



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

**“Susceptibilidad antimicrobiana asociada a diferentes perfiles de LPS de  
*Porphyromonas endodontalis* en Periodontitis Apical Asintomática”**

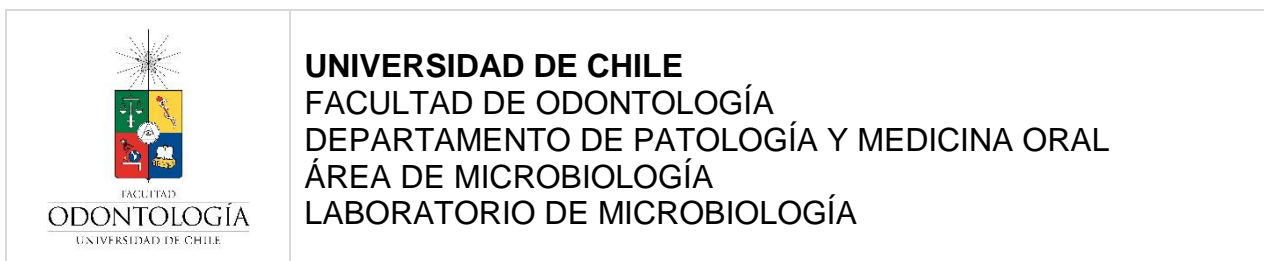
**Mariela Fernanda Jiménez Parra**

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

**TUTOR PRINCIPAL: Dra. Denisse Bravo R.  
TUTOR ASOCIADO: Dra. Marcela Hernández R.**

**Financiado por: FONDECYT N°1120138 Santiago – Chile 2015**





**“Susceptibilidad antimicrobiana asociada a diferentes perfiles de LPS de *Porphyromonas endodontalis* en Periodontitis Apical Asintomática”**

**Mariela Fernanda Jiménez Parra**

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

**TUTOR PRINCIPAL: Dra. Denisse Bravo R.  
TUTOR ASOCIADO: Dra. Marcela Hernández R.**

**Financiado por: FONDECYT N°1120138 Santiago – Chile 2015**



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Fernando y Mariela porque siempre me han entregado su amor y apoyo incondicional. Me han enseñado la importancia de la rectitud, honestidad y amabilidad en la vida, del esfuerzo y el trabajo para conseguir lo que se desea y el afrontar todos los desafíos y pruebas que nos depara la vida con valentía y una sonrisa en la cara. Gracias porque me han brindado todas las herramientas y condiciones, de la manera más amorosa posible, para crecer y cumplir mis sueños. Sin ustedes nada de esto sería posible.

También quiero agradecer a mis hermanos, Nicole y David, por su compañerismo, cariño y amistad, hemos crecido y aprendido juntos, compartido buenos y malos momentos, gracias a ustedes el camino ha sido más fácil y feliz para mí.

A mis amigos y lindas personas con quienes compartí innumerables situaciones a lo largo de estos años y me han regalado muchísimos momentos de alegría.

Por supuesto agradecer a mis tutoras Dra. Denisse Bravo R. y Dra. Marcela Hernández R. por darme la oportunidad de realizar este trabajo y proporcionarme toda la ayuda necesaria para terminarlo. Gracias por todos los conocimientos y el inmenso aprendizaje que me han dado.

También quiero agradecer a Daniela y Darna quienes me enseñaron y ayudaron amablemente a desarrollar el estudio en el laboratorio y me brindaron un ambiente ameno y alegre de trabajo.

A todos los docentes, funcionarios y compañeros que compartieron conmigo durante mi carrera y tuvieron siempre una sonrisa o una bonita palabra para entregar.

Inmensamente agradecida de todos ellos y orgullosa de llevar el título de mi querida Universidad de Chile.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
LISTA DE ABREVIACIONES.....	9
RESUMEN.....	10
1. MARCO TEÓRICO .....	12
1.1. Patología Periapical.....	12
1.2. Microbiología de las ALEOs.....	16
1.3. <i>Porphyromonas endodontalis</i> .....	17
1.4. Antimicrobianos utilizados en tratamientos endodónticos .....	19
1.5. Planteamiento del problema .....	20
2. HIPÓTESIS .....	22
3. OBJETIVOS .....	22
3.1. Objetivo General.....	22
3.2. Objetivos Específicos .....	22
4. METODOLOGÍA.....	23
4.1. Aislados clínicos de <i>P. endodontalis</i> y perfiles de LPS .....	23
4.2. Pruebas microbiológicas para determinar susceptibilidad a antimicrobianos .....	25
4.3. Análisis de los resultados .....	29
5. RESULTADOS .....	30
5.1. Susceptibilidad de los aislados clínicos frente a antimicrobianos.....	30
5.1.1. Ensayos de microdilución .....	30
5.1.2. Ensayos de difusión.....	30
6. DISCUSIÓN.....	39
7. CONCLUSIONES.....	44
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
9. ANEXOS .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Radiografía periapical. Área radiolúcida compatible con lesión periapical de origen endodóntico (ALEO).....	14
<b>Figura 2.</b> Corte histológico del periápice de diente con periodontitis apical asintomática. Se observa granuloma periapical (GR).....	15
<b>Figura 3.</b> Corte histológico de Quiste radicular inflamatorio.....	15
<b>Figura 4.</b> Estructura de LPS bacteria Gram –negativa.....	18
<b>Figura 5.</b> Nomenclatura utilizada para la nominación de los aislados clínicos. ....	23
<b>Figura 6.</b> Resumen de aislados identificados como <i>P. endodontalis</i> a través de PCR. ....	24
<b>Figura 7.</b> Perfil electroforético del LPS de los diferentes aislados clínicos de <i>P. endodontalis</i> .....	25
<b>Figura 8.</b> Ensayo de difusión en placa de agar-sangre hemina-menadiona. Clorhexidina sobre el aislado 4ecol7. ....	27
<b>Figura 9: a.</b> Ensayo de difusión en placa de agar-sangre hemina-menadiona. PMB en distintas concentraciones sobre aislado de <i>P. endodontalis</i> 3ecol2. <b>b.</b> Ensayo de difusión en placa de agar-sangre hemina-menadiona. Hipoclorito de sodio sobre aislado de <i>P. endodontalis</i> 3ecol5 .....	31
<b>Figura 10.</b> Susceptibilidad a clorhexidina de aislados clínicos de <i>P. endodontalis</i> y cepa de referencia ATCC™ 35406®. ....	32
<b>Figura 11.</b> Susceptibilidad a hipoclorito de sodio de aislados clínicos de <i>P. endodontalis</i> y cepa de referencia ATCC™ 35406®. ....	33
<b>Figura 12.</b> Susceptibilidad a PMB de aislados clínicos de <i>P. endodontalis</i> y cepa de referencia ATCC™ 35406®.....	34
<b>Figura 13.</b> Susceptibilidad a amoxicilina de aislados clínicos de <i>P. endodontalis</i> y cepa de referencia ATCC™ 35406®. ....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones estudiadas de los diferentes antimicrobianos en ensayos de difusión. ....	26
<b>Tabla 2</b> Concentraciones utilizadas para el estudio de los diferentes antimicrobianos en ensayos de microdilución.....	28



**LISTA DE ABREVIACIONES**

<b>ABREVIACIÓN</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
AAA	Absceso apical agudo
AAC	Absceso apical crónico
ALEO	Lesión periapical de origen endodóntico
AgO	Antígeno O
BPB	Bacterias pigmentadas de negro
CHX	Clorhexidina
DO	Densidad óptica
GP	Granuloma periapical
LPS	Lipopolisacárido
NaOCl	Hipoclorito de sodio
OC	Osteítis condensante
PA	Periodontitis apical
PAA	Periodontitis apical asintomática
PAS	Periodontitis apical sintomática
PMB	Polimixina B
PMN	Polimorfonucleares
QRI	Quiste radicular inflamatorio
SCR	Sistema de canales radiculares

## RESUMEN

**Introducción:** Diversos agentes antimicrobianos son utilizados en el tratamiento de las patologías periapicales, entre las cuales destaca la periodontitis apical (PA). Una de las formas comunes de la PA es la periodontitis apical asintomática (PAA), que corresponde a una infección endodóntica de origen polimicrobiano mixto que se caracteriza por una respuesta negativa a los tests de sensibilidad pulpar y presentar radiográficamente un área radiolúcida periapical en el o los dientes afectados. Algunos de los microorganismos involucrados en su desarrollo pertenecen a la especie bacteriana *P. endodontalis*. Ésta es una bacteria anaerobia estricta, Gram -negativo, que posee al lipopolisacárido (LPS) dentro de sus principales factores de virulencia. El LPS está compuesto por Lípido A unido a un core, y una cantidad variable de moléculas de antígeno (Ag) O, unidas a este último constituyente. Recientemente, se describieron distintos perfiles de LPS en aislados clínicos de *P. endodontalis*, sin embargo se desconoce la potencial relevancia clínica de éstos. Si bien en otras especies se relacionan con la susceptibilidad de las bacterias a algunos agentes antimicrobianos, hasta la fecha no existen estudios para *P. endodontalis* ni sus distintos perfiles de LPS.

**Objetivos:** En el presente trabajo de investigación se analizó la susceptibilidad de aislados clínicos de *P. endodontalis*, que presentan diferentes perfiles de LPS, a diferentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la periodontitis apical.

**Material y métodos:** Se realizaron antibiogramas con diferentes aislados clínicos de *P. endodontalis*, tomados de exudados de conductos radiculares de dientes con diagnóstico de Periodontitis apical asintomática (PAA), de individuos que asistieron a la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Además, se realizaron ensayos de microdilución con los mismos aislados clínicos. En estos dos tipos de ensayos fueron utilizados 4 antimicrobianos comúnmente usados en el tratamiento de

infecciones endodónticas, éstos fueron clorhexidina, hipoclorito de sodio (NaOCl), polimixina B (PMB), y amoxicilina. Se compararon estos resultados con el perfil electroforético de LPS de dichas bacterias, obtenido de un estudio previamente realizado en el Laboratorio de Microbiología Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

**Resultados:** Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las respuestas de los aislados clínicos de *P. endodontalis* (ATCC™ 35406®, 1ecol1, 3ecol2, 3ecol5, 3ecol6, 4ecol1, 4ecol4 y 4ecol7) frente a los distintos antimicrobianos utilizados. Amoxicilina fue el antimicrobiano con mayor actividad de inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que el hipoclorito de sodio fue el agente con menor actividad antimicrobiana. Las respuestas ante los diferentes antimicrobianos en algunos casos se relacionaron con la estructura del LPS bacteriano: Aquellos aislados que presentaron un LPS más completo, con lípido A unido a core y varias cadenas AgO de bajo peso molecular, ATCC™ 35406® y 1ecol1, fueron más susceptibles a clorhexidina y amoxicilina. Por otro lado, las cepas que presentaron lípido A y core unido a pocas moléculas de AgO, es decir 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6, fueron más susceptibles a polimixina B. Finalmente, las cepas con una menor cantidad de LPS, con muy pocas cadenas de AgO de alto peso molecular, 4ecol1, 4ecol4 y 4ecol7, fueron más susceptibles sólo a amoxicilina.

**Conclusiones:** Distintos aislados clínicos de *P. endodontalis* y perfiles de LPS presentaron respuestas diferentes ante los agentes antimicrobianos estudiados.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Patología Periapical

Las patologías periapicales de origen endodóntico son un conjunto de diversos cuadros clínicos que afectan los tejidos que rodean el periápice del diente. Éstas pueden ser tanto de origen infeccioso como no infeccioso (Delivanis and Fan 1984; Stashenko et al. 1998).

Las de origen infeccioso pueden adquirir la carga microbiana a través de diferentes vías:

- Tejidos duros: caries, iatrogenia operatoria, iatrogenia periodontal, trauma dentoalveolar, dentina expuesta.
- Tratamiento endodóntico defectuoso.
- Enfermedad periodontal.
- Vía Anacorética: por bacteremia preexistente, o sobreinstrumentación en tratamiento endodóntico (Delivanis and Fan 1984)

Las de origen no infeccioso se remiten a causas traumáticas, principalmente (Delivanis and Fan 1984; Stashenko et al. 1998).

Dentro de los diagnósticos endodónticos de las patologías que afectan a los tejidos periapicales, según la asociación americana de endodoncia (AAE 2009) (Anexo1), podemos encontrar:

- Tejidos apicales normales
- Periodontitis apical asintomática (PAA): Corresponde a la inflamación y destrucción del periodonto apical. Radiográficamente se observa como una zona radiolúcida (Fig. 1). No produce síntomas clínicos.
- Periodontitis apical sintomática (PAS): Inflamación del periodonto apical, produce sintomatología clínica como respuesta dolorosa a la percusión

o palpación del diente afectado. Éste puede o no estar asociado a un área radiolúcida periapical.

- Absceso apical agudo (AAA): Es una respuesta inflamatoria a la infección y necrosis pulpar, caracterizada por un rápido inicio, dolor espontáneo, formación de exudado purulento.
- Absceso apical crónico (AAC): Respuesta inflamatoria a la infección y necrosis pulpar, caracterizada por un inicio lento, poco o nada de dolor, descarga intermitente de exudado purulento a través de una fístula asociada.
- Osteítis condensante (OC): Es una lesión radiopaca difusa que corresponde a una reacción local del hueso ante un estímulo inflamatorio de bajo grado, usualmente observada en el ápice del diente.

La periodontitis apical asintomática (PAA) es una inflamación y destrucción de los tejidos perirradiculares (AAE 2009; 2012). Ocurre como consecuencia de distintos tipos de injurias a la pulpa dental, incluyendo infección, trauma físico, iatrogenia, entre otros (Delivanis and Fan 1984; Nair 1997).

En respuesta a las injurias pulpares, el hospedero responde mediante la activación de una gran variedad de células, que pueden ser parte del sistema inmune, como leucocitos polimorfonucleares (PMN), linfocitos, células plasmáticas y monocitos o macrófagos, o células residentes como fibroblastos y osteoblastos. También se producen anticuerpos y moléculas efectoras (Nair 2004).

El encuentro dinámico entre microorganismos y la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero genera una reacción que tiene como resultado la destrucción de los tejidos periapicales, entre éstos, la reabsorción del hueso que rodea el ápice del diente y, posteriormente se produce la formación de la lesión periapical de origen endodóntico (ALEO) (Fig. 1).

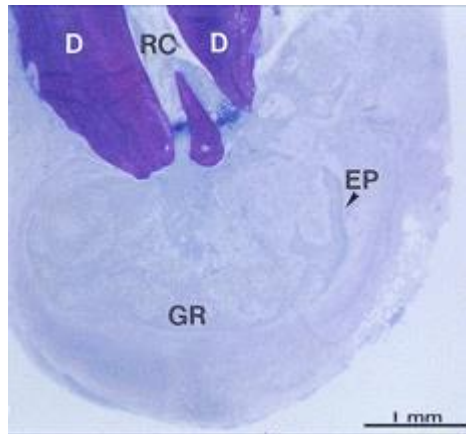


**Figura 1.** Radiografía periapical. Área radiolúcida compatible con lesión periapical de origen endodóntico (ALEO).

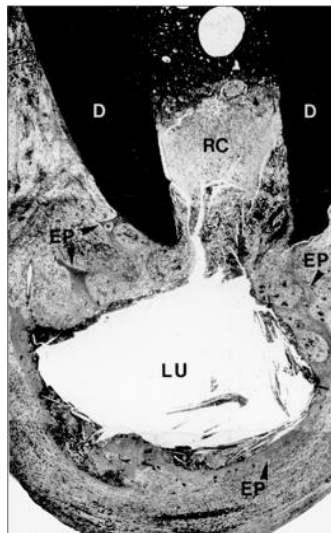
Dependiendo de la capacidad del hospedero para neutralizar a los microorganismos y sus toxinas, como también a las sustancias tóxicas originadas por la necrosis pulpar, la PAA puede evolucionar desde la cronicidad a estados agudos y viceversa (Nair 2004).

Clínicamente, la PAA se caracteriza por la formación de una ALEO en ausencia de sintomatología y presenta por tanto respuesta negativa a los tests de sensibilidad y percusión (AAE 2009).

Histológicamente, las ALEOs pueden corresponder a un granuloma periapical (GP) (Fig. 2) o un quiste radicular inflamatorio (QRI) (Fig. 3) (Graunaite et al. 2012). El QRI es una cavidad patológica compuesta por un epitelio plano pluriestratificado no queratinizado y una cápsula conjuntiva inflamada, mientras que el GP está formado por tejido de granulación y grados variables de infiltrado inflamatorio (Liapatas et al. 2003).



**Figura 2.** Corte histológico del periápice de diente con periodontitis apical asintomática. Se observa granuloma periapical (GR), en relación con paredes dentinarias del ápice (D), y el canal radicular (RC), además se observa presencia de epitelio (EP) junto al GR (Nair 2004).



**Figura 3.** Corte histológico de Quiste radicular inflamatorio. Se observa un lumen quístico (LU) en relación al canal radicular (RC) y las paredes dentinarias (D) del ápice dentario. También se observa una pared epitelial (EP), delimitando el quiste (Nair 2004).

## 1.2. Microbiología de las ALEOs

La periodontitis apical es una inflamación y destrucción de los tejidos periapicales y se instaura debido a la infección del sistema de canales radiculares (SCR) por microorganismos que han logrado traspasar la barrera de esterilidad original del complejo pulpodentinario de un diente, a través de las vías mencionadas anteriormente (Delivanis and Fan 1984).

Las comunidades microbianas en la periodontitis apical se caracterizan por ser mixtas con predominio de bacterias anaerobias en el SCR (Sakamoto et al. 2007; Siqueira and Rocas 2005; Vianna et al. 2006). Según algunos estudios, los microorganismos que participan en la infección del SCR son similares a los encontrados en sacos periodontales de pacientes con enfermedad periodontal activa (Nair 1997; Siqueira et al. 2008).

El segmento apical del diente actúa como un nicho ecológico en el cual existe una baja tensión de oxígeno, además se encuentran nutrientes que provienen de los exudados periapicales y de las bacterias presentes a este nivel. Todo esto contribuye a que se genere un medio en que se seleccionan especies bacterianas con un metabolismo fundamentalmente anaerobio estricto y proteolítico (Nair 1997).

Los géneros bacterianos aislados más frecuentemente en pulpas necróticas de dientes con periodontitis apical son: *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Campylobacter*, *Porphyromonas*, *Eubacterium* y *Streptococcus* (Zerr et al. 1998). Más específicamente podemos mencionar a *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, como especies detectadas en dientes con infecciones endodónticas, y sus factores de virulencia contribuyen con signos y síntomas asociados (Gomes et al. 2005). Estas especies bacterianas corresponden a bacterias pigmentadas de negro (BPB), bacilos anaerobios Gram -negativo, predominantes en infecciones endodónticas. Se ha descrito también que dichas bacterias pueden ser encontradas con frecuencia en las infecciones de



la cavidad oral y de las vías respiratorias e intestinales (Bogen and Slots 1999; Tomazinho and Avila-Campos 2007).

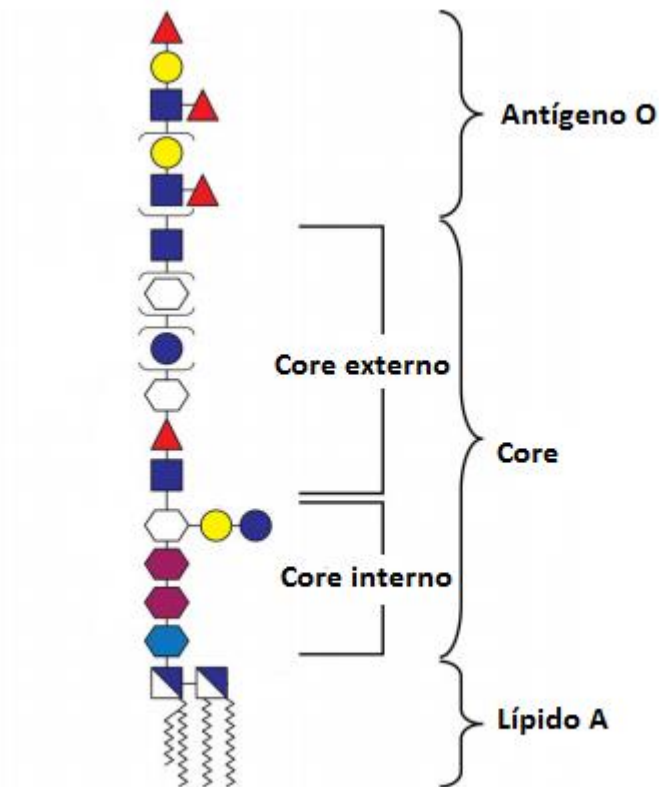
### 1.3. *Porphyromonas endodontalis*

*P. endodontalis* corresponde a una especie de bacterias proteolíticas, anaerobias estrictas, que no forman esporas, Gram -negativo, bacilos o cocobacilos.

En PA esta especie ha sido ampliamente relacionada con dolor, exudado purulento y formación de abscesos apicales agudos, es decir, podría contribuir con la agudización de signos y síntomas (Zerr et al. 1998). Sin embargo, según estudios realizados recientemente *P. endodontalis* tendría una alta tasa de prevalencia en cuadros crónicos apicales, es decir en PAA, de modo que puede llegar a estar presente en la microbiota de un 56% de las PAA (Rocas and Siqueira 2008; Wang et al. 2012).

La patogenicidad de *P. endodontalis* se atribuye a diferentes factores de virulencia, entre éstos los relacionados con la estructura celular. Éstos contribuyen al desarrollo de la periodontitis apical. Dentro de estos factores encontramos la cápsula o antígeno K, el lipopolisacárido (LPS) y la producción de enzimas específicas como la fosfolipasa A (Hong et al. 2004).

El LPS, es el mayor constituyente de la membrana externa de las bacterias Gram -negativo. Es una molécula glicolípídica compuesta por un heteropolisacárido fosforilado que está covalentemente unido a un lípido que contiene glucosamina, llamado lípido A. Este último constituyente se encuentra unido directamente a la membrana externa de la bacteria. La porción de polisacárido que protruye de la membrana externa ha sido dividida en dos regiones principales: una región interna o central llamada core y una porción externa denominada antígeno (Ag) O. El lípido A posee la actividad endotóxica del LPS (Fig. 4) (Raetz and Whitfield 2002).



**Figura 4.** Estructura de LPS bacteria Gram –negativa (Li et al. 2016).

El LPS participa en la activación de la respuesta inmunoinflamatoria y la consecuente destrucción de los tejidos periapicales durante el desarrollo de la PA (Mirucki et al. 2014). La acumulación de componentes bacterianos como el LPS pueden estimular la liberación de citoquinas pro-inflamatorias tanto de neutrófilos, monocitos o macrófagos, leucocitos, linfocitos, como otras células residentes (Hong et al. 2004). Se ha observado también que lípidos estructurales complejos de *P. endodontalis* inhiben la diferenciación de osteoblastos y la aposición de minerales, así como también promueven la diferenciación de células osteoclásticas (Mirucki et al. 2014).

El LPS de *P. endodontalis* corresponde al componente de la bacteria que es reconocido por células del sistema inmune a través de receptores específicos

ubicados en la membrana celular (Hanazawa et al. 1991). En un estudio recientemente realizado por nuestro grupo de investigación, se observó que diferentes aislados clínicos de esta bacteria presentan diferentes fenotipos de LPS (Herrera 2015). El LPS además corresponde a un blanco para algunos antimicrobianos, como la polimixina B (PMB), la cual se une a la porción del lípido A inhibiendo así la mayoría de las funciones del LPS mencionadas anteriormente (Hong et al. 2004). Basados en estos antecedentes podemos especular que según la variabilidad del LPS podríamos encontrar distintas respuestas bacterianas ante determinados antimicrobianos de uso sistémico y tópico utilizados en el tratamiento de infecciones endodónticas como la periodontitis apical. Sin embargo, también es cierto que la susceptibilidad de estas bacterias ante los mencionados antimicrobianos podría variar según el mecanismo de acción de dichos agentes.

#### 1.4. Antimicrobianos utilizados en tratamientos endodónticos

El tratamiento de las infecciones endodónticas consiste en la realización de un abordaje mecánico y químico para eliminar la microbiota causal, mediante instrumentación mecánica e irrigación de el o los canales del diente con un agente antimicrobiano (Sena et al. 2006). Al finalizar este proceso se sella el diente con una obturación que impedirá el ingreso de bacterias y la colonización por parte de éstas en el SCR (Asgary and Fazlyab 2015).

Dentro de los agentes antimicrobianos utilizados en el abordaje químico de las infecciones endodónticas podemos encontrar el hipoclorito de sodio (NaOCl). Es una base fuerte de pH 11, posee una marcada acción antimicrobiana, disuelve tejidos orgánicos, sirve como lubricante y es de rápida acción (Mohammadi 2008). En clínica se utiliza preferentemente a una concentración del 5,25% (Sena et al. 2006).

Otra opción de irrigante es la clorhexidina; que es una bisguanidina catiónica de pH 5,5 a 7 y posee una acción antimicrobiana de amplio espectro. En

ocasiones también es utilizada para medicar el SCR entre sesiones. Generalmente se utiliza a una concentración del 2% (Mohammadi and Abbott 2009; Mortenson et al. 2012).

En situaciones clínicas específicas puede ser necesario el uso de terapia antimicrobiana sistémica en conjunto con el abordaje mecánico y químico de la infección endodóntica. Esto se realiza en casos de infecciones agudas, o infecciones crónicas que se agudizan, que cursan con dolor, compromiso del estado general y otros signos y síntomas como el aumento de volumen facial, presencia de exudado purulento, entre otras. El antimicrobiano de elección en la mayoría de los casos es la amoxicilina, que es un antibiótico semi-sintético derivado de la penicilina. Se utiliza por su alto espectro antimicrobiano, ya que actúa sobre bacterias Gram -positivo y -Gram negativo (Jayadev et al. 2014).

Por último, la PMB es un antibiótico polipeptídico catiónico, producido por una cepa de *Bacillus polymyxa*. Si bien no es utilizado en clínica como los anteriores, tiene acción sobre bacterias Gram negativo debido a que se une a los fosfolípidos de las membranas de las células bacterianas. Esta unión aumenta la permeabilidad de la membrana lo que se traduce en la muerte celular bacteriana. La PMB tiene una potente acción anti-endotoxina, que mediante su unión al lípido aniónico A, inhibe la mayoría de sus funciones. La PMB es un antimicrobiano utilizado ampliamente en estudios in vitro (Hong et al. 2004).

#### 1.5. Planteamiento del problema

Todos los agentes antimicrobianos frecuentemente utilizados en tratamientos endodónticos podrían tener distintos efectos en las diferentes cepas de *P. endodontalis*, dependiendo de ciertos factores. Uno de estos factores sería el mecanismo de acción de dichos agentes sobre las bacterias. En el caso de los antimicrobianos que actúan a nivel de LPS, éstos también podrían tener

diversos efectos en los aislados clínicos de *P. endodontalis* debido a la variabilidad en la estructura y composición del LPS. Estos efectos pueden ser medidos a través de diferentes pruebas microbiológicas. Estas diferencias en el LPS podrían asociarse también a diferencias de patogenicidad y diferencias en la expresión clínica de las patologías periapicales.

Actualmente no existen estudios que relacionen directamente estas dos variables, perfiles de LPS de *P. endodontalis* con susceptibilidad a antimicrobianos. A través de este estudio evaluaremos una posible relación entre las características mencionadas, utilizando perfiles de LPS previamente caracterizados (Herrera 2015).

## 2. HIPÓTESIS

Diferentes perfiles de lipopolisacárido de aislados clínicos de *Porphyromonas endodontalis* se relacionan con diferencias en la susceptibilidad frente a distintos agentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la periodontitis apical asintomática.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

Analizar la susceptibilidad de aislados clínicos de *Porphyromonas endodontalis*, que presentan diferentes perfiles de lipopolisacárido, a diferentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la periodontitis apical asintomática.

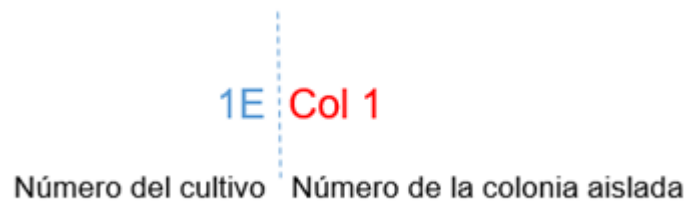
### 3.2. Objetivos Específicos

- Comparar la susceptibilidad de distintos aislados clínicos de *P. endodontalis* a diferentes antimicrobianos.
- Asociar las respuestas a antimicrobianos de aislados clínicos de *P. endodontalis* con sus diferentes perfiles de LPS.

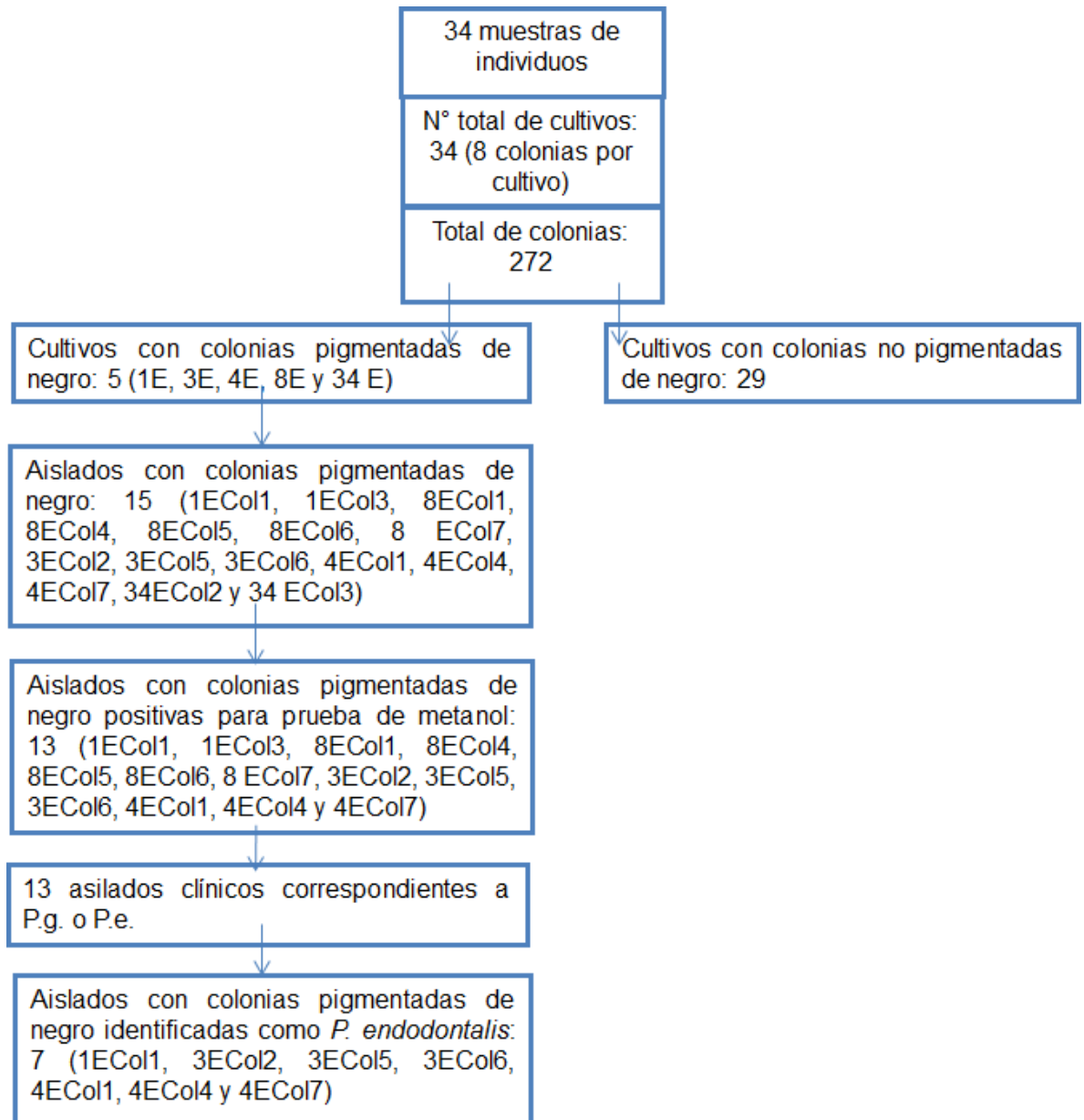
## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Aislados clínicos de *P. endodontalis* y perfiles de LPS

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación se identificaron aislados clínicos de *P. endodontalis* provenientes de exudados periapicales de una muestra total de 34 pacientes con diagnóstico clínico de PAA, mediante identificación por PCR. Éstos se rotularon como: 1ECol1, 3ECol2, 3ECol5, 3ECol6, 4ECol1, 4ECol4 y 4ECol7 (Fig. 5 y 6) (Herrera 2015).



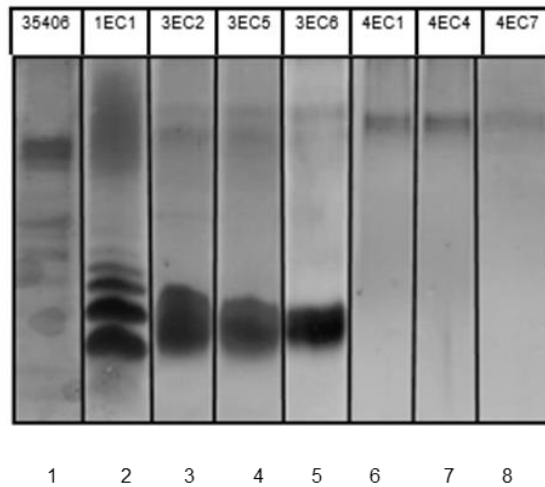
**Figura 5.** Nomenclatura utilizada para la nominación de los aislados clínicos.



**Figura 6.** Resumen de aislados identificados como *P. endodontalis* a través de PCR.

Se caracterizó el perfil electroforético del LPS de los siete aislados clínicos y de la cepa de referencia ATCC™ 35406®, de *P. endodontalis* según se describió en el estudio mencionado anteriormente (Herrera 2015; Fig. 7)





**Figura 7.** Perfil electroforético del LPS de los diferentes aislados clínicos de *P. endodontalis*. Gel Tricina-SDS-poliacrilamida. En la figura se muestran los carriles 1: ATCC™ 35406®, 2: 1ECol1, 3: 3ECol2, 4: 3ECol5, 5: 3ECol6, 6: 4ECol1, 7: 4ECol4 y 8:4ECol7.

#### 4.2. Pruebas microbiológicas para determinar susceptibilidad a antimicrobianos

Se realizaron dos tipos de pruebas microbiológicas para observar la susceptibilidad de las bacterias a los diferentes antimicrobianos:

##### 4.2.1. Antibiograma

Un antibiograma se utiliza para medir la sensibilidad de una colonia bacteriana ante un determinado antimicrobiano (Sena et al. 2006). En este estudio se expusieron los siete aislados clínicos de *P. endodontalis* y la cepa ATCC™ 35406® ante cuatro distintos agentes antimicrobianos frecuentemente utilizados en el tratamiento de infecciones endodónticas. Éstos fueron probados en seis diferentes concentraciones cada uno (Tabla n°1). Los antimicrobianos utilizados fueron: clorhexidina, hipoclorito de sodio, polimixina B y amoxicilina.

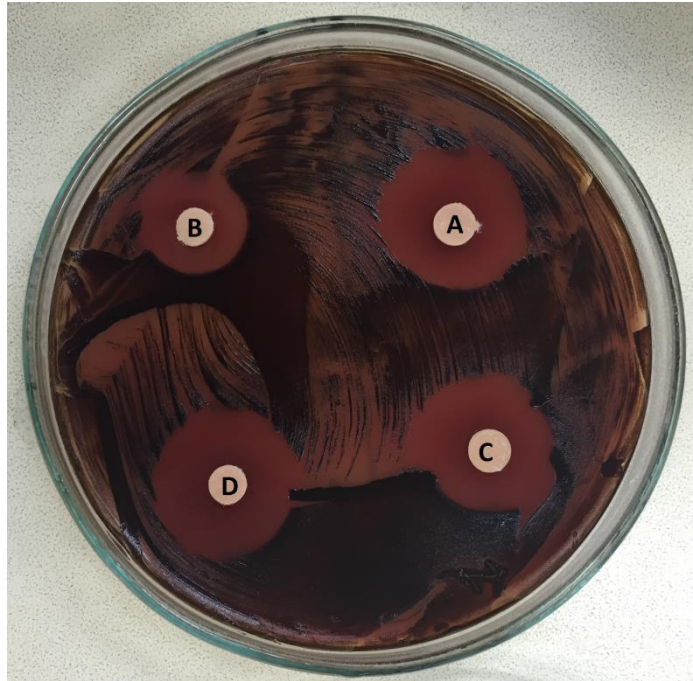
**Tabla 1.** Concentraciones estudiadas de los diferentes antimicrobianos en ensayos de difusión.

Concentraciones	1	2	3	4	5	6
Antimicrobianos						
Clorhexidina	2%	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,06%
Hipoclorito de Sodio	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,312%	0,15%
Polimixina B	2000µg/ml	1000µg/ml	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
Amoxicilina	2000µg/ml	1000µg/ml	500µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml

Las diferentes concentraciones se obtuvieron a través de dilución seriada.

Se confeccionaron discos de papel (sensidiscos) con papel filtro especial para antibiogramas, de un grosor de 1 mm y un diámetro de 6 mm. Éstos se empaparon con las diferentes concentraciones de antimicrobianos en placas de vidrio separadas, y se dejaron secar por 24 h en estufa a 37°C.

A partir de cada caldo inoculado con los diferentes aislados de *P. endodontalis* (Herrera 2015), se tomaron 200 µl con una micropipeta y punta desechable estéril, y se llevaron a una nueva placa de cultivo Petri con agar sangre hemina-menadiona. Se realizó una siembra en césped. Cada placa se rotuló con el nombre del aislado o cepa bacteriana a utilizar y el antimicrobiano a probar. Se ubicaron 4 sensidiscos en cada placa, con las diferentes concentraciones de antimicrobianos (Fig. 8).



**Figura 8.** Ensayo de difusión en placa de agar-sangre hemina-menadiona. La figura muestra un ensayo representativo mostrando el efecto de clorhexidina a diferentes concentraciones sobre el aislado 4ecol7. **A.** Clorhexidina al 2%. **B.** Clorhexidina al 1%. **C.** Clorhexidina al 0.5%. **D.** Clorhexidina al 0.25%.

Se llevaron las placas a jarras de anaerobiosis y se dejaron incubar en una estufa a 37°C por 5 días. Se dejaron por 6 o 7 días en los casos en que se observaba un débil crecimiento bacteriano a los 5 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Una vez generado, se midió el tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los sensidiscos (Sena et al. 2006).

#### 4.2.2. Ensayos de microdilución

Este ensayo, también llamado ensayo en placa de 96 o placas de microdilución, consiste en realizar la mezcla de una cantidad específica de

caldo BHI previamente inoculado con bacterias y el antimicrobiano a probar, para luego medir la densidad óptica de las muestras (Castro-Zavala et al. 2015). Se midió la densidad óptica (DO) de los caldos BHI, inoculados 48 h antes del ensayo con los distintos aislados clínicos y cepa de referencia de *P. endodontalis*. Se fijó como cero la DO del caldo sin bacterias y se establecieron como límites 0,125 y 2 nm de DO, es decir las muestras con valores entre estos límites fueron utilizadas para realizar los ensayos de microdilución. Se tomaron 135  $\mu$ l de cada caldo BHI con los diferentes aislados clínicos de *P. endodontalis* y se depositaron en los distintos pocillos de la placa de 96 y se mezclaron con 15  $\mu$ l de las soluciones antimicrobianas, obteniéndose las siguientes 6 concentraciones finales:

**Tabla 2** Concentraciones utilizadas para el estudio de los diferentes antimicrobianos en ensayos de microdilución.

Concentraciones Antimicrobianos	1	2	3	4	5	6
Clorhexidina	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%	0,0125%	0,006%
Hipoclorito de Sodio	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,0312%	0,015%
Polimixina B	200 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml	25 $\mu$ g/ml	12,5 $\mu$ g/ml	6,25 $\mu$ g/ml
Amoxicilina	200 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml	25 $\mu$ g/ml	12,5 $\mu$ g/ml	6,25 $\mu$ g/ml

Luego de 48 h se midieron los resultados a través de espectrofotometría, a una longitud de onda de 600 nm ( $DO_{600}$  nm) y se compararon estos valores con los obtenidos de caldo con bacterias sin antimicrobiano (controles positivos), y con los de caldo sin bacterias (controles negativos) para evaluar el crecimiento bacteriano. Los ensayos de microdilución se realizaron por duplicado.

#### 4.3. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa Graph Pad Prism 6 (©2016 GraphPad Software, Inc. La Jolla, California, Estados Unidos) para determinar diferencias entre la susceptibilidad de las distintas cepas bacterianas frente a cada antimicrobiano. Se utilizó el test Anova y posteriormente un test Tukey para comparar los grupos entre sí. Se consideró significancia estadística si  $p < 0.05$ . Posterior a esto se asociaron las respuestas a antimicrobianos de aislados clínicos de *P. endodontalis* con sus diferentes perfiles de LPS.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Susceptibilidad de los aislados clínicos frente a antimicrobianos

#### 5.1.1. Ensayos de microdilución

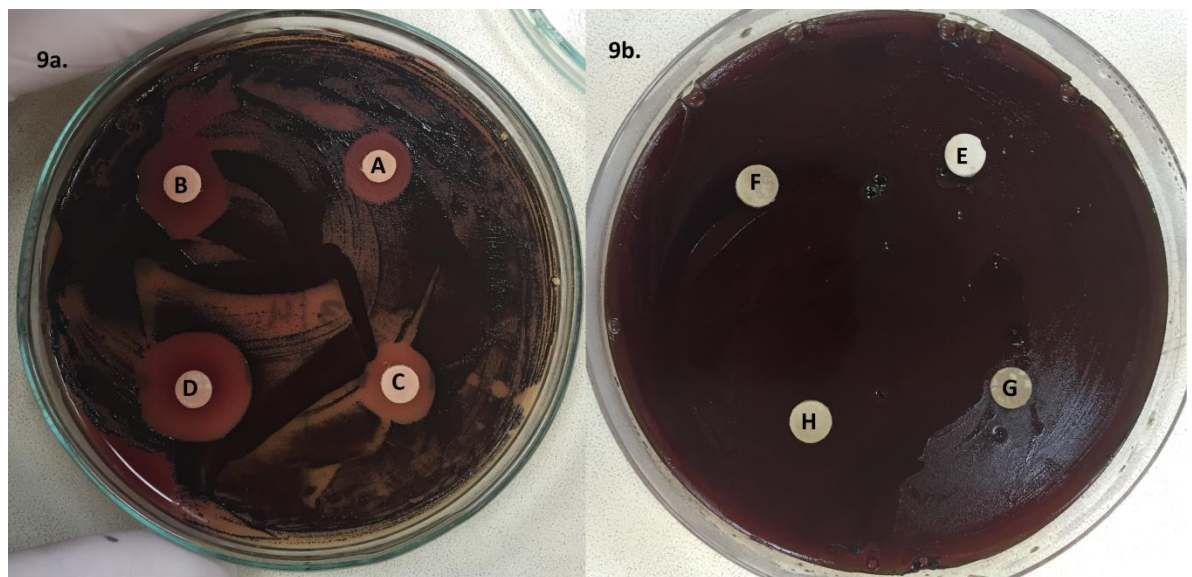
Se tomaron muestras de los siete diferentes aislados clínicos y la cepa de referencia de *P. endodontalis* descritos anteriormente. Éstos se llevaron a caldo BHI suplementado con hemina y menadiona para cultivo en suspensión. Se dejaron crecer por 48 h y luego de esto se determinó de acuerdo al crecimiento bacteriano, que caldos tenían suficiente proliferación bacteriana para ser utilizados en los ensayos (de acuerdo a la descripción del punto 4.2.2).

Se realizaron ensayos de microdilución con polimixina B, clorhexidina, hipoclorito de sodio y amoxicilina en las seis distintas concentraciones mencionadas en el punto 4.2.2, y se obtuvieron los resultados midiendo la densidad óptica a través de espectrofotometría, para comparar ésta con la densidad óptica inicial y así determinar el crecimiento bacteriano. Al mezclar el volumen determinado de caldo BHI con bacterias y la clorhexidina, ocurrió una reacción de precipitación en los pocillos correspondientes a las seis concentraciones distintas de este antimicrobiano, la mezcla se enturbió inmediatamente y con ello aumento la densidad óptica de la muestra. Esto claramente no denotaba un crecimiento bacteriano, sino una reacción en la que probablemente ocurrió una lisis de estructuras bacterianas. Por esta razón, se decidió desechar este tipo de ensayos y sólo utilizar antibiogramas para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos debido a que los resultados no reflejaron el crecimiento bacteriano real.

#### 5.1.2. Ensayos de difusión

Se realizaron antibiogramas con los 4 antimicrobianos ya mencionados, en las 6 concentraciones detalladas en el punto 4.2.1, para la cepa de referencia de *P. endodontalis*: ATCC™ 35406®, y los aislados clínicos 1ecol1, 3ecol2, 3ecol5, 4ecol1, 4ecol4 y 4ecol7. Cada ensayo fue hecho por triplicado (Herrera 2015).

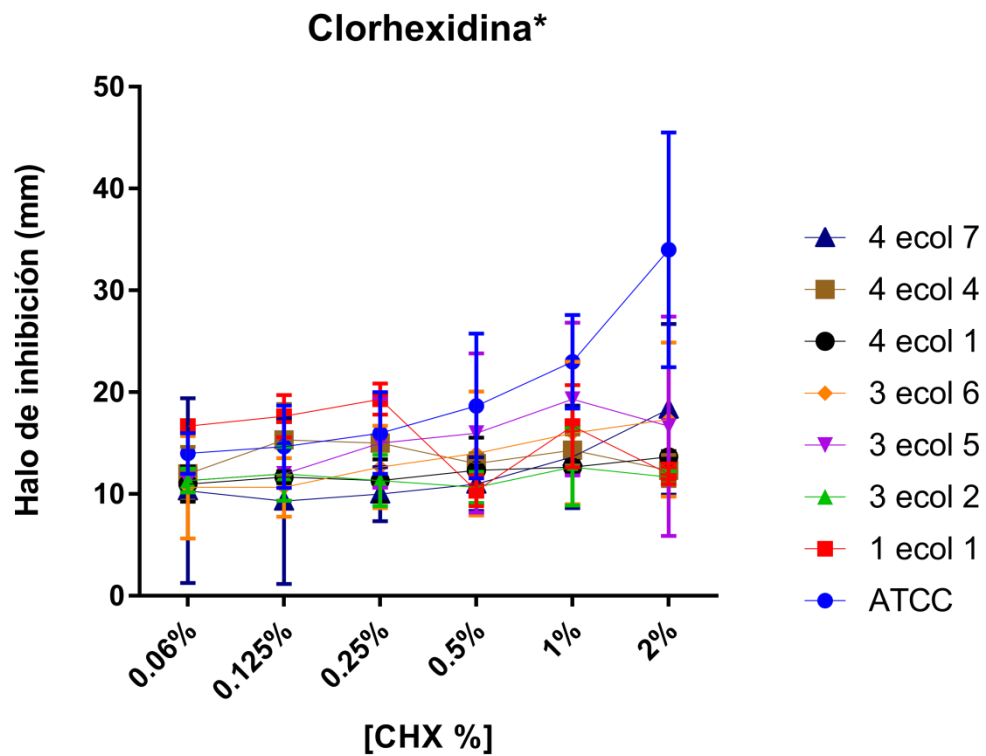
Los resultados se cuantificaron midiendo el halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de cada sensidisco. Éstos fueron medidos en milímetros (mm), en el caso de existir (Fig. 9a). Los casos en que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano, se registraron como cero (Fig. 9b).



**Figura 9a.** Ensayo de difusión en placa de agar-sangre hemina-menadiona. La figura muestra halos de inhibición alrededor de sensidiscos con PMB en distintas concentraciones, sobre aislado de *P. endodontalis* 3ecol2: **A.** PMB 2.000 ug/ml, **B.** PMB 1.000 ug/ml, **C.** PMB 500 ug/ml, **D.** PMB 250 ug/ml. **Figura 9b.** Ensayo de difusión en placa de agar-sangre hemina-menadiona. La figura muestra ausencia de halos de inhibición alrededor de sensidiscos con hipoclorito de sodio (NaOCl) en distintas concentraciones, sobre aislado de *P. endodontalis* 3ecol5: **E.** NaOCl 5% **F.** 2.5% **G.** 1.25% **H.** 0.625%.

l) Clorhexidina

En relación con la clorhexidina hubo diferencias estadísticamente significativas entre ATCC™ 35406® y el resto de los aislados (1ecol1, 3ecol2, 3ecol5, 3ecol6, 4ecol1, 4ecol4, 4ecol7) sólo a la concentración más alta (2%). La cepa ATCC™ 35406® fue más sensible que los aislados clínicos a esta concentración. No hubo diferencias entre los aislados con distintos perfiles de LPS ( $p < 0.05$ ; Fig. 10).



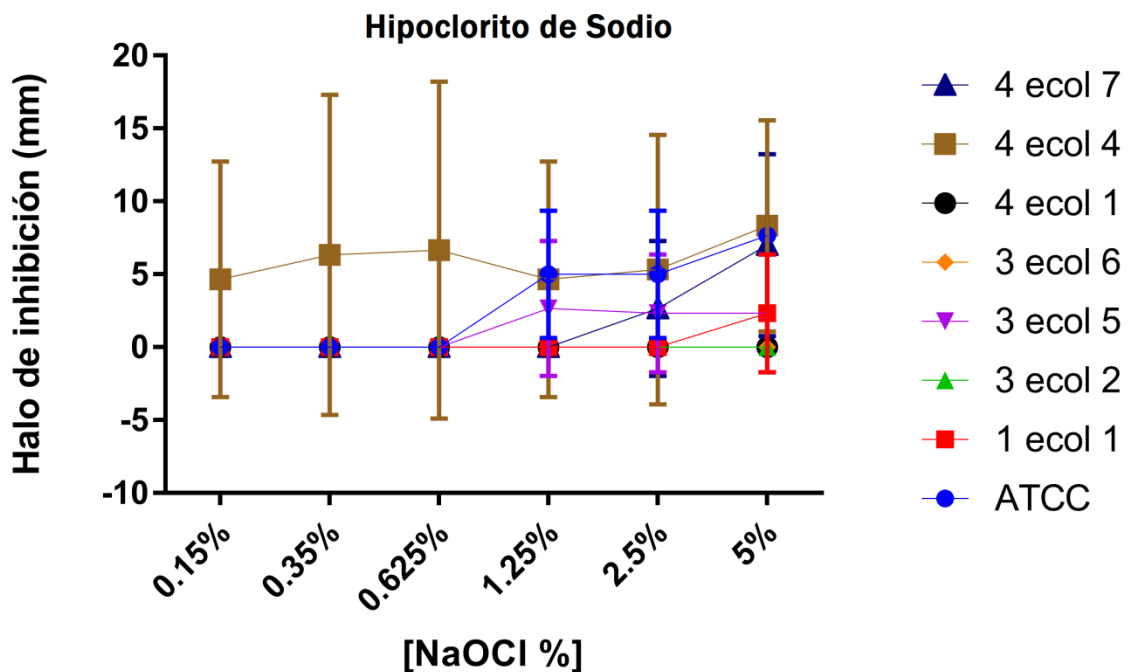
**Figura 10.** Susceptibilidad a clorhexidina de aislados clínicos de *P. endodontalis* y cepa de referencia ATCC™ 35406®. En eje vertical se encuentran halos de inhibición (mm), en eje horizontal seis concentraciones diferentes de clorhexidina



[%]. \*  $p < 0.05$  (ANOVA). 2%, ATCC vs. 1 ecol 1, ATCC vs. 3 ecol 2, ATCC vs. 3 ecol 5, ATCC vs. 3 ecol 6, ATCC vs. 4 ecol 1, ATCC vs. 4 ecol 4, ATCC vs. 4 ecol 7  $p < 0,05$  (T. Tuckey).

## II) Hipoclorito de Sodio

Para el hipoclorito de sodio no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos aislados clínicos de *P. endodontalis*, es decir no reaccionaron de manera significativamente diferente entre sí, ante este antimicrobiano a ninguna de las concentraciones utilizadas (Fig. 11).

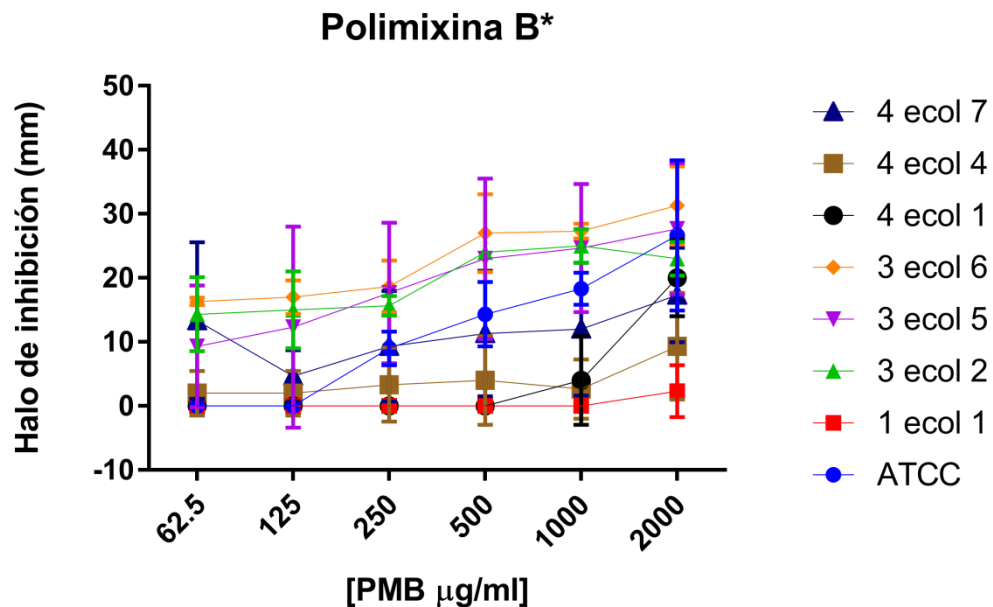


**Figura 11.** Susceptibilidad a hipoclorito de sodio de aislados clínicos de *P. endodontalis* y cepa de referencia ATCC™ 35406®. En eje vertical se encuentran halos de inhibición (mm), en eje horizontal seis concentraciones diferentes de NaOCl [%]. Se utilizó el test Anova y un post test Tukey para comparar los grupos

entre sí. Los resultados con diferencias de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativas.

### III) Polimixina B

Para la PMB se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los distintos aislados clínicos y la cepa ATCC™ 35406® para las 6 concentraciones (Fig. 12).



**Figura 12.** Susceptibilidad a PMB de aislados clínicos de *P. endodontalis* y cepa de referencia ATCC™ 35406®. En eje vertical se encuentran halos de inhibición (mm), en eje horizontal seis concentraciones diferentes de PMB [µg/ml]. \*  $p < 0.05$  (ANOVA). 62,5 µg/ml: ATCC vs. 3 ecol 6, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 6, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 1; a 125 µg/ml: ATCC vs. 3 ecol 6, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 6, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 1; a 250 µg/ml: 1 ecol 1 vs. 3 ecol 5, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 6, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 1; a 500 µg/ml: 1 ecol 1 vs. 3 ecol 2, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 5, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 6, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 4, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 5 vs. 4

ecol 4, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 4; a 1000 µg/ml: ATCC vs. 1 ecol 1, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 2, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 5, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 6, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 4, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 4, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 4; a 2000 µg/ml: ATCC vs. 1 ecol 1, ATCC vs. 4 ecol 4, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 2, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 5, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 6, 1 ecol 1 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 4, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 4 (T. Tuckey).

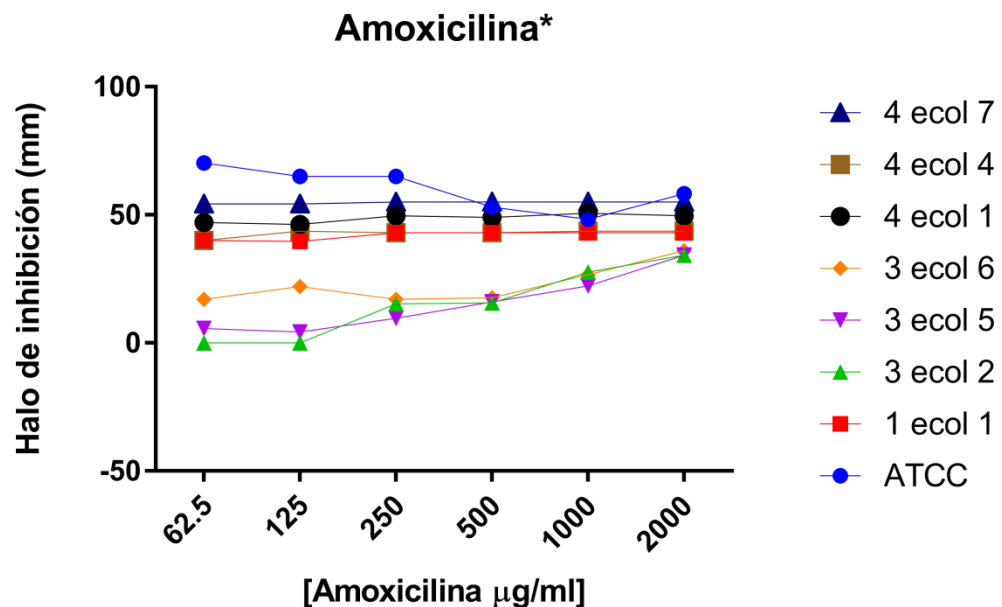
- A una concentración de 62.5 µg/ml, 3ecol6 tuvo halos de inhibición significativamente mayores que la cepa ATCC™ 35406® y los aislados 1ecol1 y 4ecol1. Esto indica que el aislado 3ecol6, el cual no posee AgO de alto peso molecular, es más sensible a este antimicrobiano.
- A una concentración de 125 µg/ml se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el aislado 3ecol6 y las cepas ATCC™ 35406®, 1ecol1 y 4ecol1. La mayor inhibición del crecimiento se observó sobre el aislado 3ecol6.
- A 250 µg/ml las diferencias significativas se dieron al comparar 1ecol1 con los aislados 3ecol5 y 3ecol6, y 4ecol1 con los aislados 3ecol5 y 3ecol6. En estos casos, 1ecol1 y 4ecol1 tuvieron menores halos de inhibición que el resto de las cepas mencionadas.
- A 500 µg/ml hubo grandes y significativas diferencias entre 1ecol1 con 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6. 1ecol1 presentó un halo de inhibición del tamaño del sensidisco (6 mm) registrado como cero, es decir menor a los demás aislados. Además, 3ecol2 tuvo un halo significativamente mayor que 4ecol1 y 4ecol4. También entre 3ecol5 con 4ecol1 y 4ecol4 ocurrió lo mismo, el halo de inhibición de 3ecol5 fue significativamente mayor al de los otros dos aislados. Y finalmente, entre 3ecol6 con 4ecol1 y 4ecol4, teniendo 3ecol6 un halo mayor.
- A una concentración de 1000 µg/ml las diferencias significativas se dieron entre la cepa ATCC™ 35406® con el aislado 1ecol1, teniendo este último un menor halo de inhibición; 1ecol1 con 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6, siendo nuevamente 1ecol1 el aislado con menor halo de

inhibición; 3ecol2, con 4ecol1 y 4ecol4, teniendo estos dos últimos resultados menos que 3ecol2; y 3ecol5 y 3ecol6 tuvieron mayores halos de inhibición que 4ecol1 y 4ecol4.

- A 2000  $\mu\text{g/ml}$  de concentración se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar ATCC™ 35406® con 1 ecol1 y 4ecol4; 1ecol1 con 3ecol2 3ecol5 3ecol6 y 4ecol1; 3ecol5 con 4ecol4 y 3ecol6 con 4ecol4.

#### IV) Amoxicilina

En el caso de la amoxicilina también se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los halos de inhibición del crecimiento de los distintos aislados clínicos en la mayoría de las concentraciones (Fig. 13).



**Figura 13.** Susceptibilidad a amoxicilina de aislados clínicos de *P. endodontalis* y cepa de referencia ATCC™ 35406®. En eje vertical se encuentran halos de

inhibición (mm), en eje horizontal seis concentraciones diferentes de amoxicilina [ $\mu\text{g/ml}$ ]. \*  $p < 0.05$  (ANOVA). A 62.5  $\mu\text{g/ml}$ : ATCC vs. 3 ecol 2, ATCC vs. 3 ecol 5, ATCC vs. 3 ecol 6, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 2, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 5, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 4, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 7, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 4, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 7, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 7; a 125  $\mu\text{g/ml}$ : ATCC vs. 3 ecol 2, ATCC vs. 3 ecol 5, ATCC vs. 3 ecol 6, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 2, 1 ecol 1 vs. 3 ecol 5, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 4, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 7, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 4, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 7; a 250  $\mu\text{g/ml}$ : ATCC vs. 3 ecol 2, ATCC vs. 3 ecol 5, ATCC vs. 3 ecol 6, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 7, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 1, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 7, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 7; a 500  $\mu\text{g/ml}$ : ATCC vs. 3 ecol 2, vs. 3 ecol 5, ATCC vs. 3 ecol 6, 3 ecol 2 vs. 4 ecol 7, 3 ecol 5 vs. 4 ecol 7, 3 ecol 6 vs. 4 ecol 7 (T. Tuckey).

- A una concentración de 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , la cepa ATCC™ 35406® fue significativamente más sensible que 3ecol2 3ecol5 3ecol6. El aislado 1ecol1 también tuvo un halo de inhibición significativamente mayor a 3ecol2 y 3ecol5. En el caso de 3ecol2, este aislado tuvo un halo de inhibición menor que 4ecol1 4ecol4 4ecol7. 3ecol5 también tuvo halos de inhibición menores que los de 4ecol1, 4ecol4 y 4ecol7.
- A 125  $\mu\text{g/ml}$  la cepa ATCC™ 35406® tuvo halos de inhibición mayores que 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6. 1ecol1 también tuvo halos de inhibición mayores que 3ecol2 y 3ecol5. Por su parte 3ecol2 tuvo halos de menor tamaño que 4ecol1, 4ecol4 y 4ecol7. Finalmente, para esta concentración 3ecol5 tuvo menor inhibición que 4ecol1, 4ecol4 y 4ecol7.
- A 250  $\mu\text{g/ml}$  la cepa ATCC™ 35406® fue significativamente más sensible que los aislados 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6. 3ecol2 y 3ecol5 presentaron menores halos de inhibición en comparación con 4ecol1 y 4ecol7. 3ecol6 fue más resistente que 4ecol7.
- A 500  $\mu\text{g/ml}$  la cepa ATCC™ 35406® tuvo una mayor inhibición del crecimiento en comparación con 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6. 3ecol2 tuvo menores halos de inhibición que 4ecol7. 3ecol5 a su vez, tuvo menores

halos que 4ecol7. Y el crecimiento de 3ecol6 fue significativamente menos inhibido que el de 4ecol7.

- A 1000 y 2000  $\mu\text{g/ml}$  no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa ATCC™ 35406® y los aislados clínicos estudiados.

## 6. DISCUSIÓN

Dentro de los factores de virulencia de *P. endodontalis* se encuentra el LPS, esta estructura ha demostrado tener una alta variabilidad entre aislados clínicos de distintos individuos (Herrera 2015). En este estudio, tras analizar la susceptibilidad a antimicrobianos de estos aislados clínicos de *P. endodontalis*, demostramos que esta variabilidad determinó, en algunos casos, una respuesta distinta ante antimicrobianos de administración tópica y sistémica empleados frecuentemente para tratar la PA, mientras que sólo algunos aislados clínicos fueron más resistentes a estos agentes.

Los aislados 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6 correspondientes a un mismo individuo, mostraron una menor susceptibilidad ante los agentes antimicrobianos clorhexidina y amoxicilina (Fig. 10 y 13). Estos aislados poseen lípido A, core y pocas moléculas de AgO de mayor peso molecular, y por tanto difieren de la estructura del LPS de la cepa ATCC™ 35406® y el aislado 1ecol1, los cuales tenían un perfil de LPS más bien completo y homogéneo. También difieren de los aislados 4ecol1, 4ecol4 y 4ecol7, los cuales tenían menor cantidad de LPS y algunas cadenas de AgO alto peso molecular. La cepa de referencia ATCC™ 35406®, fue la que mostró mayor susceptibilidad ante dos antimicrobianos, clorhexidina y amoxicilina (Fig. 10 y 13). Esta posee una estructura de LPS completa y homogénea tal como se menciona en el párrafo anterior. Sin embargo, este comportamiento no se repitió con los otros dos antimicrobianos. El aislado 1ecol1 mostró un comportamiento heterogéneo ante los cuatro antimicrobianos (Fig. 10, 11, 12 y 13), a pesar de tener cierto grado de similitud en la estructura con la cepa ATCC™ 35406®. En algunos casos fue altamente inhibido por antimicrobianos, como en el caso de la amoxicilina y la clorhexidina, y en el caso de la PMB y el hipoclorito de sodio no mostró tanta susceptibilidad. En cuanto a los aislados 4ecol1, 4ecol4 y 4ecol7 pertenecientes a un mismo individuo, éstos tuvieron un comportamiento similar ante los cuatro antimicrobianos, siendo poco inhibidos por estos (Fig. 10, 11,

12 y 13). Estas bacterias tienen poco LPS y pocas cadenas de AgO de alto peso molecular.

Al asociar los diferentes perfiles de LPS obtenidos por electroforesis, nos damos cuenta de que la cepa bacteriana ATCC™ 35406® que presentó un perfil completo y más homogéneo, fue la más susceptible a los antimicrobianos, en comparación al resto de los aislados clínicos. Esto podría indicarnos que el tener un LPS de mayor tamaño y más completo podría asociarse con bacterias menos resistentes. Sin embargo, también es posible que la cepa de referencia ATCC™ 35406® sea más susceptible a los agentes antimicrobianos por corresponder a una cepa de laboratorio, mantenida en un medio ideal, y por esto sus factores de virulencia podrían estar más atenuados que los de los aislados clínicos obtenidos de muestras de individuos.

También es posible que algunos aislados clínicos con diferentes perfiles de LPS no respondieran de manera diferencial frente a algunos antimicrobianos debido a las diferencias en sus mecanismos de acción. Tal es el caso de todos los aislados clínicos frente al hipoclorito de sodio y de ATCC™ 35406® y 4ecol7 frente a amoxicilina. Se sabe que la amoxicilina actúa a nivel de proteínas específicas de la pared bacteriana (Jayadev et al. 2014), por lo tanto diferencias en el LPS no deberían afectar necesariamente su acción sobre las bacterias. A pesar de ello, en este trabajo sí observamos que las cepas que carecen de AgO de alto peso molecular son más resistentes a amoxicilina. Desconocemos hasta ahora el mecanismo por el cual esto ocurriría.

Por otro lado, la PMB tiene acción sobre los fosfolípidos de las membranas de las células bacterianas. Se une al lípido aniónico A del LPS e inhibe la mayoría de sus funciones de esta estructura (Hong et al. 2004). En los resultados se observó una susceptibilidad similar entre las cepas con una estructura de LPS parecida. Reaccionaron de manera similar 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6, aislados que poseen lípido A, core y pocas moléculas de AgO de mayor peso molecular, y 4ecol1 con 4ecol4 que poseen poco LPS y pocas cadenas de AgO de alto peso molecular. Sin embargo, algunos aislados clínicos reaccionaron de



manera similar teniendo diferencias en sus estructuras de LPS. Frente a la PMB el aislado 1ecol1 tuvo un comportamiento similar a 4ecol1 y 4ecol4, a pesar de tener un LPS de mayor tamaño y más homogéneo. Los aislados ATCC™ 35406® y 4ecol7 también presentaron una susceptibilidad similar. Comparativamente la cepa ATCC™ 35406® presentó mayor cantidad de LPS de estructura homogénea y 4ecol7 poco LPS con pocas cadenas de AgO preferentemente de alto peso molecular (Herrera 2015).

Por el contrario, los aislados clínicos que presentaron mayores halos de inhibición del crecimiento bacteriano 3ecol2, 3ecol5 y 3ecol6, obtenidos de muestras pertenecientes a un mismo individuo, tenían un LPS similar entre sí, principalmente compuesto por lípido A y core unido a pocas moléculas de AgO de mayor peso molecular.

El mecanismo de acción del hipoclorito de sodio no es completamente conocido, se postula que podría actuar inhibiendo reacciones enzimáticas y provocando la desnaturalización de proteínas (Mohammadi 2008). En este estudio, todos los aislados clínicos tuvieron susceptibilidad similar, excepto 4ecol4 que fue levemente más inhibida por este antimicrobiano. Es posible pensar que en esta situación el LPS no jugó un rol tan importante en la susceptibilidad antimicrobiana.

Por último, la clorhexidina que posee una acción antimicrobiana de amplio espectro, ejerce su acción a nivel de la membrana externa facilitando la precipitación de las estructuras bacterianas. También se ha descrito que podría tener mayor actividad sobre bacterias Gram -positivo que bacterias Gram -negativo (Mohammadi and Abbott 2009; Mortenson et al. 2012; Russell 2002). En este estudio sólo tuvo un comportamiento significativamente diferente la cepa ATCC™ 35406®, la cual fue más inhibida que el resto de los aislados clínicos, teniendo ésta un LPS de mayor tamaño y mayor homogeneidad.

En cuanto a los diferentes antimicrobianos utilizados en este estudio, el hipoclorito de sodio fue el agente que tuvo menor efectividad frente a los distintos aislados de *P. endodontalis*. En muchos de los casos tuvo nula acción antibacteriana. Sin embargo en los ensayos realizados en este estudio con NaOCl al 5%, que corresponde a la concentración mayormente utilizada en clínica (Sena et al. 2006), se observaron efectos levemente más notorios, donde sí se provocó inhibición del crecimiento bacteriano. Por otro lado la amoxicilina, antibiótico utilizado en cuadros endodónticos agudos, fue el agente con mayor actividad antimicrobiana sobre los distintos aislados (Jayadev et al. 2014).

En los ensayos de microdilución realizados con clorhexidina en 6 distintas concentraciones, se obtuvieron resultados inesperados que llevaron a descartar su realización. Como se mencionó en el punto 5.1.1, al probar la clorhexidina con los diferentes aislados clínicos se produjo una reacción de precipitación que enturbió la mezcla y modificó los resultados. Se podría pensar que esta reacción pudo haberse dado por una alta concentración de la clorhexidina (2%), pero se observó la reacción en los pocillos correspondientes a las 6 concentraciones utilizadas: 0,2 %; 0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.0125%, 0.006%. Se decidió no modificar este parámetro ya que era importante probar un rango amplio de concentraciones que abarcasen las utilizadas en clínica, entre las cuales se encuentra 0,12%, concentración normalmente usada para realizar irrigación de los conductos radiculares. Además los ensayos más utilizados para probar susceptibilidad de microorganismos a antimicrobianos son los antibiogramas. Es por estas razones que se tomó la decisión de utilizar sólo los antibiogramas como ensayos para este estudio. Todos los ensayos de microdilución fueron descartados para no correr riesgos de obtener resultados alterados y poco verídicos.

Es importante mencionar que los diferentes antimicrobianos utilizados en este estudio son usados de formas muy distintas en su aplicación clínica. Tanto la clorhexidina como el hipoclorito de sodio son utilizados de manera tópica, al

servir como irrigantes del SCR durante el tratamiento endodóntico. La amoxicilina es utilizada de manera sistémica en casos específicos de cuadros agudos. Si bien es cierto en este estudio los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio ante *P. endodontalis* no es muy marcada, cabe mencionar que esta sustancia es utilizada con éxito en los tratamientos endodónticos actuales no solo por su capacidad antimicrobiana si no porque actúa eficazmente disolviendo tejidos orgánicos y como lubricante (Sena et al. 2006).

En la actualidad no existen estudios que relacionen las diferencias estructurales del LPS de *P. endodontalis* y su susceptibilidad a antimicrobianos. En este contexto, este trabajo es un aporte en esta área, sin embargo sabemos que es un primer paso y que es importante seguir realizando estudios de este tipo con un mayor número de muestras y tal vez involucrando a una mayor diversidad de patógenos. Así podremos conocer la microbiota involucrada en el desarrollo de patologías periapicales, los mecanismos implicados en estas patologías, y optimizar los tratamientos de los diversos cuadros clínicos.

## 7. CONCLUSIONES

A partir del siguiente trabajo de investigación se puede concluir:

1. Las distintas cepas bacterianas estudiadas presentaron diferentes respuestas ante la acción de antimicrobianos comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones endodónticas.
2. Las diferentes respuestas frente a antimicrobianos se dieron principalmente entre aislados clínicos de *P. endodontalis* provenientes de muestras de distintos individuos.
3. Las bacterias con diferencias en su perfil de LPS presentaron distintas respuestas ante antimicrobianos.
4. De todos los antimicrobianos utilizados, el hipoclorito de sodio fue el que tuvo menor acción antimicrobiana frente a las bacterias estudiadas, es decir, causó poca o nula inhibición del crecimiento bacteriano.
5. Por el contrario, la amoxicilina fue el antimicrobiano con mayor actividad bacteriostática y/o bactericida.

Por lo tanto, es posible concluir que se corrobora la hipótesis planteada, donde distintos aislados clínicos de *P. endodontalis* con diferentes perfiles de LPS, presentaron respuestas diferentes ante los agentes antimicrobianos estudiados. La variabilidad de LPS de *P. endodontalis* podría ser un factor determinante en la respuesta clínica frente al tratamiento endodóntico en periodontitis apical.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. AAE. 2009. Consensus conference recommended diagnostic terminology. J Endod 35(12): 1634.
2. AAE. 2012. Glossary of endodontic terms. 8th ed. American Association of Endodontists Website <http://www.aae.org/glossary/>.
3. Asgary S, Fazlyab M. 2015. A successful endodontic outcome with non-obtured canals. Iran Endod J. 10(3):208-210.
4. Bogen G, Slots J. 1999. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. Int Endod J. 32(3):204-210.
5. Castro-Zavala A, Juarez-Flores BI, Pinos-Rodriguez JM, Delgado-Portales RE, Aguirre-Rivera JR, Alcocer-Gouyonnet F. 2015. Prebiotic effects of agave salmiana fructans in *lactobacillus acidophilus* and *bifidobacterium lactis* cultures. Nat Prod Commun. 10(11):1985-1988.
6. Delivanis PD, Fan VS. 1984. The localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled and overinstrumented canals. J Endod. 10(11):521-524.
7. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *porphyromonas endodontalis*, *prevotella intermedia* and *prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by pcr. Oral Microbiol Immunol. 20(4):211-215.
8. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. 2012. Pathogenesis of apical periodontitis: A literature review. J Oral Maxillofac Res. 2(4):e1.
9. Hanazawa S, Sagiya T, Kitami H, Ohta K, Nishikawa H, Kitano S. 1991. Monoclonal antibody against *porphyromonas* (bacteroides) *endodontalis* lipopolysaccharide and application of the antibody for direct identification of the species. J Clin Microbiol. 29(11):2550-2553.
10. Herrera S. 2015. Variabilidad del Ips de *porphyromonas gingivalis* y *porphyromonas endodontalis* en dientes con periodontitis apical

asintomática. Trabajo de Investigación. Requisito para optar al título de Cirujano Dentista de la Universidad de Chile.

11. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. 2004. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 33(3):162-169.
12. Jayadev M, Karunakar P, Vishwanath B, Chinmayi SS, Siddhartha P, Chaitanya B. 2014. Knowledge and pattern of antibiotic and non narcotic analgesic prescription for pulpal and periapical pathologies- a survey among dentists. *J Clin Diagn Res.* 8(7):ZC10-14.
13. Li H, Liao T, Debowski AW, Tang H, Nilsson HO, Stubbs KA, Marshall BJ, Benghezal M. 2016. Lipopolysaccharide structure and biosynthesis in helicobacter pylori. *Helicobacter.*
14. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. 2003. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: An immunohistochemical study. *Int Endod J.* 36(7):464-471.
15. Mirucki CS, Abedi M, Jiang J, Zhu Q, Wang YH, Safavi KE, Clark RB, Nichols FC. 2014. Biologic activity of *porphyromonas endodontalis* complex lipids. *J Endod.* 40(9):1342-1348.
16. Mohammadi Z. 2008. Sodium hypochlorite in endodontics: An update review. *Int Dent J.* 58(6):329-341.
17. Mohammadi Z, Abbott PV. 2009. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 42(4):288-302.
18. Mortenson D, Sadilek M, Flake NM, Paranjpe A, Helling I, Johnson JD, Cohenca N. 2012. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. *Int Endod J.* 45(9):878-882.
19. Nair PN. 1997. Apical periodontitis: A dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000.* 13:121-148.
20. Nair PN. 2004. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15(6):348-381.

21. Raetz CR, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 71:635-700.
22. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. 2008. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol.* 46(11):3599-3606.
23. Russell AD. 2002. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: An increasingly important area of investigation. *J Antimicrob Chemother.* 49(4):597-599.
24. Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Benno Y. 2007. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 22(1):19-23.
25. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. 2006. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 39(11):878-885.
26. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. 2005. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 31(7):488-498.
27. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Silva MG. 2008. Prevalence and clonal analysis of *porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections. *J Endod.* 34(11):1332-1336.
28. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. 1998. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9(4):498-521.
29. Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. 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.
30. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, 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.

31. Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. 2012. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* 38(7):954-959.
32. Zerr MA, Cox CD, Johnson WT, Drake DR. 1998. Effect of red blood cells on the growth of *porphyromonas endodontalis* and microbial community development. *Oral Microbiol Immunol.* 13(2):106-112.



## 9. ANEXOS

9.1. Clasificación de las Patologías Pulpares y Periapicales:

10. 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.

---

## 9.1. Ficha Clínica

Nombre	_____	Fecha	_____	Nº de identificación	_____
Género	Femenino	<input type="checkbox"/>	Masculino	<input type="checkbox"/>	
Edad	<input type="text"/>				
Nivel educacional	Básica	<input type="checkbox"/>	Básica	<input type="checkbox"/>	Media
	Incompleta	<input type="checkbox"/>	Completa	<input type="checkbox"/>	Superior
	(-8º)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enfermedades sistémicas	Actual	<input type="checkbox"/>	Pasada	<input type="checkbox"/>	Especificar _____
Tratamiento médico en últimos 6 meses	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Periodontitis	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	Gingivitis
					Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Fumador	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Colesterol no HDL (mg/dL)	<input type="text"/>				
Colesterol HDL (mg/dL)	<input type="text"/>				
Presión Arterial (mm/Hg)	<input type="text"/>				
Obesidad (IMC) (kg/m <sup>2</sup> )	<input type="text"/>				
Hiperglicemia (glucohemoglobina %)	<input type="text"/>				
Nº de dientes con PAA	<input type="text"/>		Nº de dientes con caries dentinaria	<input type="text"/>	
Total de dientes	<input type="text"/>	Tamaño radiográfico de la lesión (mm)	Vert.	<input type="text"/>	Horiz. <input type="text"/>
Vitalometría	Positivo	<input type="checkbox"/>	Negativo	<input type="checkbox"/>	Percusión
					Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Control después de tratamiento (1 semana)				Fecha	<input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Rx control obturación	Adecuado	<input type="checkbox"/>	Inadecuado	<input type="checkbox"/>	
Control después de tratamiento (1 mes)				Fecha	<input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Control después de tratamiento (3 meses)				Fecha	<input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Tamaño de la lesión (mm)	Vertical	<input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>	
Control después de tratamiento (6 meses)				Fecha	<input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Tamaño de la lesión (mm)	Vertical	<input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>	
Control después de tratamiento (12 meses)				Fecha	<input type="text"/>
Asintomático	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Tamaño de la lesión (mm)	Vertical	<input type="text"/>	Horizontal	<input type="text"/>	

## 9.2. 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 después 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.

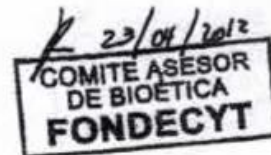
En los pacientes que presentan indicación de extracción dentaria, las lesiones asociadas serán extirpadas y analizadas. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos ni costos adicionales para el paciente y una vez analizadas serán descartadas.

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 solicitándola al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, sólo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

**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: mherandezrios@gmail.com



Bd. 30/07/2011

**FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES ADULTOS**

Investigador responsable: Dra. Marcela Hernández Ríos; Marcela Hernández Ríos;  
Depto. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Fonc: 9781806;  
email: [mhemandezrios@gmail.com](mailto:mhemandezrios@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





## 9.3. Informe de aprobación del comité de ética y Bioseguridad



Comisión Nacional de Investigación  
Científica y Tecnológica - CONICYT

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

<b>Nº Proyecto</b>	1120138
<b>Investigador/a Responsable</b>	EMMA MARCELA HERNANDEZ RIOS
<b>Título</b>	CROSSTALK BETWEEN LOCAL HOST RESPONSE TO ENDODONTIC INFECTION AND LOW-GRADE SYSTEMIC INFLAMMATION IN ASYMPTOMATIC APICAL PERIODONTITIS: PROSPECTIVE STUDY EVALUATING THE EFFECT OF CONSERVATIVE ENDODONTIC 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:**

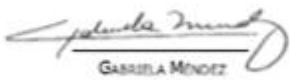
Adjunta acta de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, con fundamentación.


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:**

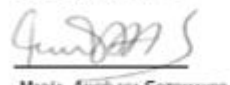
- Sin observaciones.

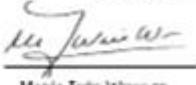
Este informe ha sido preparado por los miembros del Comité Asesor de Bioética de FONDECYT.


  
 GABRIELA MÉNDEZ


  
 RAFAEL TELLEZ

  
 MANUEL SARRÍOS

  
 MARÍA ANGÉLICA SOTOMAYOR

  
 MARÍA INÉS WINKLER

  
 RODRIGO SALINAS

  
 RAÚL VILLARREAL

**COMITÉ ASESOR  
DE BIOÉTICA  
FONDECYT**