



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA  
ÁREA DE ENDODONCIA

**Variabilidad del LPS de *Porphyromonas gingivalis* y  
*Porphyromonas endodontalis* en dientes con Periodontitis Apical  
Asintomática**

**Sergio Humberto Herrera Bustamante**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Denisse Bravo R.**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Marcela Hernández R.**

**Prof. Dr. Mauricio Garrido F.**

**ASESOR**

**Prof. Dra. Andrea Dezerega P.**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT N° 1120138  
Santiago – Chile  
2015**





**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA  
ÁREA DE ENDODONCIA

**Variabilidad del LPS de *Porphyromonas gingivalis* y  
*Porphyromonas endodontalis* en dientes con Periodontitis Apical  
Asintomática**

**Sergio Humberto Herrera Bustamante**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Denisse Bravo R.**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Marcela Hernández R.**

**Prof. Dr. Mauricio Garrido F.**

**ASESOR**

**Prof. Dra. Andrea Dezerega P.**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT N° 1120138  
Santiago – Chile  
2015**



## **AGRADECIMIENTOS**

---

Primero y por ser los más importantes, a mis padres, Alicia y Humberto, por su amor incondicional, su dedicación absoluta, por enseñarme el valor de la honestidad, la rectitud, la bondad, el amar lo que hago y por ser el pilar fundamental que me ha sostenido en el largo trayecto que me ha conducido a ser quien soy.

A mis hermanas, Javiera y Alicia, por complementar de manera perfecta la constitución familiar de mi hogar, ayudarme a madurar y otorgarme un valor que solo el amor y admiración de un hermano menor puede dar.

A mi abuela Sonia y mi tía Patricia, quienes han entregado un afecto verdaderamente maternal y han contribuido con su cariño y presencia durante toda mi formación.

También quiero agradecer a mis amigos, docentes y funcionarios, porque nada es azaroso y todos han sido parte fundamental de mi estadía en la facultad, porque se con convicción, que estarán para siempre conmigo.

No puedo omitir a quien ha participado activamente en este último periodo de mi formación, quienes me permitieron desarrollar el trabajo que se plasma en este documento, a mi tutora principal, Dra. Denisse Bravo, por la oportunidad de ser parte de este proyecto, por su guía, sus conocimientos y su apoyo, al igual que el de la Dra. Marcela Hernández, Dr. Mauricio Garrido y Dra. Andrea Dezerega, por su calidad docente y humana. También a quienes me ayudaron en la estadía en el laboratorio, Darna, Daniela y Christopher, por enseñarme a trabajar en él, por su paciencia, siempre en un ambiente grato y cálido.

Por último, a la Universidad de Chile, institución que me otorga el sello que llevaré con orgullo durante toda mi vida profesional.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
• Patología Endodóntica Periapical.....	9
• Periodontitis Apical Asintomática.....	9-10
• Vías de contaminación.....	11-12
• Microbiología de las lesiones apicales.....	13-15
• <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Porphyromonas endodontalis</i> .....	16
• Mecanismos de patogenicidad.....	16-17
• Lipopolisacárido como componente fundamental en la infección por <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Porphyromonas endodontalis</i> .....	18-19
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	21
• Población de estudio.....	22
• Procedimiento de toma de muestras clínicas.....	23
• Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	23
• Identificación de los aislados de <i>P. gingivalis</i> y <i>P. endodontalis</i> .....	24
• Caracterización macromorfológica de los aislados clínicos y de referencia en medio sólido y líquido.....	25
• Extracción y caracterización del LPS.....	25-26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	26
• Características de los individuos de los cuales se obtuvieron los aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> y <i>P. endodontalis</i> .....	27
• Características macromorfológicas de los aislados clínicos y de cepas de referencia de <i>P. gingivalis</i> y <i>P. endodontalis</i> crecidas en medio sólido y líquido.....	28-35
• Extracción y Caracterización del LPS de aislados clínicos y cepas de referencia de <i>P. gingivalis</i> y <i>P. endodontalis</i> .....	36-37
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	36
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	43
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	42
<b>9. ANEXOS</b> .....	48

## RESUMEN

---

La Periodontitis Apical Asintomática (PAA) corresponde a una patología periapical de origen infeccioso que se caracteriza por la respuesta negativa a los tests de sensibilidad pulpar del diente afectado y por presentar, al examen radiográfico, un área radiolúcida peri y/o paradicular. Histológicamente se puede clasificar como quiste radicular inflamatorio (QRI) o granuloma periapical (GP). Las comunidades microbianas asociadas a la PAA se caracterizan por infectar el sistema de canales radiculares (SCR) de los dientes y son muy variables en su composición, existiendo diferencias entre diferentes poblaciones geográficas, así como también dentro de una misma población. *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis*, son especies bacterianas que se han visto asociadas a este tipo de infección, por medio de la interacción de sus factores de virulencia con las células del hospedero. Dentro de estos factores de virulencia está el lipopolisacárido (LPS), constituyente de la membrana externa de la pared celular más abundante de la superficie de ambas especies bacterianas y que podría explicar los efectos deletéreos en la destrucción del ligamento periodontal y del hueso, influyendo así en el aumento del tamaño de las lesiones apicales de origen endodóntico (ALEO).

En este trabajo, realizamos una caracterización del perfil estructural del LPS de *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis* y analizamos la variabilidad de éste entre los aislados obtenidos. Con este objetivo, inicialmente analizamos macromorfológicamente los cultivos en medio líquido y sólido de aislados clínicos de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, obtenidos de exudado periapical proveniente de dientes con diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática y luego caracterizamos el perfil electroforético del LPS en geles de SDS-poliacrilamida teñido con Nitrato de Plata de ambas especies bacterianas y las comparamos con sus respectivas cepas de referencia.

Nuestros resultados mostraron una baja cantidad de canales radiculares infectados con *P. gingivalis* y *P. endodontalis*. Las características macromorfológicas de dichos microorganismos resultaron bastante similares a las de las cepas de referencia, sin

embargo, se observaron diferencias entre ambas. En cuanto al perfil electroforético del LPS de ambas especies, pese a tener pocos aislados clínicos positivos para ambas, si hubo diferencias en el perfil electroforético de sus LPS, siendo más marcadas en las colonias de *P. endodontalis*.

En síntesis, nuestros resultados indican que *P. gingivalis* y *P. endodontalis* están presentes en canales radiculares de dientes diagnosticados con PAA y que existen diferencias en las especies bacterianas estudiadas, tanto en sus características macromorfológicas, como en las características de sus LPS.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### Patología Endodóntica Periapical:

Las infecciones endodónticas corresponden a la infección del Sistema de canales radiculares (SCR) y representan la causa principal de las patologías periapicales. De acuerdo al consenso de terminología diagnóstica recomendado por la Academia Americana de Endodoncia del 2009, las patologías periapicales de origen infeccioso son:

- ❖ *Periodontitis Apical Asintomática:* Inflamación y destrucción del periodonto apical de origen pulpar, se observa un área radiolúcida periapical y no muestra síntomas clínicos.
- ❖ *Periodontitis Apical Sintomática de origen infeccioso:* Inflamación, usualmente del periodonto apical, que presenta síntomas clínicos como: respuesta dolorosa a la masticación y/o percusión o palpación. Puede estar o no asociada a un área radiolúcida periapical.
- ❖ *Absceso Apical Agudo:* Reacción inflamatoria a la infección y necrosis pulpar caracterizada por un inicio rápido, dolor espontáneo y a la presión, con formación de exudado purulento y aumento de volumen de los tejidos vecinos.
- ❖ *Absceso Apical Crónico:* Reacción inflamatoria a la infección y necrosis pulpar caracterizada por un inicio lento, sin o muy pocas molestias y descarga intermitente de exudado purulento a través de una fístula.

### Periodontitis Apical Asintomática:

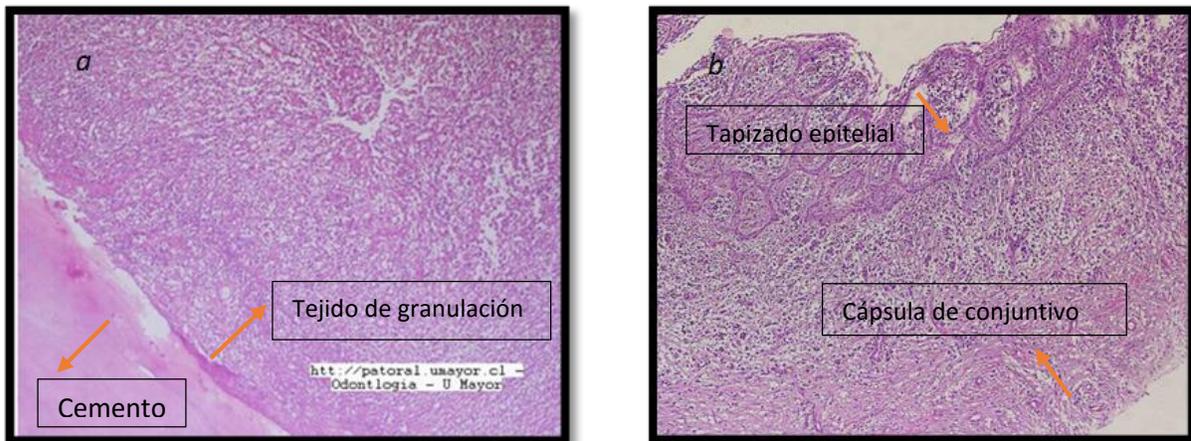
La periodontitis apical asintomática (PAA) es una enfermedad infecciosa que afecta los tejidos de soporte del diente. En forma posterior a la necrosis pulpar y su avance a lo largo del SCR se instaura un proceso inmuno-inflamatorio a nivel del periápice. Clínicamente se caracteriza por respuesta negativa a los tests de sensibilidad pulpar, ausencia de dolor a la percusión y palpación de fondo de vestíbulo (Marton & Kiss, 2000; Nair, 2004). Radiográficamente nos encontramos

con la presencia de una lesión radiolúcida periapical (FIGURA 1) que histopatológicamente puede presentarse en dos formas (Liapatas et al., 2003; Lukic et al., 2008)(FIGURA 2):

- ❖ *Granuloma Periapical (GP)*: Proliferación de tejido de granulación, células inflamatorias, cristales de colesterol, cordones de epitelio (R.E.M.).
- ❖ *Quiste Radicular Inflamatorio (QRI)*: Cavityad patológica compuesta por un revestimiento de epitelio plano pluriestratificado no queratinizado y una cápsula conjuntiva inflamada.



**FIGURA 1.** Radiografía periapical. Área radiolúcida compatible con lesión periapical.



**FIGURA 2.** El diagnóstico definitivo de una lesión periapical siempre es histopatológico, (a) *Granuloma Periapical*. Adyacente a tejido dentario se observa

tejido de granulación, presencia abundante de células mononucleares. Tinción hematoxilina-eosina. Y (b) *Quiste Radicular Inflamatorio*. Cavitya quística recubierta por epitelio plano pluriestratificado no queratinizado, con hiperplasia arciforme, e infiltrado inflamatorio. Tinción hematoxilina-eosina. (Atlas Histopatología Universidad Mayor. <http://patoral.umayor.cl>).

En condiciones de normalidad, la pulpa y dentina se encuentran estériles, aisladas de microorganismos por la integridad del esmalte y cemento radicular (Seltzer et al., 1963). No obstante, en ciertas situaciones esta integridad se ve vulnerada o bien desaparece dando como resultado la exposición de este complejo pulpo-dentinario a los microorganismos orales, quienes invaden el SCR.

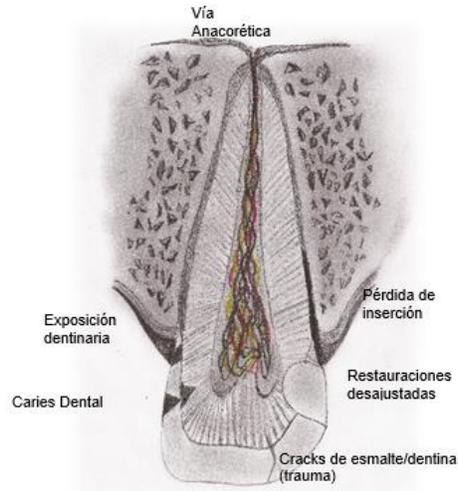
Las vías reconocidas para la difusión de la infección son a partir de tejidos duros, enfermedad periodontal y vía anacorética, como se observa en la FIGURA 3 (Delivanis & Fan, 1984):

1. A partir de tejidos duros

- a. *Caries*: A partir de la desmineralización sub-superficial del esmalte y consecuente pérdida de la integridad y soporte sustancial de éste, los microorganismos viajan siguiendo el patrón estructural en que se organizan los túbulos dentinarios alcanzando el tejido pulpar y produciendo la diseminación de la infección a este.
- b. *Iatrogenia operatoria*: Durante la etapa de remoción de caries, en muchas ocasiones por proximidad con la pulpa o por mal uso del instrumental rotatorio, comunicamos esta cavitya que se encontraba estéril y producimos el traspaso de los microorganismos.
- c. *Iatrogenia periodontal*: Por pérdida de la integridad del cemento radicular durante la instrumentación mecánica de los sacos periodontales producimos la diseminación de los patógenos periodontales al sistema de canales radiculares.

- d. *Trauma*: Los cracks o microfacturas del esmalte son vías de diseminación reconocidas para los microorganismos, propagándose hasta el complejo pulpo-dentinario.
  - e. *Dentina expuesta*: Ya sea por disfunción oclusal como el bruxismo o bien, efectos erosivos de la superficie dentaria por los hábitos.
2. Tratamiento endodóntico defectuoso: Cuando realizamos un tratamiento endodóntico, podemos dejar patógenos residuales que no eliminamos con la instrumentación y el tratamiento químico del canal, o bien del sistema de canales no instrumentables.
3. Enfermedad periodontal.
4. Vía Anacorética (Nadkarni et al., 2002): Proceso mediante el cual los microorganismos son transportados desde la sangre o linfa a los tejidos dañados. No tiene evidencia suficiente, pero se justifica en:
- a. *Sobreinstrumentación*: Generando una vía de acceso para los microorganismos desde el periápice a los conductos radiculares.
  - b. *Bacteremia*: Bacterias ingresan por los vasos que dan irrigación a los dientes.

Traspassando el complejo pulpo dentinario e instaurándose la infección en el SCR, comienza el proceso de necrosis de la pulpa y diseminación a través de los canales llegando a la instauración de una infección a nivel perirradicular, con la consecuente inflamación y destrucción de los tejidos de sostén: ensanchamiento del espacio periodontal por destrucción del hueso alveolar y ligamento periodontal y posteriormente la instauración franca de una lesión periapical de origen endodóntico (ALEO).



**FIGURA 3.** Vías de contaminación del SCR (Herrera et al., 2015).

### Microbiología de las Lesiones Apicales:

Las comunidades microbianas en la periodontitis apical se caracterizan por ser mixtas con predominio de bacterias anaerobias con un número variable de células en el canal que va desde  $10^2$  a  $10^8$  (Sakamoto et al., 2007; Siqueira & Rocas, 2005; Vianna et al., 2006). Estudios han mostrado que la microbiota presente en el SCR es similar a la presente en los sacos periodontales de pacientes con periodontitis (Siqueira et al., 2008).

Morfológicamente, el biofilm intrarradicular es delgado y compuesto de varias capas de bacterias difiriendo consistentemente entre individuos (Ricucci & Siqueira, 2010). Los túbulos dentinarios pueden ser invadidos por microorganismos del fondo del biofilm que recubre las paredes del canal radicular y en la medida que aumenta el tamaño de la lesión, mayor es el área cubierta por el biofilm.

La pulpa necrótica provee espacio y nutrientes para la colonización microbiana, es un ambiente propicio para su desarrollo por ser húmedo, tibio, con disponibilidad de nutrientes y encontrarse protegido del sistema defensivo del hospedero debido a la pérdida de la micro-circulación en el tejido pulpar necrótico. Así mismo, las condiciones que ésta genera en los diferentes segmentos del diente, establece

diferentes nichos ecológicos caracterizados por las diferencias en los determinantes ecológicos y asociado a ello, diferencias en las comunidades bacterianas.

Nichos Ecológicos en un diente (Chavez de Paz, 2007):

Segmento Coronal: Tiene una alta tensión de oxígeno hay nutrientes disponibles desde la cavidad oral y los microorganismos son fácilmente expuestos a acciones terapéuticas que se quieran realizar.

Canal Principal: Presenta una baja tensión de oxígeno, tiene una cantidad reducida de nutrientes de la cavidad oral, pero pueden obtenerse también de los tejidos perirradiculares. Y los microorganismos aún siguen expuestos a la acción terapéutica.

Segmento Apical: Se caracteriza por su baja tensión de oxígeno y potencial de óxido-reducción, nutrientes provenientes de los exudados periapicales y las bacterias presentes a este nivel actúan como un medio en que se seleccionan especies bacterianas con un metabolismo fundamentalmente anaerobio estricto y proteolítico, condiciones que dificultan su erradicación al ser menos afectados por las medidas terapéuticas.

*Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis*:

Las comunidades bacterianas de las infecciones endodónticas se caracterizan por ser de carácter mixto con predominio de anaerobios Gram negativo. Especies bacterianas que forman colonias pigmentadas de negro (BPB), correspondientes a bacilos anaerobios Gram negativos, se encuentran con frecuencia en las infecciones de la cavidad oral y de las vías respiratorias e intestinales (Bogen & Slots, 1999; Tomazinho & Avila-Campos, 2007). *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* se han detectado en dientes con infecciones endodónticas y sus factores de virulencia contribuyen a generar los signos y síntomas asociados a la enfermedad (Baumgartner et al., 2004).

Se ha reportado que existen diferencias en la tasa de detección de estos patógenos en los dientes asociados con infecciones endodónticas (Foschi et al.,

2005; Ozbek & Ozbek, 2010). Esto puede deberse a la forma en que se toman las muestras, la extracción de ADN y los métodos de detección, que van desde los cultivos microbiológicos, hasta métodos de detección por medio de amplificación de las secuencias de sus ADN. Además, se ha sugerido que la abundancia relativa de las comunidades bacterianas puede variar entre las poblaciones de diferentes regiones (Baumgartner, et al., 2004; Machado de Oliveira et al., 2007; Siqueira & Rocas, 2005). Varios estudios han confirmado que factores ambientales y factores genéticos del hospedero pueden influir en la prevalencia y la proporción de patógenos periodontales (Park et al., 2004; Torrungruang et al., 2009). En este contexto, Siqueira et al. (2008) comparó la microbiota del canal radicular asociada con periodontitis apical asintomática de pacientes brasileños con noruegos, en cuyos resultados sugiere la existencia de un patrón geográfico relacionado de abundancia relativa de las comunidades bacterianas. Como la mayoría de los patógenos periodontales, tales como *P. intermedia* y *P. gingivalis*, son también patógenos endodónticos, la variación en la prevalencia de estas bacterias puede tener una influencia en la composición de la microbiota en el SCR de dientes infectados (Siqueira & Rocas, 2005). Un estudio más reciente realizado en población china (H. Cao et al. 2012) reveló una alta prevalencia de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, lo que sugiere una estrecha relación entre estas especies, la necrosis de la pulpa y las infecciones endodónticas primarias en la población analizada.

#### Mecanismos de Patogenicidad:

*P. gingivalis* y *P. endodontalis* son bacilos o cocobacilos Gram negativo, proteolíticos, anaerobios estrictos y no forman esporas. La patogenicidad de estas bacterias se atribuye a su amplio repertorio de factores de virulencia (TABLA N°1). Dentro de ellos tenemos las fimbrias que han sido consideradas un factor de virulencia crucial en la iniciación y progresión de la enfermedad (Lamont & Jenkinson, 1998), productos de su metabolismo, inducción de citoquinas proinflamatorias (Kontani et al., 1996), como PGE2 que estimula la reabsorción ósea y provoca a su vez quimiotaxis de macrófagos, linfocitos y plasmocitos. Estos

últimos también producen mediadores proinflamatorios (PGE-2, IL-1, IL-6, RANKL y factor estimulante de colonias) que inducen una activación osteoclástica propiciando la reabsorción ósea característica de las ALEOs.

Por otro lado, otros factores de virulencia muy relevantes para la patogenicidad de estas especies son la cápsula o antígeno K y el LPS, componente prioritario de la membrana externa de bacterias Gram negativos. Diversos estudios sustentan que el LPS tiene efectos deletéreos en el hospedero, debido a la respuesta inmune inflamatoria celular y humoral que provoca (Jersmann et al., 2001; Nair, 2004; Zou & Bar-Shavit, 2002). La caracterización y variabilidad de este componente estructural de la membrana externa serán los objetivos principales a investigar en este estudio.

**TABLA N° 1.** Factores de virulencia asociados a Periodontitis Apical (Siqueira & Rocas, 2007; Mirucki et al., 2014)

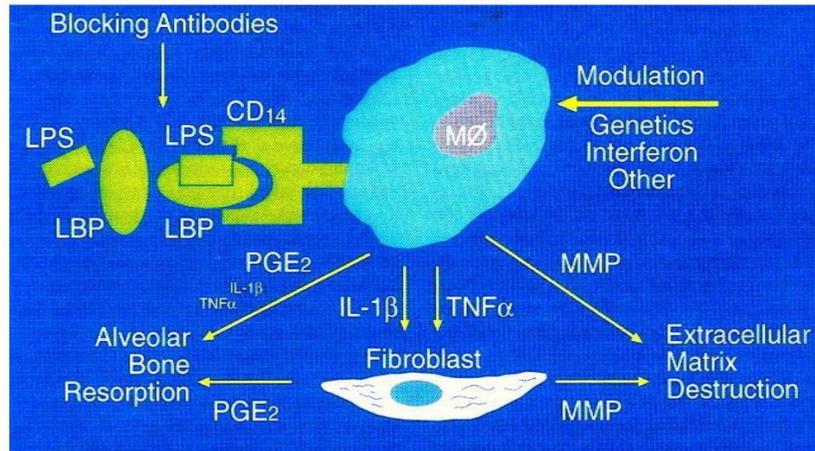
<b>Función</b>	<b>Factor de Virulencia asociados a PA</b>
<b>Fijación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adhesinas (fimbrias, proteínas de superficie sin fimbrias)</li> <li>- Exopolisacáridos</li> <li>- Ácido Lipoteicoico</li> <li>- Otras proteínas de membrana</li> <li>- Vesículas de membrana</li> </ul>
<b>Invasión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flagelo</li> <li>- Enzimas (colagenasa, hialunoridasa, condroitin sulfatasa, fibrinolisisina, ácido fosfatasa, DNAasa, etc)</li> </ul>
<b>Sobrevivencia:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Evasión de la respuesta inmune del hospedero</li> <li>- Adquisición de nutrientes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Exopolisacáridos (cápsula)</li> <li>- IgA, IgG, IgM, C3 y C5 proteinasas</li> <li>- <b>Lipopolisacárido (AgO)</b></li> <li>- Flagelo</li> <li>- Exotoxinas</li> <li>- Productos finales del metabolismo</li> </ul>
<b>Daño Directo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Exotoxinas</li> <li>- Enzimas (colagenasa, hialuronidasa, condroitin sulfatasa, gingipainas, aminopeptidasa, fosfolipasa neuraminidasa y ácido fosfatasa, etc)</li> <li>- Productos finales del metabolismo (ácidos grasos de cadena corta, poliaminas, compuestos volátiles de azufre, indol, amonio)</li> </ul>

<b>Daño Indirecto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lipopolisacárido (Porción del Lípido A)</li> <li>- Peptidoglicano</li> <li>- Ácido Lipoteicoico</li> <li>- Fimbria</li> <li>- Exopolisacárido</li> <li>- Otras proteínas de membrana (porinas)</li> <li>- Lipoproteínas</li> <li>- DNA</li> </ul>
-----------------------	--

### Lipopolisacárido (LPS):

El LPS es reconocido como la primera línea de defensa contra muchos factores ambientales en bacterias Gram negativo, previniendo la lisis por el sistema del complemento y la acción de péptidos antimicrobianos (Papo & Shai, 2005). Es un heteropolisacárido fosforilado que está covalentemente unido a un lípido de la membrana externa que contiene glucosamina, el lípido A. La porción de polisacárido que protruye de la membrana externa ha sido diferenciada en dos regiones principales: una región interna o central (core) y una porción externa denominada antígeno O (AgO) (Raetz & Whitfield, 2002). Dentro de las actividades biológicas más relevantes de esta molécula están la potente activación de macrófagos e inducción de citoquinas proinflamatorias, como se aprecia en la FIGURA 4 (Murray & Wilton, 2003; Zaric et al., 2010). El AgO le confiere a la bacteria su especificidad serológica y se ha descrito como la porción con más variabilidad en aislados de *P. gingivalis* (Herikstad et al., 2002; Reeves et al., 1996; Sun et al., 2011). Hasta ahora no hay estudios en los cuales se caracterice el LPS de *P. endodontalis*.

La importancia de estudiar el LPS de *P. endodontalis*, radica en que pueden haber diferencias en la producción de esta molécula que podrían asociarse a diferencias de patogenicidad, diferencias en la expresión clínica de las patologías periapicales, fundamentalmente asociados a la sintomatología y al grado de osteólisis a expensas del crecimiento de la lesión periapical (Moreno & Contreras, 2013).



**FIGURA 4.** Esquema de acción del LPS en la activación de macrófagos y estimulación de la osteoclastogénesis (Vernal, 2010).

De acuerdo con los antecedentes expuestos, el objetivo de este estudio es realizar una caracterización del perfil estructural del LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* y analizar la variabilidad de éste entre los aislados obtenidos de dientes con diagnósticos de PAA.

## 2. HIPÓTESIS

---

Existen variaciones en el perfil del Lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis* de aislados clínicos de dientes con diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática (PAA).

### 3. OBJETIVOS

---

#### Objetivo General:

Identificar *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis* en aislados clínicos obtenidos de exudado periapical de dientes con PAA y establecer diferencias en el perfil electroforético de sus LPS.

#### Objetivos Específicos:

1. Describir la frecuencia de infección por *P. gingivalis* y *P. endodontalis* en los canales radiculares de dientes con diagnóstico de PAA analizados.
2. Caracterizar el perfil electroforético del LPS de los aislados clínicos de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* provenientes de exudados periapicales de dientes con Periodontitis Apical Asintomática.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Población de Estudio:

Para este estudio se utilizaron aislados clínicos dientes con diagnóstico de PAA obtenidos de individuos reclutados en la clínica odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, de acuerdo a los siguientes criterios:

**TABLA N° 2.** Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes que ingresaron al proyecto.

<b>Criterios de inclusión</b>	<b>Criterios de exclusión</b>
- Individuos entre 18-35 años de edad	- Individuos con enfermedades sistémicas
- Índice de Masa Corporal (IMC) entre 21-28	- Individuos con diagnóstico de Periodontitis Crónica
- Uno o más dientes con diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática.	- Individuos que hayan consumido antibióticos dentro de los últimos 6 meses.

Los pacientes reclutados firmaron un Consentimiento Informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

### 4.2. Procedimiento de toma de muestras clínicas

Los procedimientos de toma de muestra se llevaron a cabo bajo estrictas condiciones de asepsia. Antes de la aislación absoluta con goma dique, se eliminó toda la placa supragingival mediante pulido coronario con escobilla y piedra pómez. Caries y / o restauraciones coroneales se eliminaron con alta velocidad y baja velocidad usando piedras diamantadas y fresas estériles. Posterior a la aislación unitaria del diente con goma dique, se limpió el campo operatorio y diente con peróxido de hidrógeno al 3 % por un minuto. Luego se desinfectó el campo operatorio y diente con hipoclorito de sodio al 2,5%. La cavidad de acceso se realizó con fresas de alta velocidad estériles y sin agua; tanto el campo operatorio así como la cavidad de acceso fueron limpiadas y desinfectadas como

se explicó previamente. Posteriormente se inactivó el hipoclorito de sodio con tiosulfato de sodio estéril al 5%. Una vez realizada dicha inactivación se tomó una muestra microbiológica de la cavidad de acceso. Para incluir dicho diente en el estudio, la muestra de la cavidad de acceso debe ser negativa.

Las muestras del canal radicular se tomaron de la siguiente manera: se introdujeron por un periodo de un minuto, tres puntas de papel estériles de forma consecutiva en el canal a un nivel de aproximadamente 1 mm del vértice radiográfico para así absorber el exudado canalicular. Si el canal de la raíz se encuentra seco, se introduce una pequeña cantidad de solución salina estéril en el canal. Posteriormente las puntas de papel se transfirieron asépticamente a microtubos con 500 µl de RTF (fluido de transporte reducido), para su procesamiento en el laboratorio.

#### 4.3. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas de referencia de *P. gingivalis* (ATCC 33277) y *P. endodontalis* (ATCC 35406) están disponibles en el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y sus principales características se describen en la TABLA N° 3, mientras que los aislados clínicos, fueron tomados de pacientes, como se describió en los puntos 4.1 y 4.2.

**TABLA N° 3.** Características generales de las cepas de referencia utilizadas (Shah &Collins, 1988)

<b>Cepa</b>	<b>Propiedad Relevante</b>	<b>Origen</b>
<b>ATCC 33277</b>	No presenta cápsula o antígeno K	Donado por AL Coykendall
	Presenta fimbria mayor (Fim A)	
<b>ATCC 35406</b>	No presenta cápsula o antígeno K	Donado por el TJ van Steenberg
	Presenta fimbria mayor (Fim A)	

El cultivo de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* se realizó según lo descrito por Silva et al. (2008). Brevemente, las bacterias se sembraron en medios no selectivos de agar sangre hemina - menadiona (5% sangre de caballo desfibrinada, 0,5 mg / L de hemina, y 0,5 mg / L menadiona); las placas se incubaron anaeróticamente a 37° C durante 7-14 días en un frasco que contiene sobres generadores de gas para la producción de una atmósfera anaerobia (Oxoid®).

También se inocularon medios líquidos no selectivos BHI (brain heart infusión) y Wilkins, suplementados con hemina - menadiona con cada uno de los aislados clínicos y de las cepas de referencia para los diferentes ensayos. Los caldos se incubaron anaeróticamente a 37° C durante 1 a 3 días.

#### 4.4. Identificación de los aislados de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*

Una vez transcurrido el período de incubación, se efectuó un análisis macroscópico bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000 C, Zeiss), para identificar las colonias pigmentadas de negro. Se escogieron 8 colonias bacterianas pigmentadas de negro por placa, en lo posible eligiendo cada colonia con diferente morfología. Inmediatamente se resembraron cada una por separado en agar sangre hemina - menadiona y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 7 a 10 días.

Luego, las colonias pigmentadas de negro fueron sometidas a prueba de fluorescencia, bajo la luz ultravioleta y la adición de metanol (360 nm), la cual debe ser negativo para *P. gingivalis* y *P. endodontalis* (Slots, 1986). A los aislados identificados fenotípicamente se les extrajo el DNA utilizando un kit comercial (FAVOGEN ARNr 16S), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se determinó la cantidad de DNA extraído mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Spectrophotometer UV – 1601, Shimadzu) (Park, et al., 2004). Los aislados identificados fenotípicamente como *P. gingivalis* y *P. endodontalis* se identificaron mediante PCR siguiendo la metodología de Ashimoto (Slots et al., 1995).

#### 4.5 Caracterización macromorfológica de los aislados clínicos y de referencia en medio sólido y líquido.

Una vez identificados los aislados como *P. gingivalis* o *P. endodontalis*, se sembraron y aislaron en medios no selectivos de agar sangre hemina-menadiona. Las placas se incubaron anaeróticamente a 37° C durante 7-14 días. Una vez transcurrido el período de incubación, se efectuó un análisis macroscópico bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000 C, Zeiss), realizando una caracterización de acuerdo a la forma, color, tamaño, elevación, convexidad, superficie, consistencia, opacidad y textura de cada colonia que se logró observar de forma aislada. Se realizó un registro fotográfico de cada placa.

Luego, se inocularon medios líquidos no selectivos BHI (brain heart infusión), suplementados con hemina-menadiona con cada uno de los aislados clínicos y las cepas de referencia. Los caldos se incubaron anaeróticamente a 37° C durante 2-3 días. Una vez transcurrido el período de incubación, se efectuó un análisis macroscópico, realizando una caracterización de acuerdo al tipo de crecimiento en el caldo, coloración, decantación, grado de suspensión, formación de velo en la superficie y densidad óptica. También, se realizó un registro fotográfico de cada caldo.

#### 4.6 Extracción y caracterización del LPS

Se caracterizaron los perfiles electroforéticos de LPS de las cepas clínicas de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* aisladas de pacientes con diagnóstico de PAA en uno o más dientes. Para ello, se prepararon lisados totales de las cepas de referencia y de los aislados clínicos. Para esto, cultivos de las cepas disponibles de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* (clínicas y de referencia), se hicieron crecer hasta fase estacionaria en caldo Wilkins y se ajustó a una densidad óptica de 600 nm (DO600) de 2,0 en un volumen final de 1,5 ml. Las células fueron centrifugadas y los pellets resuspendidos en 150 µL de buffer de lisis (SDS 2 %, β-mercaptoetanol 4 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0,002 % en Tris 1 M pH 6,8), hervidas por 15 minutos, con ciclos de sonicado de 90 segundos, con 10 de pulso a 40% de

amplitud y tratadas con 10  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20 mg/ml) por 2 h a 60 °C. Se agrega 150  $\mu\text{L}$  de fenol saturado básico hasta obtener una emulsión que se incuba por 15 minutos a 70°C, luego se incuban en hielo por 10 minutos y se centrifugan por otros 10 minutos a 10.000 rpm. Se recupera la fase acuosa y se agregan 500 $\mu\text{L}$  de éter saturado (Tampón TE 50:20) y centrifugan las muestras por 1 minuto a 10.000 rpm. Se descarta la fase acuosa (éter) y se dejan los tubos en la campana para que se evapore. El LPS se separa en geles de acrilamida al 14% (p/v) usando un sistema de buffer tricina-SDS en una cámara mini Protean-III (Biorad), cargando 2 $\mu\text{L}$  de muestra de LPS correspondiente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) y la electroforesis se realizaba a 50 Volts mientras las muestras permanecían en el gel concentrador (50 min aproximadamente) y a 150 Volts cuando estas entraban en el gel resolutivo (100 min, aproximadamente). Luego, los geles se tiñeron con plata utilizando el protocolo de Tsai y Frasch (1982), para ello, terminada la electroforesis, se dejaron los geles suspendidos en una solución de fijación durante 16-24 horas (200 ml de solución 40% v/v etanol absoluto, 10% v/v ácido acético glacial), luego se resuspendió en una solución de oxidación (solución de fijación más 0,7% de metaperyodato) durante 10 minutos, con 3 lavados de 10 minutos cada uno para teñir luego con Nitrato de Plata (1 gr de  $\text{AgNO}_3$  en 150 ml de  $\text{H}_2\text{O}_{(d)}$ , 2 ml de  $\text{NH}_3$  25% y 2,8 ml de  $\text{NaOH}$  1M) durante 15 minutos, luego se volvieron a realizar 3 lavados de 15 minutos cada uno, para finalmente revelar en una solución de revelado (12,5 mg de ácido cítrico en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}_{(d)}$  y 125  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37%).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características de los individuos a partir de los cuales se obtuvieron los aislados clínicos de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*.

De un total de 34 pacientes reclutados en la clínica odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, cuyos diagnósticos endodónticos fueron dientes con PAA y que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión del proyecto, detallados en el punto 4.1, se tomaron muestras clínicas de exudado periapical según el protocolo descrito en el punto 4.2.

De los 34 aislados clínicos se realizaron 34 cultivos designados mediante las iniciales MG numeradas del 1 al 34, para cada uno de estos cultivos se tomaron 8 colonias diferentes y se resembraron (ver ejemplo de la nomenclatura en FIGURA 5). De un total de 272 aislados provenientes de los 34 cultivos, se detectaron 15 aislados pigmentadas de negro. De éstos, 2 se descartaron por la identificación mediante la prueba de metanol que resultó ser negativo para *P. gingivalis* y *P. endodontalis*. De los 13 aislados restantes 6 correspondían a poblaciones bacterianas de *P. gingivalis* provenientes de 2 pacientes: MG 1ECol3, MG 8ECol1, MG 8ECol4, MG 8ECol5, MG 8ECol6 y MG 8 ECol7; y 7 aislados correspondían a *P. endodontalis* provenientes de otros 3 pacientes diferentes: MG 1ECol1, MG 3ECol2, MG 3ECol5, MG 3ECol6, MG 4ECol1, MG 4ECol4 y MG 4ECol7 (TABLA N°4).



**FIGURA 5.** Ejemplo de nomenclatura utilizada para la nominación de los aislados clínicos.

**TABLA N°4.** Resumen de aislados identificados como *P. gingivalis* y *P. endodontalis*.

<b>Número total de cultivos</b>	<b>34</b>
<b>Colonias por cada cultivo</b>	<b>8</b>
<b>Total de colonias</b>	<b>272</b>
<b>Cultivos con colonias pigmentadas de negro</b>	5 (MG 1E, MG 3E, MG 4E, MG 8E y MG 34 E)
<b>Aislados con colonias pigmentadas de negro</b>	15 (MG 1ECol1, MG 1ECol3, MG 8ECol1, MG 8ECol4, MG 8ECol5, MG 8ECol6, MG 8 ECol7, MG 3ECol2, MG 3ECol5, MG 3ECol6, MG 4ECol1, MG 4ECol4, MG 4ECol7, MG 34ECol2 y MG 34 ECol3)
<b>Aislados con colonias pigmentadas de negro positivas para la prueba de metanol</b>	13 (MG 1ECol1, MG 1ECol3, MG 8ECol1, MG 8ECol4, MG 8ECol5, MG 8ECol6, MG 8 ECol7, MG 3ECol2, MG 3ECol5, MG 3ECol6, MG 4ECol1, MG 4ECol4 y MG 4ECol7)
<b>Aislados con colonias pigmentadas de negro identificadas como <i>P. gingivalis</i></b>	6 (MG 1ECol3, MG 8ECol1, MG 8ECol4, MG 8ECol5, MG 8ECol6 y MG 8 ECol7)
<b>Aislados con colonias pigmentadas de negro identificadas como <i>P. endodontalis</i></b>	7 (MG 1ECol1, MG 3ECol2, MG 3ECol5, MG 3ECol6, MG 4ECol1, MG 4ECol4 y MG 4ECol7)

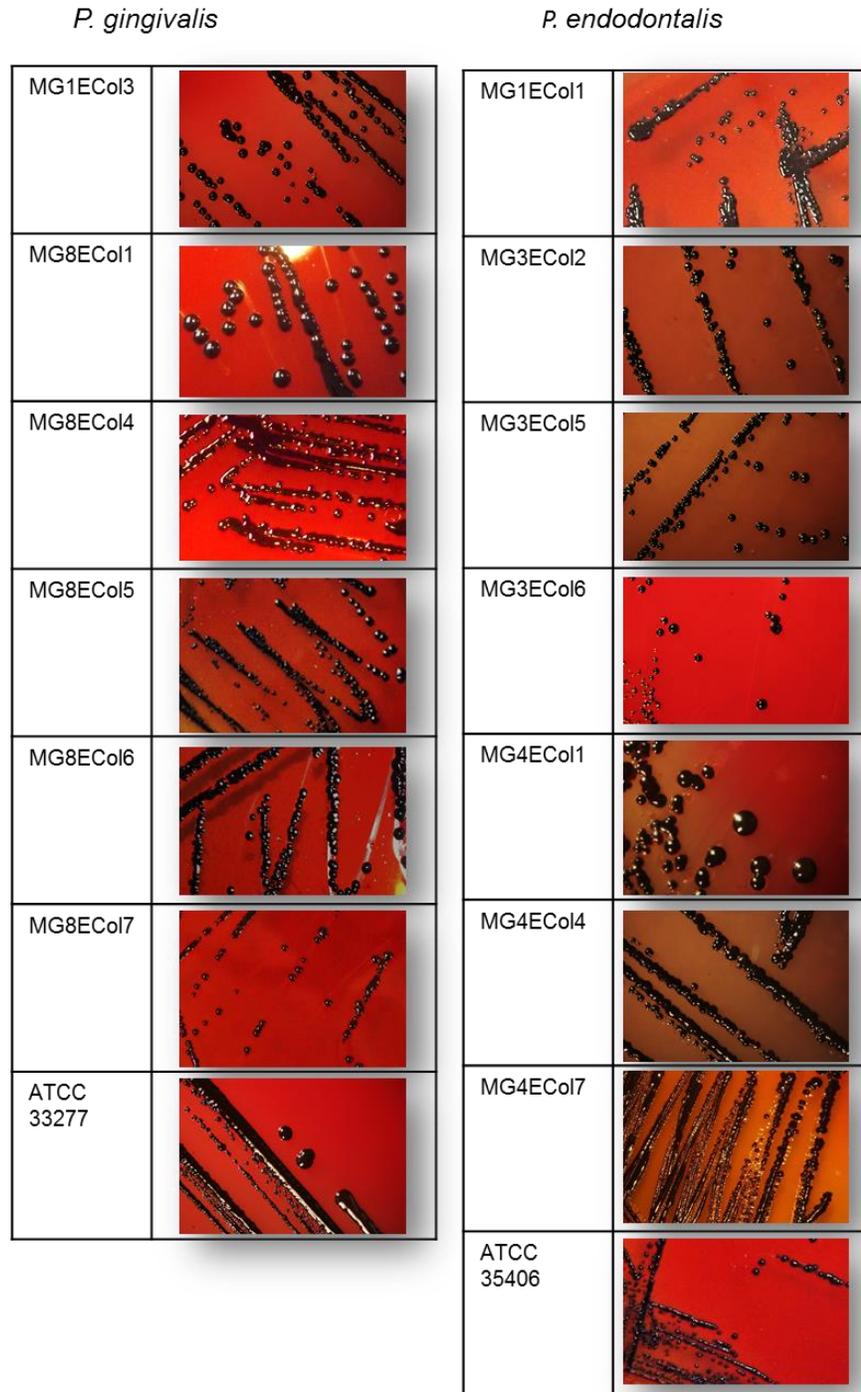
5.2. Características macromorfológicas de los aislados clínicos y de cepas de referencia de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* crecidas en medio sólido y líquido.

La importancia del análisis macromorfológico radica en la asociación de las características coloniales en medio sólido y líquido, con componentes estructurales de las bacterias y los mecanismos de virulencia asociados a éstos, tales como la cápsula y el lipopolisacárido (Drenkard et al, 2002; Haussler et al, 2003). En este trabajo estudiamos la forma, tamaño, textura, color, superficie, brillo, elevación y convexidad de las colonias en medio sólido de los aislados clínicos de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* obtenidos de exudado periapical de dientes con PAA, así como también de sus respectivas cepas de referencia.

En todos los cultivos en medio sólido realizados a partir de los aislados clínicos de dientes con PAA, las colonias que crecieron fueron todas pigmentadas de negro

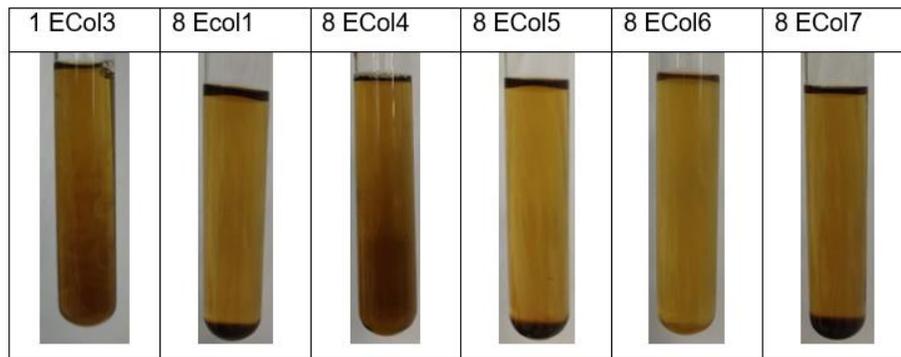
con leves diferencias de color, las colonias de *P. gingivalis* eran más oscuras que las de *P. endodontalis* (FIGURA 6). Las colonias de *P. gingivalis* fueron predominantemente circulares, color marrón oscuro, de borde liso o rugoso y superficie brillante, cóncava y de poca elevación, fáciles de disgregar y similares a su cepa de referencia (33277). Por otro lado, los cultivos en medio sólido de *P. endodontalis*, mostraron características muy similares a las de *P. gingivales*, exceptuando su textura superficial, caracterizándose éstas por ser más opacas y con consistencia más difícil de disgregar en relación a las colonias de *P. gingivalis* y similares también a su cepa de referencia (35406).

En medio líquido, las cepas de los aislados clínicos de *P. gingivalis* tendieron a mostrar una fuerte agregación y alta decantación, además de formación de grumos al fondo del tubo con una coloración que fluctuaba en tonos opacos de amarillo/anaranjado. En cuanto a los aislados de *P. endodontalis*, tendieron a tener poca decantación con un crecimiento mayor en suspensión, la mayoría no formaba grumos y su color era amarillo claro. En las FIGURAS 6 y 7, se aprecian las imágenes de los cultivos y su resumen en las TABLAS 5 y 6, con el análisis macromorfológicos en medio líquido y sólido.

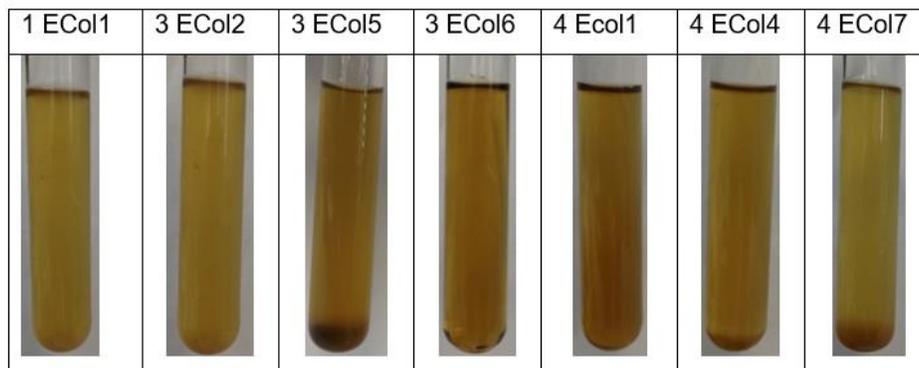


**FIGURA 6.** Fotografías bajo lupa estereoscópica de las colonias en medio sólido, de los aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* utilizadas en este estudio.

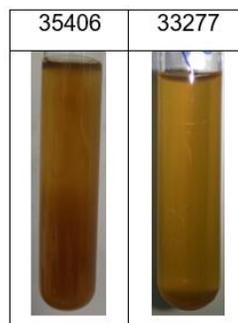
*Porphyromonas gingivalis*



*Porphyromonas endodontalis*



Cepas de referencia



**FIGURA 7.** Fotografías del crecimiento en medio líquido de aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*.

**TABLA N°5.** Características macromorfológicas evaluadas del crecimiento y desarrollo de colonias en medio sólido de cada aislado clínico y cepa de referencia. Los cultivos fueron analizados como se describió en materiales y métodos (punto 4.5).

❖ Colonias aisladas de *P. gingivalis*

<b>MG</b>	<b>1 ECol3</b>	<b>8 Ecol1</b>	<b>8 ECol4</b>	<b>8 ECol5</b>	<b>8 ECol6</b>	<b>8 ECol7</b>
<b>Forma</b>	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
<b>Textura</b>	Lisa	Lisa	Mixta	Rugosa	Rugosa	Mixta
<b>Color</b>	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro
<b>Consistencia</b>	Blanda	Firme	Firme	Firme	Firme	Firme
<b>Opacidad</b>	Brillante	Opaca	Brillante	Opaca	Opaca	Brillante
<b>Elevación</b>	++	+++	+++	++	++	++
<b>Convexidad</b>	++	++	++	+++	++	++
<b>Tamaño</b>	++	+++	++	++	++	+++

❖ Colonias aisladas de *P. endodontalis*

<b>MG</b>	<b>3 ECol2</b>	<b>3 ECol5</b>	<b>3 ECol6</b>	<b>4 ECol1</b>	<b>4 Ecol4</b>	<b>4 ECol7</b>
<b>Forma</b>	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
<b>Textura</b>	Lisa	Lisa	Mixta	Lisa	Lisa	Lisa
<b>Color</b>	Marrón	Marrón	Marón	Marrón	Marrón	Marrón
<b>Consistencia</b>	Firme	Blanda	Blanda	Blanda	Blanda	Blanda
<b>Opacidad</b>	Brillante	Brillante	Brillante	Opaca	Brillante	Opaca
<b>Elevación</b>	++	++	+++	++	++	++
<b>Convexidad</b>	++	++	++	++	++	++
<b>Tamaño</b>	+++	++	++	+	+++	++

❖ Cepas de referencia

	<b>35406</b>	<b>33277</b>
<b>Forma</b>	Circular	Circular
<b>Textura</b>	Lisa	Lisa
<b>Color</b>	Marrón oscuro	Negro
<b>Consistencia</b>	Firme	Firme
<b>Opacidad</b>	Opaca	Brillante
<b>Elevación</b>	++	++
<b>Convexidad</b>	++	++
<b>Tamaño</b>	++	++

**TABLA N° 6.** Características macromorfológicas evaluadas del crecimiento y desarrollo en medio líquido de cada aislado clínico y cepa de referencia. Los cultivos fueron analizados como se describió en materiales y métodos (punto 4.5).

❖ Crecimiento de *P. gingivalis*

MG	1 ECol3	8 Ecol1	8 ECol4	8 ECol5	8 ECol6	8 ECol7
<b>Tipo de crecimiento</b>	Suspendido	Sedimentado	Sedimentado	Sedimentado	Sedimentado	Sedimentado
<b>Suspensión</b>	+++	++	++	++	++	++
<b>Agregación</b>	+	+++	++	+++	++	+++
<b>Formación de Grumos</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Coloración</b>	Café/ Naranja	Naranja	Café/ Naranja	Naranja	Naranja	Naranja
<b>Formación de velo</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Crecimiento (DO<sub>600nm</sub>)</b>	1,648	2,902	2,389	1,898	1,441	1,660

❖ Crecimiento de *P. endodontalis*

MG	3 ECol2	3 ECol5	3 ECol6	4 ECol3	4 Ecol4	4 ECol7
<b>Tipo de Crecimiento</b>	Suspendido	Sedimentado	Suspendido	Suspendido	Sedimentado	Sedimentado
<b>Suspensión</b>	+++	++	+++	+++	++	+
<b>Agregación</b>	+	++	+	++	++	++
<b>Formación de grumos</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Coloración</b>	Amarillo	Naranja	Naranja	Amarillo	Naranja	Amarillo
<b>Formación de velo</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Crecimiento (DO<sub>600nm</sub>)</b>	2.022	2.187	1.836	2.036	2.229	2.215

## ❖ Cepas de referencias

	<b>35406</b>	<b>33277</b>
<b>Tipo de crecimiento</b>	Suspensión	Sedimento
<b>Suspensión</b>	+++	+
<b>Agregación</b>	++	+++
<b>Formación de grumos</b>	-	-
<b>Coloración</b>	Amarilla	Naranja
<b>Formación de velo</b>	-	-
<b>Crecimiento (DO600nm)</b>	1.424	2.119

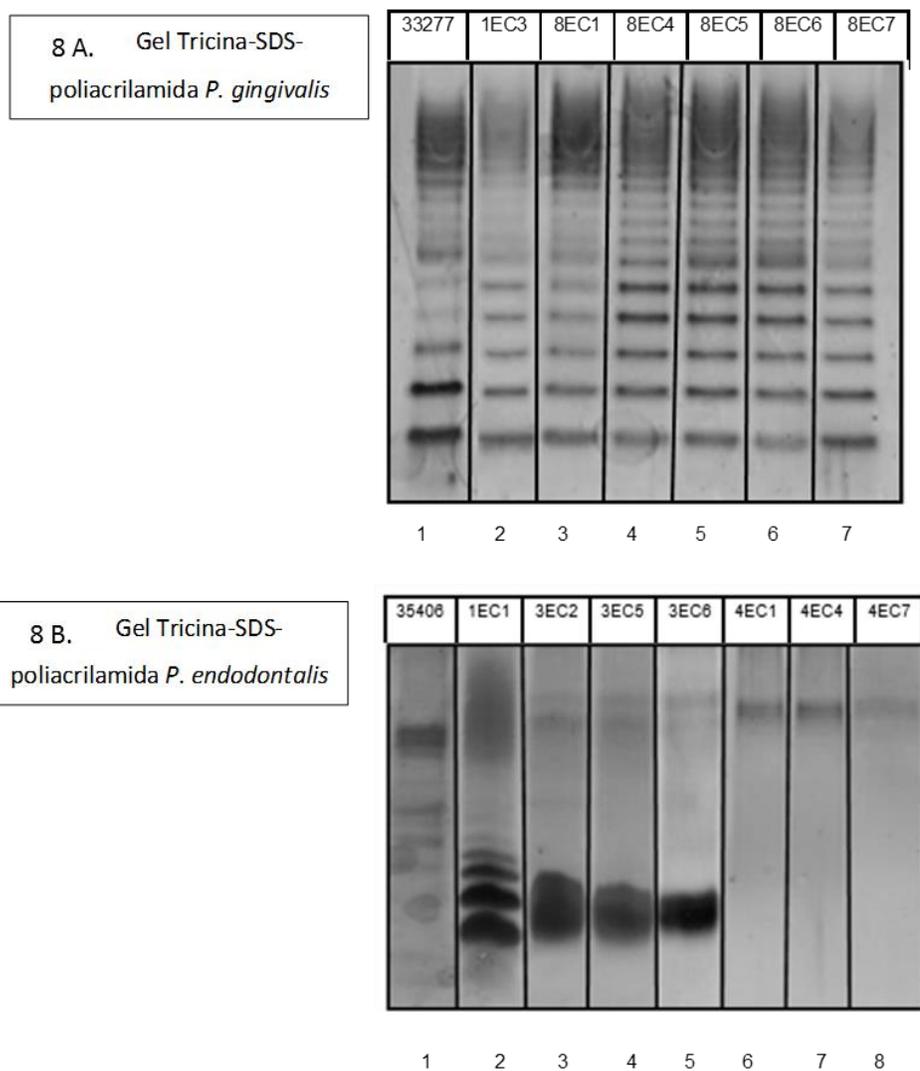
### 5.3. Extracción y Caracterización del LPS de aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*.

Se ha reportado que cambios en la autoagregación bacteriana y la morfología de las colonias han sido relacionados con ciertas modificaciones en el LPS (Yamaguchi et al., 2010). Por lo tanto se aisló LPS a partir de cada uno de los aislados clínicos y de las cepas de referencia, y se caracterizaron sus perfiles electroforéticos en geles de tricina-SDS-poliacrilamida, en los cuales la altura a la que logran migrar las muestras se visualizan en bandas teñidas de negro y son una representación del peso molecular de cada grupo de moléculas de LPS.

Los aislados de *P. gingivalis*, MG1 8ECol 1, MG 8ECol 4, MG 8ECol 5, MG 8ECol 6 y MG 8 ECol7 (carriles 3-7, de la FIGURA 8 A respectivamente), presentaron un LPS completo, similar a su cepa de referencia, en donde se observa con claridad la presencia del lípido A-core y moléculas de AgO de bajo y alto peso molecular similares a su cepa de referencia (33277). Por otro lado, MG 1ECol3 presentó una menor proporción de cadenas de alto peso molecular, sugerente de una menor proporción de este tipo de moléculas de LPS en su membrana externa.

En cuanto a los aislados de *P. endodontalis*, el perfil electroforético de sus LPS fue notablemente distinto al observado en las colonias de *P. gingivalis*, entre ellas y con su cepa de referencia (ATCC 35406). El aislado MG 1ECol1 (FIGURA 8 B, carril 2), es el único en el que encontramos un LPS completo, identificándose con

claridad moléculas de lípido A-core en la porción más baja del gel y un largo preferencial de moléculas de AgO de bajo peso molecular más arriba. Por otro lado, para MG 3ECol 2 y MG 3ECol5 (FIGURA 8B, carriles 3 y 4) vemos sólo tinción en la zona correspondiente a lípido A-core y probablemente core unido a unas pocas moléculas de AgO. Algo similar sucede con el aislado MG 3ECol 6 (FIGURA 8B, carril 5), pero éste pareciera encontrarse menos sustituido que los otros dos aislados, debido a su levemente mayor movilidad electroforética. Por otro lado en los aislados de MG 4ECol1, MG 4ECol4 y MG 4ECol7 (FIGURA 8 B, carril 6-8) encontramos una cantidad de LPS mucho menor, con moléculas de AgO concentradas en una sola región del gel y con una movilidad electroforética mucho menor a la del resto de los aislados, sugerentes de una distribución preferente por cadenas de alto peso molecular y en una concentración muy baja.



**FIGURA N° 8** Perfiles de LPS de las cepas de referencia y de los aislados clínicos de *P.gingivalis* y *P. endodontalis*. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de Tricina-SDS-poliacrilamida, seguido por la tinción con plata. La carga bacteriana fue estandarizada al inicio del protocolo de extracción. En la figura 8 A se muestran los carriles 1: ATCC 33277, 2: 1 ECol3, 3: 8ECol1, 4: 8ECol5, 5: 8ECol6 y 6: 8ECol7, en la figura 8 B, se muestran los carriles 1: ATCC 35406, 2: 1ECol1, 3: 3ECol2, 4: 3ECol5, 5: 3ECol6, 6: 4ECol1, 7: 4ECol4 y 8:4ECol7. Se muestra un gel representativo de al menos tres colonias analizadas independientemente.

## 6. DISCUSIÓN

---

Las infecciones endodónticas se caracterizan por sus comunidades bacterianas mixtas con predominio anaeróbico, debido a las condiciones de humedad, pH, temperatura y nutrientes que ofrece el canal radicular al biofilm que se forma en las paredes del canal. A pesar de los intentos por asociar ciertas especies bacterianas a diferentes infecciones endodónticas en sus diferentes etapas, se ha reportado que existen diferencias en la tasa de detección de estos patógenos en los dientes asociados a infecciones endodónticas (Cao et al., 2012; Foschi, et al., 2005; Hong, Hai et al., 2015; Ozbek & Ozbek, 2010).

Este estudio se enfocó en la identificación de dos especies bacterianas, *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, ya que no hay antecedentes previos para la población Chilena que describiesen su abundancia relativa y tampoco de sus características morfológicas. Respetando todas las pautas en la recolección de los aislados clínicos de exudados periapicales así como también las condiciones de cultivo, la frecuencia de las especies buscadas fue baja; de un total de 34 aislados clínicos de pacientes con el diagnóstico de PAA, sólo 5 resultaron dar cultivos positivos e identificados como *Porphyromonas gingivalis* o *Porphyromonas endodontalis*. La causa de la baja detección de ambos patógenos en los dientes estudiados puede deberse a múltiples factores, entre ellos está el que los métodos de identificación no revelen con certeza la presencia de los patógenos. Estudios han mostrado que la prueba de fluorescencia, bajo la luz ultravioleta y la adición de metanol (360 nm), la cual resulta negativa para *P. gingivalis* y *P. endodontalis* (Slots, 1986), puede generar falsos negativos para *P. gingivalis*, es decir, que bajo luz ultravioleta revele fluorescencia, no obstante, en este estudio incluso utilizando métodos moleculares para su identificación, la detección fue baja, por lo que inferimos que la abundancia relativa de ambas especies bacterianas puede ser baja en la población estudiada, lo que es plausible de asumir, ya que entre las poblaciones analizadas hasta la fecha, existen significativas diferencias en la

proporción de patógenos endodónticos involucrados (Baumgartner, et al., 2004; Machado de Oliveira, et al., 2007; Siqueira & Rocas, 2005).

Uno de los principales inconvenientes en el cultivo de *P. endodontalis* es la variación en su crecimiento bajo las mismas condiciones ambientales. Es claro que ciertos tiempos en la realización de las técnicas experimentales del laboratorio de microbiología pueden afectar el crecimiento bacteriano, pero en esta especie en particular, existía una notoria diferencia en su viabilidad, siendo necesarios múltiples cultivos para lograr crecimiento de las colonias.

En cuanto a la caracterización macromorfológica de los aislados clínicos, podemos apreciar diferencias muy leves entre las colonias de *P. gingivalis* y las colonias de *P. endodontalis*, tanto en medio sólido como en medio líquido (FIGURAS 6 y 7). Para *P. gingivalis*, la caracterización macromorfológica, color, textura y capacidad de autoagregación está bien descrita y asociada a diferencias en la patogenicidad. La morfología colonial como se mencionó en la introducción, se asocia a ciertos componentes de la superficie bacteriana, tales como hidratos de carbono, los que a su vez podrían estar relacionados con la resistencia a compuestos antimicrobianos (Drenkard & Ausubel, 2002; Haussler et al., 2003). En el trabajo de Yamaguchi (2010), los autores demuestran que la pigmentación colonial en placas de agar sangre se relaciona con la hemaglutinación y la actividad de unas importantes proteasas: Arg-gingipaina (RGP) y Lys-gingipaina (KGP), entre otros factores de virulencia. Esto se explicaría por la presencia de complejos gingipaina-adhesina en la superficie de la célula bacteriana que modifican la pigmentación de las colonias, así como alteraciones en la superficie de la bacteria se correlacionan con cambios en la capacidad de autoagregación, y con la formación de biopelículas.

Por otro lado, tenemos las colonias de *P. endodontalis*, especie bacteriana poco documentada en la literatura. Ésta, al igual que *P. gingivalis*, forma colonias pigmentadas de negro, no obstante, *P. endodontalis*, puede formar colonias no pigmentadas de negro, las cuales presentan propiedades estructurales similares a las pigmentadas de negro en cuanto a proteínas de membrana y presencia de

endotoxina (Suzuki et al., 1997). Esto podría ser un factor causante de su baja detección en los dientes con diagnóstico de PAA en los pacientes estudiados, ya que para el estudio sólo utilizamos las colonias pigmentadas de negro, que a diferencia de lo relatado en la literatura, fue escasamente detectada.

*P. endodontalis*, ha sido identificada en diversos estudios como una especie bacteriana prevalente en los canales infectados de dientes con PAA (Cao, et al., 2012; Hong, et al., 2015; Ji, Li, He, & Hou, 2014; Lombardo Bedran et al., 2012; Siqueira, et al., 2008). A pesar de su baja detección en los dientes de los pacientes estudiados, está comprobado que esta especie, a través de sus mecanismos de virulencia que incluyen el LPS, produce activación de la respuesta inmune y destrucción de los tejidos periapicales, que se ha descrito tanto para esta especie (Marinho et al., 2015; Mirucki, et al., 2014) como para *P. gingivalis*. Por otro lado, estudios recientes han asociado la presencia de altas concentraciones de Lipopolisacárido con mayores niveles de destrucción ósea, reflejada radiográficamente como áreas radiolúcidas de mayor diámetro (Gomes et al., 2012). En este estudio se comprobó que las características fenotípicas de los LPS de las dos especies bacterianas estudiadas variaban. Mientras que se obtuvieron LPS completos para *P. gingivalis*, con distribución homogénea entre los diferentes pesos moleculares de sus cadenas, similares a su cepa de referencia, como se puede ver en la FIGURA 8A, *P. endodontalis* mostró un patrón diferente para cada una de las colonias estudiadas. Como se aprecia en la FIGURA 8 B, las colonias de *P. endodontalis*, correspondientes a tres pacientes diferentes, mostraron patrones diferentes de perfil electroforético.

Las moléculas de LPS de bajo peso molecular, cuya estructura es incompleta (lípidos A sin sustituir por cadenas AgO), podrá visualizarse en la porción más baja del gel, mientras que una de alto peso molecular, quedará en la porción más alta del gel. De las bacterias analizadas, todos los aislados de *P. gingivalis* presentaron un perfil electroforético similar a su cepa de referencia, existiendo homogeneidad en la distribución en los tipos diferentes de LPS de los aislados 8ECol4, 8ECol5, 8ECol6 y 8ECol7. En estos aislados además, encontramos una

leve tendencia a largos preferenciales de cadenas de AgO de alto peso molecular, a diferencia de 1ECol3.

A diferencia de lo descrito para *P. gingivalis*, el perfil electroforético visualizado en el gel de tricina-SDS-poliacrilamida teñidos con Nitrato de Plata de *P. endodontalis*, revela una diferencia muy drástica al comparar las colonias de los aislados con su cepa de referencia, así como también una diferencia entre las colonias que se lograron aislar, encontrando similitudes únicamente entre las colonias de cada paciente. Mientras que para la cepa de referencia el LPS es completo y con una distribución homogénea, la única colonia que se asemejó a esto fue MG 1ECol1, el resto de los aislados presentó características fenotípicas distintas; para MG 3ECol2, MG 3ECol5 y MG 3ECol6, los perfiles muestran bandas muy marcadas de Lípido A más core, no obstante, podemos ver que en el extremo superior se aprecian también bandas correspondientes a moléculas de AgO de mayor peso molecular. Finalmente, los aislados MG ECol 1, 4 y 7, presentaron un perfil atípico, solo migrando en la porción más alta del gel y poco definido, lo que atribuimos a una baja proporción de LPS en la membrana externa de estas bacterias y a una predilección por cadenas de AgO de alto peso molecular.

En consecuencia, con los resultados obtenidos en este trabajo podemos sugerir la asociación de las dos especies bacterianas poco estudiadas en el área de la microbiología endodóntica a la patogenia de la PAA, así como también apreciar que su frecuencia de detección en la población estudiada es muy escasa y sus características hacen imperante la necesidad de continuar con estudios que analicen las características macro y micromorfológicas de éstas bacterias, así como también su comportamiento y capacidad de interacción con el hospedero, porque a pesar de su baja detección, tienen mecanismos de patogenicidad que tienen una fuerte asociación con la expresión clínica de la periodontitis apical (Mirucki, et al., 2014; Siqueira et al., 2007).

La terapia endodóntica convencional mediante el tratamiento químico-mecánico del SCR sigue siendo la medida más efectiva para la erradicación de la infección,

permitiendo así la reparación de los tejidos periapicales. El estudio de los componentes de la microbiota del SCR y sus factores de virulencia, nos permiten conocer por un lado, los patógenos y mecanismos involucrados en la enfermedad y por otro, abrir paso a nuevas líneas de investigación que busquen dilucidar cómo interactúan con el hospedero y como podrían intervenir dichos mecanismos. Nuestra investigación sugiere que existen diferencias en los perfiles estructurales del LPS de las especies analizadas, no obstante, su asociación con la patogenia de la patología endodóntica periapical requiere más estudios que contemplen otros factores de virulencia asociados a la presencia de estas dos especies, así como también asociar cuantitativamente la presencia del LPS en la patogenia de la periodontitis apical con efectos en la respuesta inmune-inflamatoria y su manifestación en diferentes formas clínicas de la patología y su respuesta a los tratamientos convencionales realizados en endodoncia.

## 7. CONCLUSIONES

---

Las especies bacterianas estudiadas presentan una baja frecuencia dentro de los pacientes con diagnóstico de PAA estudiados.

Macromorfológicamente existen diferencias muy sutiles entre las colonias de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, lo que no nos permite asociarlas a las diferencias de sus LPS.

Las características fenotípicas del LPS de las dos especies bacterianas analizadas son diferentes: *P. gingivalis* presenta un patrón estructural más conservado y similar a su cepa de referencia, mientras que el LPS de *P. endodontalis* presenta diferencias evidentes entre los diferentes aislados clínicos y su cepa de referencia. Estas variaciones podrían determinar diferencias en la patogenia de la periodontitis apical, en la interacción con el hospedero y en la respuesta a los tratamientos endodónticos convencionales, justificando la necesidad de continuar con estudios que contribuyan a dilucidar estas interrogantes.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

- AAE Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology (2009). *J Endod*, 35, 1634.
- American Association of Endodontists. Glossary of Endodontic Terms. (2012). 8th ed.
- Baumgartner, J. C., Siqueira, J. F., Jr., Xia, T., & Rocas, I. N. (2004). Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod*, 30(3), 141-144.
- Bogen, G., & Slots, J. (1999). Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endod J*, 32(3), 204-210.
- Cao, H., Qi, Z., Jiang, H., Zhao, J., Liu, Z., & Tang, Z. (2012). Detection of *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in primary endodontic infections in a Chinese population. *Int Endod J*, 45(8), 773-781.
- Chavez de Paz, L. E. (2007). Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod*, 33(6), 652-662.
- Delivanis, P. D., & Fan, V. S. (1984). The localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled and overinstrumented canals. *J Endod*, 10(11), 521-524.
- Drenkard, E., & Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416(6882), 740-743.
- Foschi, F., Cavrini, F., Montebugnoli, L., Stashenko, P., Sambri, V., & Prati, C. (2005). Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol*, 20(5), 289-295.
- Golberg, S. y. (2002). *Técnicas y Fundamentos de la Endodoncia*.
- Gomes, B. P., Endo, M. S., & Martinho, F. C. (2012). Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod*, 38(8), 1082-1086.

- Haussler, S., Ziegler, I., Lottel, A., von Gotz, F., Rohde, M., Wehmhohner, D., et al. (2003). Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol*, 52(Pt 4), 295-301.
- Herikstad, H., Motarjemi, Y., & Tauxe, R. V. (2002). *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect*, 129(1), 1-8.
- Herrera S., Bravo D., Hernández M., Garrido M., Dezerega A.(2015). Variabilidad del LPS de *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis* en dientes con Periodontitis Apical Asintomática. Figura 3 "Vías de contaminación del SCR".
- Hong, L., Hai, J., Yan-Yan, H., Shenghui, Y., & Benxiang, H. (2015). [Colonization of *Porphyromonas endodontalis* in primary and secondary endodontic infections]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 33(1), 88-92.
- Jersmann, H. P., Hii, C. S., Ferrante, J. V., & Ferrante, A. (2001). Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Infect Immun*, 69(3), 1273-1279.
- Ji, H., Li, H., He, Y., & Hou, B. (2014). [Study of association between *Porphyromonas* micra and pulp dominant pathogens in the infected root canals with chronic periradicular periodontitis]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 49(8), 495-499.
- Kontani, M., Ono, H., Shibata, H., Okamura, Y., Tanaka, T., Fujiwara, T., et al. (1996). Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. *Infect Immun*, 64(3), 756-762.
- Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4), 1244-1263.
- Liapatas, S., Nakou, M., & Rontogianni, D. (2003). Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*, 36(7), 464-471.

- Lombardo Bedran, T. B., Marcantonio, R. A., Spin Neto, R., Alves Mayer, M. P., Grenier, D., Spolidorio, L. C., et al. (2012). *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study. *J Oral Microbiol*, 4.
- Lukic, A., Danilovic, V., & Petrovic, R. (2008). [Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions]. *Vojnosanit Pregl*, 65(6), 435-440.
- Machado de Oliveira, J. C., Siqueira, J. F., Jr., Rocas, I. N., Baumgartner, J. C., Xia, T., Peixoto, R. S., et al. (2007). Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol*, 22(1), 14-18.
- Marinho, A. C., Martinho, F. C., Leite, F. R., Nascimento, G. G., & Gomes, B. P. (2015). Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. *J Endod*, 41(6), 817-823.
- Marton, I. J., & Kiss, C. (2000). Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 15(3), 139-150.
- Mirucki, C. S., Abedi, M., Jiang, J., Zhu, Q., Wang, Y. H., Safavi, K. E., et al. (2014). Biologic activity of *Porphyromonas endodontalis* complex lipids. *J Endod*, 40(9), 1342-1348.
- Moreno Correa S., Contreras Rengifo A. (2013). Mecanismos moleculares implicados en la destrucción ósea en la periodontitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* Vol. 6(3); 142-147, 2013
- Murray, D. A., & Wilton, J. M. (2003). Lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* prevents apoptosis of HL60-derived neutrophils in vitro. *Infect Immun*, 71(12), 7232-7235.
- Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 2002 40: 1698-1704

- Nair, P. N. (2004). Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15(6), 348-381.
- Ozbek, S. M., & Ozbek, A. (2010). Real-time polymerase chain reaction of "red complex" (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 110(5), 670-674.
- Papo, N., & Shai, Y. (2005). A molecular mechanism for lipopolysaccharide protection of Gram-negative bacteria from antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 280(11), 10378-10387.
- Park, O. J., Min, K. M., Choe, S. J., Choi, B. K., & Kim, K. K. (2004). Use of insertion sequence element IS1126 in a genotyping and transmission study of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*, 42(2), 535-541.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700.
- Reeves, P. R., Hobbs, M., Valvano, M. A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., et al. (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol*, 4(12), 495-503.
- Ricucci, D., & Siqueira, J. F., Jr. (2010). Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*, 36(8), 1277-1288.
- Sakamoto, M., Siqueira, J. F., Jr., Rocas, I. N., & Benno, Y. (2007). Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*, 22(1), 19-23.
- Seltzer, S., Bender, I. B., & Ziontz, M. (1963). THE INTERRELATIONSHIP OF PULP AND PERIODONTAL DISEASE. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 16, 1474-1490.
- Shah HN, Collins MD (1988). Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 128-131.
- Silva, N., Dutzan, N., Hernandez, M. & other authors (2008). Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of

- chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol* 35, 206-214.
- Siqueira, J. F., Jr., & Rocas, I. N. (2005). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod*, 31(7), 488-498.
- Siqueira, J. F., Jr., Rocas, I. N., Paiva, S. S., Magalhaes, K. M., & Guimaraes-Pinto, T. (2007). Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol*, 22(4), 266-271.
- Siqueira J.F., Rôças I.N., (2007) Bacterial Pathogenesis and Mediators in Apical Periodontitis, *Braz Dent J* 18(4): 267-280)
- Siqueira, J. F., Jr., Rocas, I. N., & Silva, M. G. (2008). Prevalence and clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections. *J Endod*, 34(11), 1332-1336.
- Slots, J. (1986). Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol*, 1(1), 48-57.
- Slots, J., Ashimoto, A., Flynn, M. J., Li, G., & Chen, C. (1995). Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis*, 20 Suppl 2, S304-307.
- Sun, Y., Wang, M., Liu, H., Wang, J., He, X., Zeng, J., et al. (2011). Development of an O-antigen serotyping scheme for *Cronobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol*, 77(7), 2209-2214.
- Suzuki, K., Ikeda, T., Nakamura, H., & Yoshimura, F. (1997). Isolation and characterization of a nonpigmented variant of *Porphyromonas endodontalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 12(3), 155-161.
- Tomazinho, L. F., & Avila-Campos, M. J. (2007). Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103(2), 285-288.

- Torrunguang, K., Bandhaya, P., Likittanasombat, K., & Grittayaphong, C. (2009). Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban Thai adults. *J Periodontol*, *80*(1), 122-129.
- Tsai C. and Frasch C. E. (1982), Comparison of Two Silver Staining Techniques for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* *119*:115-119.
- Vernal R. (2010). "Patogénesis de la periodontitis". Periodoncia básica, clase magistral. Universidad de Chile. 9 de Mayo 2011.
- Vianna, M. E., Horz, H. P., Gomes, B. P., & Conrads, G. (2006). In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*, *39*(6), 484-492.
- Yamaguchi, M., Sato, K., Yukitake, H., Noiri, Y., Ebisu, S., & Nakayama, K. (2010). A *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of the polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation, and increased biofilm formation. *Infect Immun*, *78*(9), 3801-3812.
- Zaric, S., Shelburne, C., Darveau, R., Quinn, D. J., Weldon, S., Taggart, C. C., et al. (2010). Impaired immune tolerance to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide promotes neutrophil migration and decreased apoptosis. *Infect Immun*, *78*(10), 4151-4156.
- Zou, W., & Bar-Shavit, Z. (2002). Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res*, *17*(7), 1211-1218.

## 9. ANEXOS

### 1. Clasificación de las Patologías Pulpares y Periapicales:

Terminología del Consenso Diagnóstico difundido por la Asociación Americana de Endodoncia.

#### **Recommended Terms**

### AAE Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology

<b>Pulpal</b>	
Normal pulp	A clinical diagnostic category in which the pulp is symptom-free and normally responsive to pulp testing.
Reversible pulpitis	A clinical diagnosis based on subjective and objective findings indicating that the inflammation should resolve and the pulp return to normal.
Symptomatic irreversible pulpitis	A clinical diagnosis based on subjective and objective findings indicating that the vital inflamed pulp is incapable of healing. Additional descriptors: lingering thermal pain, spontaneous pain, referred pain.
Asymptomatic irreversible pulpitis	A clinical diagnosis based on subjective and objective findings indicating that the vital inflamed pulp is incapable of healing. Additional descriptors: no clinical symptoms but inflammation produced by caries, caries excavation, trauma.
Pulp necrosis	A clinical diagnostic category indicating death of the dental pulp. The pulp is usually nonresponsive to pulp testing.
Previously treated	A clinical diagnostic category indicating that the tooth has been endodontically treated and the canals are obturated with various filling materials other than intracanal medicaments.
Previously initiated therapy	A clinical diagnostic category indicating that the tooth has been previously treated by partial endodontic therapy (eg, pulpotomy, pulpectomy).
<b>Apical</b>	
Normal apical tissues	Teeth with normal periradicular tissues that are not sensitive to percussion or palpation testing. The lamina dura surrounding the root is intact, and the periodontal ligament space is uniform.
Symptomatic apical periodontitis	Inflammation, usually of the apical periodontium, producing clinical symptoms including a painful response to biting and/or percussion or palpation. It might or might not be associated with an apical radiolucent area.
Asymptomatic apical periodontitis	Inflammation and destruction of apical periodontium that is of pulpal origin, appears as an apical radiolucent area, and does not produce clinical symptoms.
Acute apical abscess	An inflammatory reaction to pulpal infection and necrosis characterized by rapid onset, spontaneous pain, tenderness of the tooth to pressure, pus formation, and swelling of associated tissues.
Chronic apical abscess	An inflammatory reaction to pulpal infection and necrosis characterized by gradual onset, little or no discomfort, and the intermittent discharge of pus through an associated sinus tract.
Condensing osteitis	Diffuse radiopaque lesion representing a localized bony reaction to a low-grade inflammatory stimulus, usually seen at apex of tooth.

## 2. Lecturas TABLA N°5

<b>Forma</b>	<b>Circulares, irregulares, otras formas específicas</b>
<b>Textura</b>	Lisa, rugosa, mixta
<b>Color</b>	Marrón/Negro
<b>Consistencia</b>	Blanda/Firme
<b>Opacidad</b>	Brillante/Opaca
<b>Elevación</b>	Muy elevada (+++), medianamente elevada (++) , poco elevada (+), sin elevación (-)
<b>Convexidad</b>	Completamente convexa (+++), convexa en el centro (++) , leve convexidad (+), cóncava (-)
<b>Tamaño</b>	Colonias de gran tamaño (+++), medianas (++) , pequeñas (+)

## 3. Lecturas TABLA N°6

<b>Tipo crecimiento</b>	<b>de Sedimentado, suspendido o ambos</b>
<b>Suspensión</b>	Gran turbidez (+++), mediana turbidez (++) , poca turbidez (+), sin turbidez (-)
<b>Agregación</b>	Gran cantidad de agregado en el fondo del tubo (+++), mediana cantidad (++) , poca cantidad (+), nula agregación (-)
<b>Formación grumos</b>	de Forma muchos grumos (+++), medianamente (++) , pocos grumos (+), no forma (-)
<b>Coloración</b>	Negro/café oscuro/café claro/blanquecino
<b>Formación Velo</b>	de Forma velo (+), no forma velo (-)
<b>Crecimiento</b>	Densidad óptica a las 48 hrs a 600 nm.

## 4. Consentimiento Informado

Ed. 30/07/2011

## DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

PROYECTO PATROCINADO POR FONDECYT 2011: "ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA LOCAL DEL HOSPEDERO FRENTE A LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA E INFLAMACIÓN SISTÉMICA DE BAJO GRADO EN PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA. ESTUDIO LONGITUDINAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO ENDODÓNTICO CONSERVADOR"

Versión 1, pacientes 18 años o más

**Antecedentes generales:** Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio titulado "Asociación entre la respuesta local del hospedero frente a la infección endodóntica e inflamación sistémica de bajo grado en Periodontitis Apical Asintomática. Estudio longitudinal para evaluar los efectos del tratamiento endodóntico conservador". Esta enfermedad corresponde a una infección de origen dental que generalmente se produce por caries no tratadas y genera una lesión destructiva en los tejidos que rodean la raíz del diente. El tratamiento de estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico (instrumentación y desinfección del conducto de la raíz dentaria), ambos con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas a esta enfermedad. En términos generales, el objetivo del presente estudio es caracterizar la presencia de inflamación local, en los tejidos que rodean el diente, (a partir de dientes extraídos y fluido de la encía) y sistémica, es decir en tejidos u órganos distantes al diente mediante análisis de la sangre en este último caso; como consecuencia de esta enfermedad y las bacterias que la provocan. Esto permitirá determinar si la presencia de estas lesiones podría implicar un riesgo en la producción de otras enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares y el efecto del tratamiento endodóntico sobre este potencial riesgo. Con este fin, se incluirán pacientes con periodontitis apical asintomática (enfermedad en estudio) y se excluirán aquellos pacientes que presenten enfermedades generales y periodontitis crónica, dado que estas podrían influir sobre los resultados. Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio cuando lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

**Procedimiento:** Se incluirán pacientes con diagnóstico de diente con Periodontitis Apical Asintomática y controles sin el problema dental, ninguno con enfermedades generales. Cuando esté indicado, el especialista en endodoncia le realizará el tratamiento de

23/04/2012  
COMITE ASESOR  
DE BIOÉTICA  
FONDECYT

Ed. 30/07/2011

conducido, durante el cual se les tomarán primero muestras de fluido del surco entre encía y diente usando una tira de papel absorbente y segundo, un auxiliar paramédico calificado adscrito al proyecto tomara muestras de su sangre por punción venosa del brazo. Las muestras se tomaran antes y una semana, 3, 6 y 12 meses despues del tratamiento. La duración del estudio será por tanto de un año en pacientes que se realicen tratamiento endodóntico, y sólo la sesión de toma de muestra y/o extracción dentaria en el caso del resto de los participantes. *El financiamiento del tratamiento será responsabilidad del paciente, mientras que los análisis de muestras serán financiados por el proyecto, así como el estudio radiográfico requerido para éste.*

En los pacientes que presenten indicación de extracción dentaria, las lesiones asociadas serán extirpadas y analizadas. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos ni costos adicionales para el paciente y una vez analizadas serán descartadas.

El total de muestras y datos obtenidos serán registrados e identificados por el investigador responsable mediante códigos para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales y los códigos servirán para mantener oculta la identidad de los participantes. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitando al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, sólo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

**Ventajas:** Como ventajas de participar en el presente estudio, las personas podrán acceder a tratamiento endodóntico de costo reducido, estudio radiográfico asociado y análisis de perfil lipídico (riesgo cardiovascular) y hemoglobina glicosilada (riesgo de diabetes) gratuitos y se informará a aquellos que tengan niveles alterados.

**Investigador Responsable:**

Dra. Marcela Hernández Ríos. RUT: 12.517.528-7  
 Deplo. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.  
 Fonc: 9781833  
 e-mail: mhernandezrios@gmail.com

23/04/2012  
 COMITE ASESOR  
 DE BIOÉTICA  
 FONDECYT

Ed. 30/07/2011

**FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES ADULTOS**

**Investigador responsable:** Dra. Marcela Hernández Ríos; Marcela Hernández Ríos;  
Deplo. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Fonc: 9781806;  
email: mhernandezrios@gmail.com.

Yo..... estoy dispuesto a participar en el proyecto de investigación. He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto:

Firma  
.....

Ante cualquier duda puedo preguntar al Comité de Ética de la Facultad de Odontología cuyo presidente es el Dr. Juan Cortés; teléfono: 9781702 y su dirección es Facultad de Odontología de la U. de Chile, Edificio Administrativo, Oficina Vicedecanato, 4º piso, Sergio Livingston P. 943, Independencia.

Al sujeto de investigación he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto sujeto de investigación. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna.  
He sido testigo que el sujeto firmó el documento:

Nombre del Investigador:.....

Firma del Investigador: ..... Fecha: .....

R 23/04/2012  
COMITE ASESOR  
DE BIOÉTICA  
FONDECYT



## 5. Informe de aprobación del comité de ética



Comisión Nacional de Investigación  
Científica y Tecnológica - CONICYT

**INFORME DE ASPECTOS BIOÉTICOS  
CONCURSO NACIONAL DE PROYECTOS FONDECYT REGULAR 2012**

<b>N° Proyecto</b>	1120138
<b>Investigador/a Responsable</b>	EMMA MARCELA HERNANDEZ RIOS
<b>Título</b>	CROSSTALK BETWEEN LOCAL HOST RESPONSE TO ENDOODONTIC INFECTION AND LOW-GRADE SYSTEMIC INFLAMMATION IN ASYMPTOMATIC APICAL PERIODONTITIS: PROSPECTIVE STUDY EVALUATING THE EFFECT OF CONSERVATIVE ENDOODONTIC TREATMENT
<b>Institución</b>	UNIV.DE CHILE/FAC.DE ODONTOLOGIA
<b>Grupo de Estudio</b>	MEDICINA G2-G3
<b>Fecha</b>	Santiago, 25 de enero de 2012

**Observaciones:**

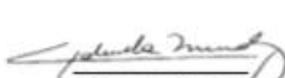
Adjunta acta de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, con fundamentación.

Adjunta Consentimiento Informado (CI) para pacientes con periodontitis apical asintomática, otro para padres de menores con dientes sanos (controles) y asentimiento informado para estos menores, que son adecuados.

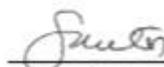
**Conclusiones:**

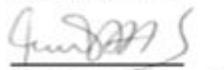
- Sin observaciones.

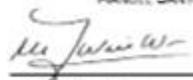
Este informe ha sido preparado por los miembros del Comité Asesor de Bioética de FONDECYT.

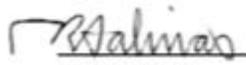
  
GABRIELA MÉNDEZ

  
RAFAEL TÉLLEZ

  
MANUEL SARTORIUS

  
MARÍA ANGÉLICA SOTOMAYOR

  
MARÍA INÉS WINKLER

  
RODRIGO SALINAS

  
RAÚL VELLARROEL

