala higiene oral, enfermedades generales, entre otros.

Es por esto último que, a pesar que los tratamientos convencionales son en la mayoría de los casos efectivos, se realiza una constante investigación para mejorar las terapias periodontales mediante tratamientos complementarios. Recientemente, ha habido un interés creciente en dilucidar el impacto que tendría el uso de probióticos en la salud oral y en el control de las enfermedades periodontales, donde uno de los mecanismos de acción más importantes es actuar como vehículo para el reemplazo de bacterias patógenas por microorganismos beneficiosos (Caglar y cols., 2005). Esto se podría realizar mediante dos formas, la primera: usando la misma especie bacteriana pero con un serotipo menos inmunogénico, y la segunda: usando una forma mutada del serotipo más inmunogénico. Se plantea que esto último se podría realizar intercambiando bacterias virulentas por aquellas con serotipos protectores o presentes en pacientes sanos, mediante la ingesta de probióticos que los contengan, siendo éstos capaces de colonizar los nichos ecológicos ocupados por la versión virulenta de la bacteria, comenzando a formar parte del biofilm subgingival e impidiendo la recolonización del periodonto-patógeno que lo precedió.

A pesar de lo prometedor de esta nueva evidencia, aún no se logra este intercambio *in vivo* mediante probióticos, puesto que el nivel de organización del

biofilm oral es tal que no ha permitido la penetración de otros microorganismos beneficiosos que ocupen el mismo nicho ecológico de la bacteria virulenta. Sin embargo, los resultados de este trabajo de investigación, y nuevas investigaciones en un futuro cercano, podrían contribuir a establecer nuevas formas de tratamiento más específicas en relación al componente microbiológico de la periodontitis, estableciendo nuevos parámetros de riesgo periodontal.

## CONCLUSIONES

1. Se identificó la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en el 40% y de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el 16% del total de pacientes afectados de periodontitis (n=25).
2. Se identificó *Porphyromonas gingivalis* en el 40% de los pacientes con periodontitis crónica (n=15) y en el 40% de los pacientes con periodontitis agresiva (n=10). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* fue identificado en el 40% de los pacientes con periodontitis agresiva (n=10).
3. En el caso de periodontitis crónica y periodontitis agresiva, el serotipo de *Porphyromonas gingivalis* más frecuentemente detectado fue el K3, K2 y K5.
4. En el caso de periodontitis agresiva, el serotipo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* más frecuentemente detectado fue el b.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S (2000). Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. *J Dent Res*79:1664-1668.
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N (2004). Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*39:136-142.
- Armitage G (1995). Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 7:39-53.
- Armitage G (2005). Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. *Periodontol 2000 (Ed Esp)*9:9-21.
- Asikainen S, Chen C (1999). Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000* 20:65-81.
- Beikler T, Peters U, Prior K, Eijmke B, Flemmig TF (2005). Sequence variations in rgpA and rgpB of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *J Periodontal Res*40(3):193-198.
- Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S(2005).Effect of yogurt with *Bifidobacterium DN-173 010* onsalivary *mutans streptococci* and *lactobacilli* in young adults. *Acta OdontolScand* 63(6):317-320.
- Casas A,Herrera D, Martín-Carnes J, González I, O'Connor A, SanzM (2007). Influence of Sampling Strategy onMicrobiological Results Before and AfterPeriodontal Treatment. *J Periodontol* 78(6):1103-1112.
- Chen C, Slots J (1999). Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*20:53-64.
- d'Empaire G, Baer M, Gibson F (2006). K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infect Immun*74(11):6236-6243.

Díaz R, Ghofaily L, Patel J, Balashova N, Freitas A, Labib I y cols. (2006). Characterization of leukotoxin from a clinical strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog* 40:48-55.

Díaz-Zúñiga J, Yáñez J, Álvarez C, Melgar-Rodríguez S, Hernández M, Sanz M y cols.(2013).Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* en prensa.

Díaz-Zúñiga J, Yáñez J, Melgar S, Álvarez C, Rojas C, Vernal R (2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*5(1):40-45.

Dixon D, Darveau R (2005). Lipopolysaccharide heterogeneity: Innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res*84:584-595.

Eke P, Dye B, Wei L, Thornton-Evans G, Genco R (2012). Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 91(10):914-920.

Enersen M, Olsen I, Kvalheim O, Caugant D (2008). *fimA* genotypes and multilocus sequence types of *Porphyromonas gingivalis* from patients with periodontitis. *J Clin Microbiol* 46:31-42.

Faveri M, Figueiredo I, Duarte P, Mestnik M, Mayer M, Feres M (2009).Microbiologicalprofile of untreated subjects with localized aggressiveperiodontitis. *J Clin Periodontol* 36:739–749.

Fine D, Furgang D, Schreiner H, Goncharoff P, Charlesworth J, Ghazwan G y cols. (1999).Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. *Microbiol*145(6):1335-1347.

Fine D, Markowitz K, Furgang D (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis:longitudinal cohort study of initially healthy adolescents.*J Clin Microbiol* 45:3859–3869.

Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A y cols.(2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 76:289-294.

Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I, Aranda W y cols.(2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol* 81:1403-1410.

Gjeramo P, Rösing C, Susin C, Oppermann R (2002). Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000* 29:70-78.

Gonçalves C, Romeiro D, Cavalca S, Nobre G, Guimarães J, Corraini P y cols.(2010). Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Archives of oral biology* 55:242-248.

Haffajee A, Socransky S (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol 2000* 5:78-111.

Herath T, Wang Y, Seneviratne C, Lu Q, Darveau R, Wang C y cols. (2011). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 38:694-701.

Herrera D, Contreras A, Gamonal G, Oteo A, Jaramillo A, Silva N y cols.(2008). Subgingival microbial profile in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 35:106-113.

Hiramine H, Watanabe K, Hamada N, Umemoto T (2003). *Porphyromonas gingivalis* 67-kDa fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2. *FEMS Microbiology Letters* 229:49-55.

Ioannou I, Dimitriadis N, Papadimitriou K, Sakellari D, Vouros I, Konstantinidis A (2009). Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial. *J Clin Periodontol* 36:132-141.

- Jain S, Darveau R (2010). Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol 2000* 54:53–70
- Kikkert R, Laine M, Aarden L, van Winkelhoff A (2007). Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 22:145-151.
- Kim T, Frank P, Eickholz P, Eick S, Kwan C (2009). Serotypes of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *J Periodontol* 80:2020-2027.
- Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S (2009). Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res* 88(8):741-745.
- Kubinowa M, Inaba H, Amano A (2000). Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. *Periodontol 2000* 54(1):136-159.
- Laine M, Appelmeik B, van Winkelhoff A (1996). Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 31(4):278-284.
- Laine M, Appelmeik B, van Winkelhoff A (1997). Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *J Dent Res* 76(12):1840-1844.
- Laine M, van Winkelhoff A (1998). Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 13(5):322-325.
- Meurman J, Sanz M, Janket S (2004). Oral health atherosclerosis and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:403-413.
- Norskov-lauritsen N, Kilian M (2006). Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *haemophilus aphrophilus*, *haemophilus paraphrofilus* and *haemofilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-

dependent and V factor independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*56(9):2135-2146.

Offenbacher S, Lief S, Boggess K, Murtha A, Madianos P, Champagne C y cols. (2001). Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Ann Periodontol*6:164-174.

Poltorak A, He X, Smirnova I y cols (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene. *Science*282:2085-2088.

Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhalea L, Lai C, Jousimies-Somer H (1992). Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol Immunol* 7:277-279.

Sakellari D, Katsikari A, Slini T, Loannidis L, Konstantinidis A, Arsenakis M (2011). Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *J Clin Periodontol*38:108-114.

Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr. R (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*25:134-144.

Stathopoulou P, Galicia J, Benakanakere M, García C, Potempa J, Kinane D (2009). *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiol*9:107.

Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T (2001). Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 39:2002-2005.

Teixeira S, Mattarazo F, Ferez M, Figueredo L, Faveri M, Simionato M y cols. (2009). Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*26:482-487.

van der Reijden W, Bosch-Tijhof C, van der Velden U, van Winkelhoff A (2008). Java projecton periodontal diseases: serotype distribution

of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotypedynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol* 35:487–492.

van Winkelhoff A, Laine M, Timmerman M, van der Weijden G, Abbas F, Winkel E y cols. (1999). Prevalence and serotyping of *Porphyromonas gingivalis* in an Indonesian population. *J Clin Periodontol* 26:301-305.

Vernal R, Díaz-Guerra E, Silva A, Sanz M, García-Sanz J (2013). Distinct human T-lymphocyte responses triggered by *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol* en prensa.

Vernal R, León R, Herrera D, García-Sanz J, Silva A, Sanz M (2008). Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res* 43:689-697.

Vernal R, León R, Silva A, van Winkelhoff A, García-Sanz J, Sanz M (2009). Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol* 36:823-829.

Xajigeorgiou C, Sakellari D, Slini T, Baka A, Konstantinidis A (2006). Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 33:254-264.

Xynogala I, Volgina A, DiRienzo J, Korostoff J (2009). Evaluation of the humoral immune response to the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in subjects with localized aggressive periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 24(Pt 2):116-123.

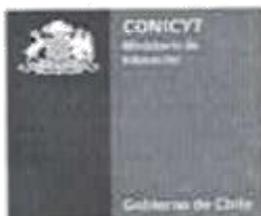
Yang H, Asikainen S, Dogan B, Suda R, Lai C (2004). Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 75:592–599.

Yoshino T, Laine M, van Winkelhoff A, Dahlén G (2007). Genotype variation and capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* from chronic periodontitis and periodontal abscesses. *FEMS Microbiol Lett* 270(1):75-81.

Zhang T, Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Du Y, Ogushi S, Yamamoto M (2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *Immunol Med Microbiol* 59:143-151.

## ANEXOS Y APÉNDICES

### 1.-Consentimiento informado:



Comisión Nacional de Investigación  
Científica y Tecnológica - CONICYT

N°018/FONDECYT/ Medicina.G1/0069

Santiago,

23 ENE 2012

**Señor**  
**Rolando Vernal Astudillo**  
**Investigador Responsable Proyecto FONDECYT N°11100298**  
**Universidad de Chile**  
**Facultad de Odontología**  
**Depto. Odontología Conservadora**  
**Sergio Livingstone 943**  
**Santiago**

Estimado Sr. Vernal:

Me dirijo a Ud. a fin de confirmarle que el Comité Asesor de Bioética de FONDECYT revisó los antecedentes enviados y consideró que se dio una adecuada respuesta a las observaciones planteadas previamente y se adjuntaron los consentimientos informados modificados.

Estos antecedentes pasaron a formar parte de su proyecto. Se envía copia del consentimiento informado visado por nuestro comité.

Saluda atentamente a Ud.,

MARIO HAMUY WACKENHUT  
Presidente  
Consejo Superior de Ciencia  
Programa FONDECYT

SNV/pap

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

### Título del proyecto:

Impacto de la variabilidad bacteriana patógena periodontal en la respuesta inmune en humanos.  
Asociación de serotipos bacterianos específicos con la salud o enfermedad periodontal.

### Objetivo de la investigación:

El propósito del presente estudio es entender la respuesta defensiva que se desarrolla en las personas durante la infección de la encía y los dientes (gingivitis y periodontitis). En particular, analizar ciertas moléculas llamadas citoquinas que se producen en las células defensivas cuando se estimulan con 2 bacterias que causan la enfermedad: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*.

### Personas estudiadas:

Se seleccionarán 30 pacientes enfermos de periodontitis agresiva, 30 pacientes enfermos de periodontitis crónica y 30 personas con las encías sanas. Todas las personas serán mayores de 30 años de edad y serán invitados a participar voluntariamente del estudio.

La persona invitada a participar del estudio tiene el derecho de rechazar la incorporación, retirar sus datos o abandonar el estudio en cualquier momento, sin que ello afecte, modifique o implique suspensión de su tratamiento dental.

Las personas que participen en el estudio NO recibirán retribución económica o material.

### Examen clínico y toma de la muestra:

A las personas que participen del estudio se les realizará un examen dental completo y, si ingresan al estudio, se le tomará de una muestra de 10 mililitros de sangre venosa, que se obtendrá mediante punción en una vena del antebrazo utilizando los procedimientos estándar (agujas y jeringa).



Procedimiento de laboratorio y destino de las muestras de sangre:

Las muestras de sangre se utilizarán para aislar células, las que en los experimentos se estimularán con las bacterias en estudio para analizar las citoquinas que producen. Cualquier resto sobrante de sangre será destruido.

En las muestras de sangre NO se realizarán estudios genéticos.

Complicaciones que pueden suceder por la toma de las muestras de sangre:

El procedimiento de toma de muestra de sangre es inocuo y estándar. Aún así, en algunos casos puede ocurrir una leve molestia durante la punción con la aguja, desvanecimiento o la aparición de un hematoma o moretón en la zona de punción pasado algunos minutos. Todas estas complicaciones no implicarán riesgo, daño ni detrimento alguno en la salud o en la integridad física y/o síquica de las personas participantes.

Duración de la participación de las personas en el estudio:

Después de realizado el examen dental y tomada la muestra de sangre, si es necesario, al paciente se le realizará el tratamiento dental indicado en un plazo no superior a 2 semanas de realizado el diagnóstico. Una vez tomada la muestra de sangre, el paciente terminará su participación en el estudio.

Beneficios por participar en el estudio:

Los pacientes NO recibirán beneficios directos por participar en el estudio.

El estudio contribuirá a ampliar el conocimiento sobre las defensas de las personas cuando existen infecciones de las encías y los dientes (gingivitis y periodontitis). Esto implica beneficios para el investigador y eventualmente para la odontología clínica.

Aunque los resultados del estudio no implicarán un cambio en el tratamiento dental que los pacientes podrán recibir, los participantes pueden solicitar, si lo desean, información y resultados del análisis individual y de todo el estudio.



Confidencialidad de los datos:

Todos los datos del paciente serán reservados y sólo se registrarán en la ficha clínica del paciente, manteniendo la confidencialidad tal como lo establece la normativa vigente.

Responsable del Proyecto de Investigación:

El responsable del Proyecto de Investigación es el Profesor Dr. Rolando Vernal Astudillo, quien trabaja en el Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile y que para tal efecto se domicilia en la calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.

Los pacientes pueden contactar al investigador cuando lo deseen para plantear cualquier duda que deseen aclarar.

Institución patrocinante:

La institución patrocinante del Responsable del Proyecto de Investigación es la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Comité Ético Científico:

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Este Comité es presidido por el Prof. Dr. Juan Cortés Araya, quien se domicilia en la calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.

Este Comité es independiente de los investigadores y no tiene conflictos de interés con la industria farmacéutica, cosmética y/o alimentaria.

El paciente que acepte participar en el presente estudio puede solicitar una copia del certificado de aprobación del Proyecto emitido por el Comité.



FORMULARIO  
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaración del paciente:

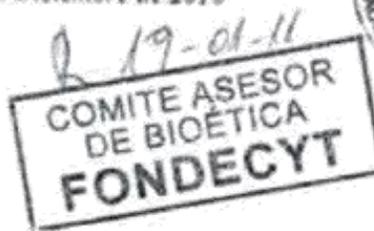
He comprendido las explicaciones que se me han dado, en un lenguaje claro y sencillo, y el investigador me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado.

He comprendido que en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que presto ahora y abandonar la investigación.

Acepto voluntariamente tomar parte en el estudio.

<p><u>Identificación del Paciente:</u></p> <p>Nombre:</p> <p>Rut:</p> <p>Fono:</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">Firma</p> <p><u>Fecha de la firma del paciente:</u></p>	<p><u>Identificación del Investigador Responsable:</u></p> <p>Nombre: Rolando Vernal Astudillo</p> <p>Rut: 11.635.874-3</p> <p>Fono: +56-3-9781815</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">Firma</p>
--	--

Edición del Formulario de Consentimiento Informado: Diciembre de 2010



2.- Ficha clínica:

Nombre		F. de Nacimiento
Rut		Edad
Genero		

Enf. Sistémicas:	Diabetes	Enf. Cardiovasculares	Enf. Endocrinas	Otra	¿Cuál?

Diagnostico periodontal	Periodontitis Crónica	Periodontitis Agresiva
	Localizada	Localizada
	Moderada	Generalizada
	Generalizada	Severa

Última visita al dentista	> 6 meses	< 6 meses
	¿Qué le hicieron?	

Tratamiento periodontal previo	Si	No
--------------------------------	----	----

Uso de colutorio CHX u otro	Si	No
-----------------------------	----	----

Consumo de antibióticos	> 6 meses	< 6 meses
	Necesidad para tratamiento periodontal	Si No
	¿Por qué?	

Embarazo	Si	No
----------	----	----

Lactancia	Si	No
-----------	----	----

Tabaquismo	Si	No
	1-9 diarios	
	≥ 10 diarios	

Presencia Aa en muestra	Si	No
-------------------------	----	----

Presencia Pg en muestra	Si	No
-------------------------	----	----