

MARC
624/15

P3370
2012



**Universidad
de Valparaíso**
CHILE
Escuela de Odontología

**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS Y
ESPECIES DE PREVOTELLA EN SACOS PERICORONARIOS INFLAMADOS
EN PACIENTES DEL SERVICIO DE CIRUGÍA Y TRAUMATOLOGÍA
MAXILOFACIAL DEL HOSPITAL CARLOS VAN BURÉN DE VALPARAÍSO**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Franco Paveri Salomon

Docente Guía: Prof. Dra. Gianina Caneppe Martin
Cátedra de Periodoncia

Valparaíso - Chile
2012

*Esta tesis la dedico a mis Padres,
quienes me apoyaron en todo
mi proceso formativo debiendo
gran parte de mi conocimiento a ellos.*

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mis padres, Dr. Franco Paveri D. y Dra. M. Cristina Salomón H., por haberme apoyado en toda mi etapa formativa de pregrado, durante estos 6 años, en los momentos difíciles y de felicidad. Su apoyo incondicional y motivación fueron de gran ayuda para superar los obstáculos encontrados en este camino.

En segundo lugar quisiera agradecer a mi docente guía, Dra Gianina Caneppea Matin, jefe de cátedra de Periodoncia de la Universidad de Valparaíso, Chile, quien nunca dudó de mis capacidades y me motivó para que lograra lo que para algunos parecía algo, no posible, cito a una de sus citas favoritas: "Prefiero los errores del entusiasmo a la indiferencia de la sabiduría" (Anatole France). Además inculcó en mí el pensamiento crítico, y la pasión por el conocimiento, mostrándome un área fascinante de la odontología: Periodoncia.

Quisiera también dar mis sinceros agradecimientos al laboratorio de microbiología bucal, de la facultad de Odontología de la Universidad de Chile, quienes se mostraron abiertos de ayudarme en lo que necesitara para el desarrollo de esta Tesis y de enseñarme lo que fuera necesario. En especial al Dr. Rolando Vernal A., profesor asistente de la cátedra de Odontología Conservadora de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por su valiosa colaboración en las fases de laboratorio y a la técnica de laboratorio, Camila Rojas F.

Además agradecer al Dr. Oscar Badillo, Cirujano maxilofacial del Hospital Carlos van Buren de Valparaíso, jefe del servicio de cirugía y traumatología maxilofacial, por permitirme obtener muestras de sacos pericoronarios de pacientes atendidos en su servicio y a todo el personal auxiliar quien se mostró muy abierto a ayudarme en la fase de recolección de muestras.

Finalmente agradecer a todos los que con su grano de arena me ayudaron en el desarrollo de esta tesis: mi tía Orietta Paveri D., mi hermana Romina Paveri S. y mi abuelita Olga Hurtado P. a quien le contaba lo difícil que me resultó poder realizarla, quien a sus 97 años, el día 11 de septiembre de 2012 falleció, producto de una falla multi sistémica.

A todos estos mis más sinceros agradecimiento.

Franco Paveri S.

Octubre de 2012

INDICE

I.-Introducción.....	1
II.-Marco teórico.....	3
Sacos pericoronarios.....	3
Biofilm.....	4
Bacterias periodontopatogénicas.....	8
III.-Materiales y métodos.....	15
IV.-Resultados.....	27
Pacientes.....	27
Cultivo inespecífico.....	28
Cultivo selectivo.....	33
Identificación fenotípica.....	36
Análisis estadístico comparativo.....	37
V.-Discusión.....	39
Estudio.....	39
Métodos de estudio de especies estudiadas.....	39
Edad de los pacientes.....	40
Consideraciones anatómicas.....	41
Especies periodontopatogénicas.....	41
Consideraciones del crecimiento en biofilm.....	44
Aplicación clínica.....	45
<i>Prevotella especies</i>	45
VI.- Conclusiones.....	47

Limitaciones.....	48
Propuesta.....	48
VII.- Bibliografía.....	49
VIII.- Anexos.....

Introducción

Gran parte del trabajo de los Odontólogos se realiza sobre pacientes que han sido afectados por alguna patología oral de origen bacteriano. Así, las patologías más frecuentes tratadas con medidas tanto preventivas como paliativas se deben a una etiología bacteriana.

Día a día convivimos con microorganismos en una homeostasis que, en caso de romperse, puede generar consecuencias desfavorables tanto para el hospedero como para su flora comensal. La cavidad oral no es la excepción, hasta hoy se han aislado cientos de diferentes especies, con muy diversas características. La boca, entonces, constituye un lugar de colonización bacteriana constante, que dependiendo de las condiciones locales y propias de las especies generan diferentes nichos bacterianos.

Estos nichos, a su vez, pueden o no afectar al hospedero, o a otros microorganismo presentes. Este equilibrio constante en que viven tanto el hospedero como los microorganismos es la clave para que cualquier trastorno incline la balanza y cambie las condiciones de salud/ enfermedad.

La concepción respecto a las enfermedades de origen infeccioso en la boca ha variado desde la búsqueda de patógenos específicos a considerar la infección como una entidad polimicrobiana. Este concepto es clave ya que la existencia de viabilidad bacteriana en comunidad constituye la base del comportamiento de las bacterias, así, bajo determinadas condiciones, algunas especies más patogénicas pueden aumentar proporcionalmente y producir enfermedad.

En este estudio buscamos mediante diversas pruebas microbiológicas y bioquímicas detectar y cuantificar las especies predominantes en un hábitat microbiológico poco estudiado, como son los sacos pericoronarios, basándonos en los conocimientos existentes en hábitats similares como son los sacos periodontales, modelo ecológico *in vivo* que más se asimila a éste, aunque con bastantes diferencias tanto anatómicas como fisiológicas.

El principal objetivo de este estudio es realizar una primera aproximación en Chile al estudio de la microbiología bacteriana de una aproximación cualitativa y cuantitativa, utilizando al cultivo microbiológico como base y las posteriores pruebas de identificación fenotípica y genotípicas para lograr de la mejor manera posible obtener información relevante respecto a las diferentes especies bacterianas que habitan estos hábitat con un enfoque particular en determinados periodontopatógenos: *Prevotella spp.* ya que ha sido reportada como el periodontopatógeno más frecuentemente encontrada en sacos pericoronarios (Sixou et al., 2003; Rajasuo et al., 2007), *Porphyromonas gingivalis* por ser la especie bacteriana periodontopatogénica más frecuentemente encontrada tanto en periodontitis crónica, agresiva localizada y agresiva generalizada en Chile (Silva et

al., 2006) y *Aggregatibacter Actinomycentencomitans* por ser una especie, altamente virulenta, frecuentemente asociada a infecciones agresivas orales, aunque con poca prevalencia en Chile (Silva et al., 2006).

MARCO TEÓRICO

En este marco teórico se tratarán 3 grandes unidades: (i) sacos pericoronarios y sus características ecológicas ambientales que condicionan el desarrollo de pericoronaritis, (ii) una breve descripción de biofilm bacteriano, sus características, componentes y condicionantes de formación, que permiten o dificultan la génesis de particulares biofilms dentro de hábitats específicos en la cavidad oral, finalmente, (iii) descripción de los periodontopatógenos estudiados en esta investigación, sus características principales, consideraciones fenotípicas y genotípicas, epidemiología, y su relación con enfermedad periodontal e infección de los sacos pericoronarios.

I.- Sacos pericoronarios

Los sacos pericoronarios anatómicamente consisten en espacios virtuales formados entre la corona del diente y el tejido blando, que poseen una entrada amplia y terminan en un fondo ciego, a diferencia de la estrecha entrada de un saco periodontal, que además termina en filo de cuchillo. La profundidad del saco pericoronario no va a depender de la progresión de la pérdida de inserción del tejido periodontal que lo soporta, si no que, entre otras condicionantes, de la características eruptivas del diente, constituyendo un hábitat que alberga patologías de diferentes características que las encontradas en los sacos periodontales, básicamente afectados por complicaciones inflamatorias/infecciosas como la Periodontitis.

Pericoronaritis

Pericoronaritis corresponde a una inflamación e infección alrededor de la corona de un diente semierupcionado. Esta entidad, representa una de las primeras causas de dolor agudo en sujetos jóvenes (Guralnick et al., 2004 citado por Rajasuo et al., 2007), y como infección, presenta un patrón multi bacteriano similar a la enfermedad periodontal, favorecido por las condiciones ambientales similares a los sacos periodontales (Leung et al., 1993).

Estudios que han investigado sobre la ecología microbiana de los sacos pericoronarios han encontrado un patrón complejo de diferentes especies de convivencia simultánea, compatible con un biofilm microbiano (Sixou et al., 2003), encontrando especies de cocos y bacilos, aerobios y anaerobios, con predominio de los últimos (Sixou et al., 2003). Las bacterias más comúnmente encontradas son los estreptococos alfa-hemolíticos y bacilos y cocos del género de las *Prevotella*, *Veionella*, *Bacteroides* y *Capnocytophaga* (Sixou et al., Jun. 2003; Sixou et al., Dic. 2003).

II.- BIOFILM

II.1.- Definición

Definición

Un biofilm corresponde a un conjunto de bacterias, con características de poder de adhesión dada por sus matrices extracelulares, que viven en comunidad, agregadas y adheridas entre sí y a una superficie que puede ser tanto natural como artificial. Una manera más simple de definición fue dada por Karatan et al., (2009) en que la definió como una cubierta que presenta material viviente en su interior (Bios: Natural y film: Cubrir).

A nivel de la boca, una de las grandes diferencias de los nichos ecológicos presentes en la cavidad oral, está dada por su particular anatomía donde conviven en una misma estructura tejidos blandos, duros y secreciones que los recubren. Es esta constitución la que en parte determina la colonización bacteriana. Así, colonizando los tejidos orales, los microorganismos van a generar complejos biofilm que, a su vez, van a tener una dinámica en el tiempo. Para poder generarse este patrón de crecimiento bacteriano son necesarios tres componentes constitutivos esenciales: una superficie dura en donde se adhieran las bacterias, la comunidad microbiana "per se" y una red de canales intrabiofilm, que transportan nutrientes, desechos y microorganismos a nuevos nichos (Socransky & Haffajee, 2005). La colonización bacteriana dentro de los biofilms va a depender de factores favorables o contraproducentes tanto del medio como de la especie misma para su asentamiento y proliferación, así, una colonización favorable dentro de un biofilm va a depender de: la presencia de un lugar colonizable en el momento preciso, posesión de capacidad sobreponerse a determinadas condiciones ambientales adversas, habilidad para obtener nutrientes del ecosistema impuesto en ese momento, capacidad de ocupar los nichos bacterianos antes que colonizadores laterales de distintas especies, adherencia a superficies determinadas, y, sortear los mecanismo de defensa del hospedero. Es así que se constituye un biofilm en base a las especies bacterianas más aptas y compatibles para generar su nicho ecológico en un medio dado. Esto, en el fondo, constituye una prueba más de la teoría Darwiniana de la selección natural de las especies. Una vez instaurado este ecosistema, su relación con el hospedero va a llegar a una etapa denominada *clímax* en el que se establece un balance entre los colonizadores y el hospedero conviviendo ambos en armonía (Socransky & Haffajee, 2005).

II.2.- Formación de Biofilm

Las etapas de constitución de un biofilm se pueden dividir en 5, a pesar que la existencia de algunas no quiere decir que no se entienda a esa unidad ecológica como un biofilm, estas son (Figura 1): (i) adhesión inicial producida por los denominados pioneros que se adhieran a la superficie de colonización y que realizan la superficie más atractiva a la colonización de otras especies bacterianas, (ii) adhesión irreversible por las especies pioneras, (iii) maduración primaria, (iv) maduración secundaria y (v) dispersión (Monroe, 2007).

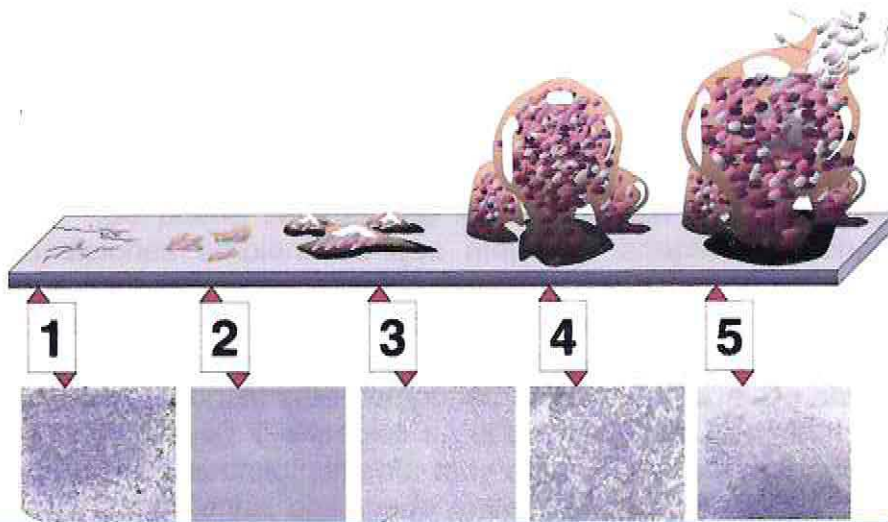


Figura 1. Esquema de etapas de formación de un Biofilm, extraído de: "Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms" (Monroe, 2007)

Las organizaciones bacterianas existentes en la cavidad oral, dependiendo del ambiente generado y de sus mecanismos de adaptación en conjunto con las de otras especies, pueden generar nichos ecológicos que sean susceptibles de soportar crecimiento bacteriano. A su vez las microecologías bacterianas son dinámicas en el tiempo debido a cambios producidos por especies bacterianas que alteran el ecosistema dejando mejores posibilidades de colonización a otras especies, o por factores externos no dependientes de las especies residentes, que hacen más factible la colonización a otras que tengan mejores capacidades para adaptarse al medio. De esta manera se genera el concepto de *sucesión* bacteriana. Las enfermedades orales poli microbianas como la enfermedad periodontal son ejemplos clásicos de este mecanismo, en donde colonizadores primarios dan paso, de acuerdo a modificaciones ambientales de su hábitat, a secundarios que se adaptan mejor a las condiciones del medio. Es de destacar que cualquier infección polimicrobiana se compone de proporciones distintas de especies que afectadas por los factores antes descritos varían generando patología, o al contrario, estableciendo nichos no tan virulentos, un claro ejemplo, es el aumento del complejo rojo y naranja proporcionalmente en enfermedad periodontal en comparación con salud periodontal (Socransky & Haffajee, 2005).

En virtud de su característica polimicrobiana, los estudios que mejor describen su composición deben evaluar al menos dos dimensiones de ésta, estos son: la prevalencia de las distintas especies y la cantidad en que se encuentran presentes. A estos dos aspectos también le podemos agregar las variaciones temporales de

prevalencia y número en virtud de las características genotípicas y ambientales presentes en un momento dado.

II.3.- Biofilm Subgingival

Se puede señalar que la colonización microbiana se da de acuerdo a las condiciones ambientales que mejor se adapten al genotipo específico de una especie bacteria en período determinado. En otras palabras la especie que mejor exprese su fenotipo por sobre otras. Actualmente se considera que más de 500 especies colonizan los biofilm subgingivales, pero no más de 30 especies son las que proporcionalmente componen la gran mayoría, de ahí la importancia que se le da a no más de 5 especies en el desarrollo de periodontopatías, las que podemos encontrar proporcionalmente muy aumentadas en enfermedad periodontal. A pesar de la competencia observada entre especies dentro del biofilm, se ha demostrado, en estudios *in vivo* e *in vitro* de que ciertas especies bacterianas aparecen más frecuentemente en relación a otras, es así que Socransky publicó un esquema en donde se agrupaba a las especies en complejos, los denominados *Complejos de Socransky*, (Figura 2) debido a su frecuencia de co-detección, sugiriéndose un conjunto de actividades metabólicas entre especies que favorecen su desarrollo. Ejemplo de esto es el "complejo rojo", compuesto por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* (Socransky & Haffajee, 2005).

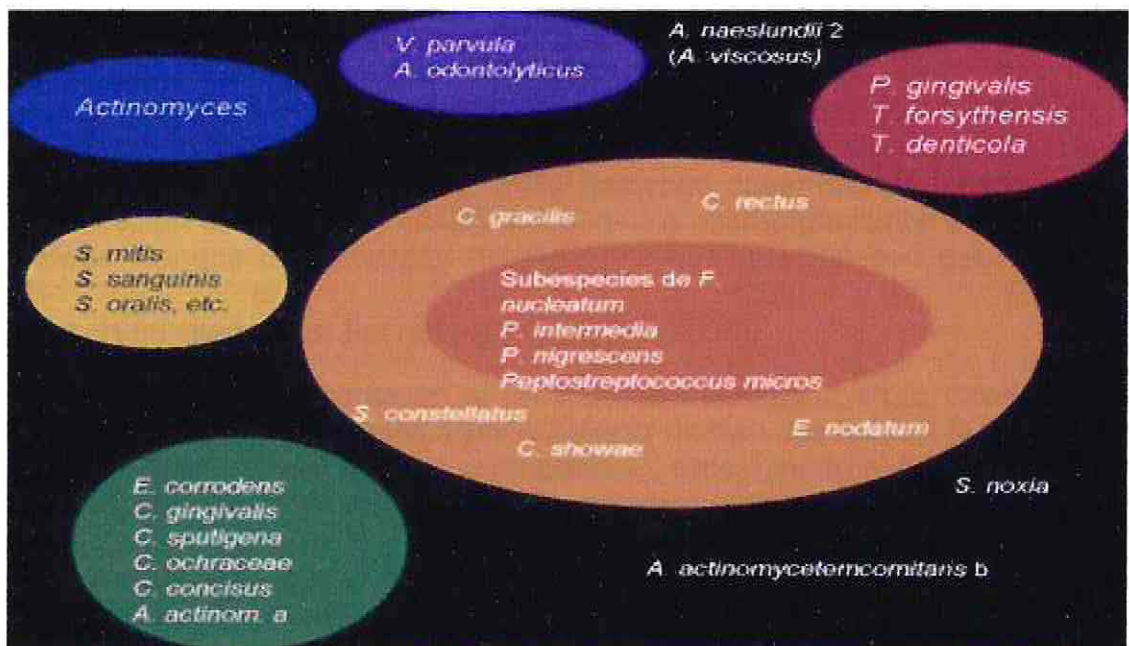


Figura 2. Complejos de Socransky.

A pesar de que algunos estudios señalan que existe una localización topográfica de los distintos complejos, investigaciones actuales señalan que más allá de una localización estricta, la diferenciación debe ser más amplia, diferenciando entre colonizadores *primarios* y colonizadores *secundarios* sin necesidad de que exista un patrón clásico de localización de los distintos complejos (Shillinger et al., 2012).

II.4.- Factores que condicionan el Desarrollo del Biofilm

Existen dos factores externos a los microorganismos que afectan el desarrollo del biofilm cuantitativamente y cualitativamente, estos son la superficie sobre la cual se desarrolla y los fluidos en general. Basándonos en la concepción actual de que los microorganismos orales son susceptibles de colonizar prácticamente cualquier región de la cavidad oral variando sus proporciones de acuerdo a las condiciones del medio, son los factores ambientales quienes van a determinar finalmente las variaciones proporcionales de las especies según su mejor adaptación a éstas (Socransky & Haffajee, 2005). Específicamente, la superficie en que se desarrolla influye drásticamente en las proporciones, encontrándose por ejemplo predominancia de *Prevotella Melaninogenica*, en saliva y en caras dorsales y laterales de la lengua o de *Streptococcus oralis* y *mitis* en la encía adherida. Específicamente los sacos generados alrededor del diente ya sea periodontales o pericoronarios, van a generar que se produzcan ecologías ambientales particulares en las cuales se combinan tejidos duros y blandos, así también es posible encontrar proporciones bacterianas distintas a otras áreas (Socransky et al., 1991 citado por Socransky & Haffajee, 2005), por otra parte, en condiciones de desdentación completa la población de *Streptococcus mutans* disminuye drásticamente. Esta asociación entre la superficie presente y las bacterias desarrolladas es tan fuerte que incluso afectan cuantitativa y cualitativamente los microorganismos encontrados en los tejidos blandos de pacientes dentados en comparación con desdentados (Carlsson et al., 1969; Emilson & Torsellius, 1988 citados por Socransky & Haffajee, 2005).

El otro factor determinante en el crecimiento microbiano en la cavidad oral corresponde a los fluidos intraorales. Principalmente existen dos fluidos: la saliva y el fluido crevicular, los que difieren en su composición, presentando el fluido crevicular características más exudativas. La función principal de estos fluidos es la de nutrición, transporte de desechos y bacterias dentro, y entre, los diferentes biofilms y bacterias colonizadoras de las diferentes zonas de la cavidad oral. Estas funciones son de vital importancia para el crecimiento y la supervivencia bacteriana. Estudios basados en técnicas moleculares de detección y cuantificación (*DNA-DNA checkerboard*) han demostrado un mayor crecimiento en sujetos sanos o con periodontitis que en sujetos con síndrome de Sjogren (Socransky et al., 1998 citado por Socransky & Haffajee 2005). En lo que respecta a sitios subgingivales, está demostrado que estados de mayor inflamación generan una mayor producción de

líquido crevicular el cual a su vez genera un mayor crecimiento microbiano (Socransky & Haffajee, 2005).

III.- BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS EN ESTUDIO

Al observar macroscópicamente una placa de agar sangre hemina-menadiona de una muestra de placa subgingival, se aprecian pequeñas unidades formadoras de colonias (UFC) redondas de color negro intenso y brillante de diferentes tamaños, las que se pueden subdividir en *Prevotella Intermedia*, *Prevotella Nigrescens* y *Porphyromonas gingivalis*, principalmente, constituyendo las especies bacterianas de muestras obtenidas de biofilm subgingival que más frecuentemente crecen en este medio con este aspecto, las que, formando colonias de color negro profundo, resaltan por sobre las demás especies que forman UFC de color blanco a traslúcido.

III.1.- *Prevotella Intermedia/nigrescens*

Clasificación

Orden: *Bacteroides*

Familia: *Prevotellaceae*

Género: *Prevotella*

Especie: *Intermedia*

El género *Prevotella* (Figura 3) corresponde a un bacilo gram negativo, anaerobio estricto frecuentemente encontrado en sitios anaeróbicos de la cavidad oral. Se la encuentra asociada, en números elevados, a enfermedad periodontal por lo que ha llegado a considerarse como un patógeno periodontal además de los ya descritos, correspondientes al complejo rojo de Socransky y *A. Actinomycentencomitans* (Mombelli et al., 2000). La especificación entre *Prevotella Intermedia* y *Prevotella Nigrescens* fue solo posible mediante técnicas de biología molecular generando una diferenciación de tipo genotípico en vez de las clásicas pruebas fenotípicas que por lo estrechamente relacionadas de estas especies hacía prácticamente imposible su diferenciación (Loung et al., 2001).

La clasificación de Socransky describe a las *Prevotella Intermedia/Nigrescens* en el complejo naranja sugiriendo ser patógenos periodontales putativos aumentado proporcionalmente su población en enfermedad periodontal de manera significativa. Topográficamente se ha intentado localizarlas dentro del biofilm sugiriendo en un primer momento que lo poblarían primero que el complejo rojo (Socransky & Haffajee, 2005), siendo fundamentales para que bacterias pertenecientes a este complejo puedan colonizarlo. Estudios recientes de biofilms subgingivales en base a

hibridización *in situ* fluorescente, han demostrado que si bien existe una clara predominancia en colonizar sectores topográficos específicos es posible encontrar una distribución más heterogénea de estas especies que lo que en un momento se pensó (Shillinger et al., 2010)



Figura 3. *Prevotella Intermedia/nigrescens*, en agar sangre hemina-menadiona, fenotípicamente presentan la mayoría de las características observables en común, Foto extraída de Sanz et al. 2004

A pesar de que en una placa de cultivo a simple vista las UFCs pueden presentar características similares, su expresión de características bioquímicas puede variar entre especies incluso en especies tan similares como la *Prevotella Intermedia* y *P. Nigrescens*. Una de las principales estudiadas para el género de las *Prevotella* es su característica de producción de beta lactamasa. Loung et al. (2001) en un estudio en que evaluó la resistencia a la amoxicilina y tetraciclina por parte de *Eikinella corrodens*, *Prevotella Intermedia* y *P. Nigrescens*, encontró que la especie que mayor resistencia tenía a la amoxicilina es la *P. Nigrescens*, seguida de *Prevotella Intermedia* y finalmente *Eikinella corrodens* (concentraciones mínimas inhibitorias mayores o iguales a 1 ul. por disco de inhibición) con un porcentaje de susceptibilidad de un 67%, 68% y 100% respectivamente. Además se utilizaron agares sangre selectivos suplementados con amoxicilina (1 ug. por ml.) para el cultivo selectivo de muestras clínicas, aislando cepas resistentes, resultando en que un 100% de las cepas cultivadas correspondieron a cepas resistentes. Estos resultados demuestran que existen cepas bacterianas de *Prevotella Intermedia/nigrescens* que son resistentes a la amoxicilina y que conviven junto a especies susceptibles, sugiriendo una posible selección bacteriana ante administraciones de amoxicilina dejando cepas resistentes residentes, haciendo cada vez menos efectiva las terapias antibióticas en base a amoxicilina.

En cuanto a su rol patogénico específico, estudios comparativos de composición microbiana de biofilms han encontrado que tanto la especie *Prevotella Intermedia* como *Prevotella Nigrescens* aumenta proporcionalmente en enfermedad periodontal comparado con sujetos sanos periodontalmente (Socransky & Haffajee, 2005) encontrándose presente en altas proporciones en sacos con características inflamatorias (Mombelli et al., 2000). Estos resultados a su vez son congruentes con otros estudios en los cuales se señala que al encontrar sacos con mayor profundidad de sondaje se encontró una mayor variabilidad de genotipos de *Prevotella Intermedia* (Alves et al., 2006).

Un aspecto importante es señalar que las *Prevotella Intermedia/Nigrescens* han sido más frecuentemente encontradas en distintos sitios tratados

periodontalmente de un mismo paciente que la *Porphyromonas gingivalis*, en un estudio realizado por Mombelli et al., (2000) en el cual evaluó la presencia residual de estos patógenos periodontales más *Aggregatibacter Actinomycetencomitans*, además se realizó una regresión lineal de multivariadas por medio de las cuales se determinó que existe una asociación significativa entre la presencia de *Prevotella Intermedia/Nigrescens* y sangrado al sondaje, a la vez que existió una asociación significativa entre profundidad de sondaje y presencia de *Porphyromonas gingivalis* (Mombelli et al., 2000), por lo que se puede asociar a estas especies la presencia de características inflamatorias de la enfermedad periodontal.

Estudios comparativos realizados en Chile han señalado que se encuentra una mayor prevalencia de *Porphyromonas gingivalis* por sobre *Prevotella Intermedia/Nigrescens* tanto en Periodontitis crónica, Periodontitis agresiva localizada y Periodontitis agresiva generalizada (Silva et al., 2005). Lopez N., (2000) utilizando sondas de DNA también encontró una prevalencia mayor de *Porphyromonas gingivalis* en comparación a *Prevotella Intermedia* en sitios activos como pasivos con enfermedad periodontal.

En cuanto a su rol patogénico en la pericoronaritis se la ha encontrado altamente prevalente en esta patología siendo el bacilo gram negativo anaerobio más frecuentemente encontrado (Sixou et al., 2003)

III.2.- *Porphyromonas Gingivalis*

En 1999 Jorgen Slot tituló el Periodontology 2000 con su nombre, junto a *Actinobacillus Actinomycetencomitans*, que posteriormente pasó a llamarse *Aggregatibacter* cambiando su género. Así podemos encontrar libros de publicaciones dedicadas exclusivamente a ella, pero a pesar de los esfuerzos realizados aún quedan muchos aspectos no descubiertos de esta especie (Figura 4).

Características generales

La clasificación científica de esta bacteria es la siguiente

- Reino: *Bacteria*
- Familia: *Bacterioidae*
- Género: *Porphyromona*
- Especie: *Gingivalis*

Correspondiente a un bacilo gram negativo, no formador de espora, no móvil, anaerobio estricto de unos 0,8 micrones de ancho y 1 a 3,5 micrones de largo (Olsen et al., 1999; Holt et al., 1999)



Figura 4. *Porphyromonas gingivalis* ATCC, cultivadas en agar sangre hemina menadiona, para efectos de esta tesis.

Características Bioquímicas

Porphyromona gingivalis es una especie anaerobia, asacarolítica que coloniza zonas donde existen bajas concentraciones de oxígeno y altas concentraciones de nitrógeno, por tanto, idealmente coloniza sitios en boca donde se favorezcan estas características, como son los sacos periodontales profundos, donde existe un potencial de oxido reducción reducido, que baja aún más en enfermedad periodontal, sumado a abundantes nutrientes proteínicos (Mettraux et al., 1984 citado por Olsen et al., 1999). Existe la posibilidad de cultivar a esta especie sin menadiona exógena pero no sin aporte de hemina, aún cuando autores señalan que *in vivo* es posible que realice biosíntesis de este compuesto (Olsen et al., 1999), aún así, la presencia de hemina exógena genera un aumento en el crecimiento de esta bacteria *in vitro* y de su virulencia en modelos de ratones de experimentación (Marsh et al., 1993). En cuanto a los requerimientos de amino ácidos, el más captado es la arginina seguido por el aspartato, serina, histidina y alanina (Shah et al., 1987 citado por Olsen et al., 1999). La presencia de péptidos completos causa un aumento en el crecimiento de la *Porphyromona gingivalis* sugiriendo un rol importante de las proteinasas producidas por ella en la función nutritiva (Olsen et al., 1999).

Factores de Virulencia de *Porphyromonas gingivalis*

Por factor de virulencia entendemos moléculas que permiten establecer relaciones simbióticas o de parasitismo con el hospedero (Holt et al., 1999). Para poder ejercer sus factores de virulencia de manera completa debe primero establecerse en su correcto hospedero y competir contra las medidas de defensa del propio hospedero y contra la flora comensal preexistente (Holt et al., 1999). A su vez son estos factores los que influyen en el desarrollo de la enfermedad periodontal, actuando directamente sobre el hospedero o desencadenando una respuesta inmunoinflamatoria (Hernandez et al., 2011) que lleva al daño propio por parte de éste (Slots et al., 1981). La *Porphyromonas gingivalis* posee una gran cantidad de factores de virulencia de los cuales destacan:

Cápsula

La mayoría de las cepas de *Porphyromona gingivalis* presenta una zona electrodensa externa considerada como una cápsula de polisacáridos, a la cual se le

ha descrito importantes propiedades antifagocíticas (Okuda et al., 1987 citado por Holt et al., 1999). Su composición química difiere entre distintas cepas, pero en general su contenido varía entre galactosa, glucosa, glucosamina, manosa y metilpentosa (Okuda et al., 1987 citado por Holt et al., 1999). Estudios han demostrado que cepas con gran cantidad de cápsula poseen mayor resistencia a la fagocitosis, son más hidrofílicas, tienen menor autoaglutinación y reducen la respuesta inflamatoria de los fibroblastos (Holt et al., 1999; Bruner et al., 2010).

Membrana celular

Como toda membrana celular de una bacteria Gram negativa presenta 2 membranas celulares, la membrana interna presenta por fuera peptidoglicanos y la externa, por fuera, lipopolisacáridos, lipoproteína y proteínas de transporte y periféricas, además ambas membranas se encuentran unidas por lipoproteínas (Holt et al., 1999; Curtis et al., 2011). La membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* posee a lo menos 20 proteínas periféricas con un peso de entre 20 a 90 kDa (Nakao et al., 2011). A esta membrana se le ha descrito la capacidad de coagregar a la *Porphyromona gingivlis* con específicas bacterias Gram positiva o negativos mediada por proteínas periféricas, coagregaciones importantes son las que se producen entre *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella Intermedia* o entre *Porphyromona gingivalis* y *Actinomyces Viscosus* (Kinder & Holt, 1989; Ellen & Grove, 1989). Se ha relacionado la expresión de proteínas periféricas de membrana a la necesidad de hemina, regulando su expresión de acuerdo a la presencia de esta en el medio ambiente (Bramanti & Holt, 1990) cuya función sería la de unir la hemina que ha sido degradada por la hemolisina presente en vesículas de la membrana externa (Holt et al., 1999).

Vesículas de membrana externa

Durante el crecimiento bacteriano las bacterias gram negativas liberan vesículas al medio externo de entre 20 y 250 nm. Las vesículas de membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* contienen gingipainas, LPS y fimbriae. Una vez lisadas estas vesículas liberan al medio antígenos que son reconocidos estimulando al sistema inmune del hospedero. Mutantes de esta especie para vesículas de membrana externa generan una menor respuesta inmune-inflamatoria (Nakao et al., 2011)

Lipopolisacárido

Lipopolisacárido (LPS) es una molécula de 10 kDa. con características anfipáticas, la porción hidrofílica se denomina "O-specific antigen" y la porción hidrofóbica se denomina lípido A donde se une a la membrana externa. Bioquímicamente se compone de ramnosa, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina, galactosamina y ácidos grasos C 15:0 (Holt et al., 1999; Nakao et al., 2011; Curtis et al., 2011). Estudios han señalado que la toxicidad del lipopolisacárido de *Porphyromona gingivalis* es mucho menos que el de otras especies bacterianas como *E. Coli* a excepción de la cepa 381 que posee un LPS más tóxico (Koga et al.,

1985; Nakao et al., 2011). Al interactuar el LPS de *Porphyromonas gingivalis* con receptores CD 14 en monocitos induce la secreción de citoquinas, pero en menor grado que LPS de *E. Coli*, esto explica el porqué puede crecer en su hospedero sin ser detectada en un comienzo, progresando a una enfermedad lenta y crónica (Dahlén G & Slots, 1989 citado por Holt et al., 1999). La capacidad endotóxica le corresponde a la porción Lípido A, mientras que la porción O-antígeno posee una función inmunobiológica (Takada et al., 1992 & Curtis et al., 2011). Específicamente la porción Lípido A se le ha detectado capacidad de lisar células, posee una capacidad pirogénica reducida (Tanamoto et al., 1997) además de poseer una capacidad de hemaglutinación en animales (Okuda y Kato, 1987), por otra parte la temperatura externa se ha demostrado ser importante en la producción de Lípidos A más virulentos, cambiando la composición química del grupo fosfato, estimulando de manera distinta el receptor TLR-4 (Curtis et al., 2011 y Coats et al., 2010). Lípido A además puede inducir la producción de interleuquina(IL) -1beta, IL-6, IL-8, Interferón gamma, factor estimulante de granulocitos y macrófagos y receptor antagonista de IL-1 (Ogawa, 1989 citado por Holt et al., 1999), estimula la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y óxido nitroso (NO) *in vitro* (Tanamoto et al., 1997). Además estudios han encontrado la capacidad de LPS de producir Prostaglandina (PGE) 2 (Bramanti et al. 1989), de sensibilizar ciertos nociceptores (Randi et al., 2011) y de bloquear receptores *Toll-Like 4* que serían claves en el reconocimiento de estas especies bacterianas por parte del hospedero (Yoshimura et al., 2001 y Hajishengallis ,2011).

Fimbriae

Gran cantidad de bacterias Gram negativas posee apéndices en su superficie conocidas como fimbrias. Han sido descritas dos tipos de fimbrias una que permite la adhesión a otros microorganismos o células del hospedero y un segundo tipo que permite conjugación bacteriana, la cual es mucho más larga y flexible (Holt et al. 1999). Salvo tres cepas de *Porphyromonas gingivalis* todas las demás poseen fimbrias alrededor de su superficie, cada una de estas se compone de aproximadamente 1000 sub unidades (Fimbrillina) (Hardley & Tipler, 1986 citado por Holt et al., 1999; Okuda et al., 1986). El gen que codifica la sub unidad de la fimbriae ha sido codificado y se denomina *fimA* y está presente en todas las cepas examinadas (Nakagawa et al., 2006). Las Fimbrias cumplen una importante función en la invasión bacteriana a células epiteliales humanas (Yilmaz et al., 2003; Yilmaz et al., 2002), de hecho, cepas que poseen menor cantidad de fimbrias o con fimbrias más pequeñas se adhieren más débilmente a las células epiteliales (Watanabe et al., 1992), además estudios han demostrado que dentro de la saliva existen receptores para las fimbrias que facilitan su unión con la hidroxiapatita (Amano et al., 1994 & Kumada et al., 2012). Las fimbrias de *Porphyromona gingivalis* han sido clasificadas en seis tipos (subtipos) de los cuales las que presentan el tipo II de fimbrias poseen una capacidad mayor de adherencia e invasión celular y a su vez ejercen mayor virulencia intracelular, destruyendo las uniones intracelulares e

impidiendo la migración celular necesaria para la curación de tejidos (Nakagawa et al., 2006).

Materiales y métodos

Pregunta de Investigación

¿Existe la presencia de la especie periodontopatogénica *Porphyromonas gingivalis* en sacos pericoronarios inflamados de terceros molares semiincluidos en pacientes sin periodontitis del hospital Carlos van Buren de Valparaíso?

Objetivos

Objetivo general

Determinar y cuantificar la presencia de la especie periodontopatogénica *Porphyromonas gingivalis* en sacos pericoronarios de pacientes sin periodontitis del hospital Carlos van Buren de Valparaíso.

Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de estudio efectivo para especies periodontopatogénicas: *Porphyromonas gingivalis* y especies de *Prevotella*, en infecciones de la cavidad oral.
- Determinar el rol de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* en la patogenia de la pericoronaritis.
- Determinar diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de *Porphyromonas gingivalis* y especies de *Prevotella* con las encontradas por estudios realizados en Chile en sacos periodontales con Periodontitis crónica y agresiva localizada y generalizada.
- Determinar diferencias estadísticamente significativas entre las edades de los pacientes utilizados en este estudio y los utilizados en grupos de pacientes en Chile para evaluar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* y especies de *Prevotella*, en pacientes con enfermedad periodontal crónica y agresiva generalizada y localizada.

Definición de Variables

1. Edad: Tiempo transcurrido a partir del nacimiento del individuo. Variable cuantitativa continua.

Método de medición: mediante encuesta personal al paciente consignándolo en la ficha clínica.

2. Índice CPITN: Índice de necesidad de tratamiento periodontal de la comunidad. Variable cualitativa nominal.

Método de medición: Mediante la evaluación de profundidades de sondajes con una sonda OMS, de acuerdo a su graduación, realizándose en dientes 17; 16; 11; 26 27; 47; 46; 31; 36; 37; en menores de 19 años se evita considerar los segundos molares.

3. Terceros molares presentes en boca: Último molar de las arcadas dentarias. Variable cuantitativa discreta

Método de medición: Mediante examen clínico intraoral.

4. Terceros molares en semierupción: Terceros molares que presentan parte de su corona presente en boca y la otra parte bajo la mucosa o hueso. Variable cuantitativa discreta.

Método de medición: mediante examen clínico intraoral.

5. Saco pericoronario inflamado: Corresponde a la inflamación del tejido gingival que circunda la corona de un diente (Rajasuo et al., 2007). Variable cualitativa nominal.

Método de medición: Mediante exámen clínico intraoral de acuerdo a los parámetros establecido.

6. Radiografías de los terceros molares: imagen registrada en una placa o película fotográfica. La imagen se obtiene al exponer al receptor de imagen radiográfica a una fuente de [radiación] de alta energía, comúnmente rayos X o radiación gamma procedente de isótopos radiactivos. Variable cualitativa dicotómica

Método de medición: Evaluación de la presencia de la ficha clínica al momento del examen.

7. *Porphyromonas gingivalis*: Correspondiente a un Bacilo, Gram negativo, no formadora de spora, no móvil, anaerobio estricto de unos 0,8 micrones de ancho y 1 a 3,5 micrones de largo, formadora de colonias pigmentadas de negro en agar sangre hemina menadiona (Holts et al., 1999). Variable cuantitativa discreta.

Método de medición: mediante conteo de UFC ml por método de cultivo anaeróbico e identificación fenotípica por fluorescencia negativa a la luz U.V. en metanol.

8. *Prevotella Intermedia/nigrescens*: El género *Prevotella* corresponde a un bacilo gran negativo, anaerobio estricto frecuentemente encontrado en sitios

anaeróbicos de la cavidad oral (Mombelli et al., 2006). Formadora de colonias pigmentadas de negro. Variable cuantitativa discreta.

Método de medición: mediante conteo de UFC ml por método de cultivo anaeróbico en agar sangre hemina-menadiona e identificación fenotípica por fluorescencia roja a las luz U.V. en metanol.

Población de estudio y diseño de estudio

Corresponde a un estudio descriptivo de corte transversal, en el cual se examinó a 40 pacientes con sacos pericoronarios inflamados e infectados de los cuales sólo 11 pacientes (tamaño muestral utilizado Rajasuo et al., 1996) del Servicio de Cirugía y Traumatología Máxilo Facial del Hospital Carlos van Buren de Valparaíso, Servicio de Salud Valparaíso San Antonio (SSVS), en el período comprendido entre Mayo de 2012 a Julio de 2012, cumplieron los siguientes criterios de inclusión: (i) Atendidos en el Hospital Carlos van Buren de Valparaíso en el período comprendido entre Abril de 2012 y Julio de 2012, (ii) Con presencia de terceros molares semi-erupcionados y con sacos pericoronarios inflamados e infectados, (iii) Sin tratamiento antibacteriano actual, sistémico o local por un período de 6 meses, (iv) Consentir la participación en el estudio, mediante la suscripción personal o de su representante legal de consentimiento informado (ver anexo), (v) Sin presencia de periodontitis, (vi) Sea posible la toma de muestras microbiológicas. Además fueron excluidos los pacientes que cumplieran con los siguientes criterios de exclusión: (i) Pacientes menores de 18 años, en que su representante legal no consienta el procedimiento, (ii) Pacientes embarazadas, (iii) Pacientes con alguna deficiencia mental.

El estudio fue explicado a cada uno de los pacientes participantes, respondiendo cada una de las dudas presentadas por ellos y solicitándoles que aceptaran firmar el consentimiento informado (Anexo I) y los datos fueron consignados en una ficha clínica diseñada para los efectos de esta Tesis (Anexo II) .

Comité científico

El Protocolo de estudio fue diseñado de acuerdo a las normas establecidas en la Declaración de Helsinki, este fue presentado ante la oficina de Gestión Docente del Hospital Carlos van Buren, con copias por cuadruplicado para: el Jefe de Servicio de Cirugía Máxilo Facial, archivo de oficina de Gestión Docente, Jefe de Comité Científico del Hospital Carlos van Buren y otra para su archivo. Una vez aprobada por la oficina de Gestión Docente del Hospital y por el Jefe de Servicio de Máxilo Facial, se presentó, al comité científico del Hospital, obteniéndose su aprobación en carta Ref.: N° 05 del 16-01-2012 (Anexo III).

Examinador

El examinador fue instruido previamente para el procedimiento de recolección de muestras del saco pericoronario mediante instrucción por medios audiovisuales

producidos por el Departamento de Odontología Conservadora de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Mediciones clínicas

Todos los pacientes seleccionados fueron evaluados en los siguientes criterios. Anamnesis sistémica, examen extraoral e intraoral en general, índice CPITN, número de terceros molares presentes dentro de los cuales se especificó si: estaban incluidos, en semi-inclusión o totalmente incluidos, especificando la posición de los terceros molares en semiinclusión: (a) vertical, (b) completamente vertical, (c) en mesioversión, (d) en distoversión. Además se examinaron mediante radiografías periapicales o panorámicas si existían al momento del examen, no siendo su presencia determinante al momento de la selección del paciente. Las características inflamatorias presentes al momento del examen de los sacos pericoronarios se clasificó en 3 tipos (especificados en Tabla I) basándonos en las características generales de la inflamación y parámetros utilizados en periodoncia para evaluar el grado de inflamación gingival. Todas las mediciones fueron realizadas antes de la toma de muestras clínicas, a excepción del índice CPITN que se realizó posterior a la toma de muestras para evitar contaminación de las muestras clínicas.

Variables	Saco pericoronario inflamado	Saco pericoronario con inflamación leve	Saco pericoronario sin inflamación
Dolor	Historia de dolor positiva	Historia de dolor negativa	Historia de dolor negativa
Eritema	Eritema del capuchón	Eritema del capuchón	Sin eritema
Edema	Presencia de edema	Edema leve del capuchón	Sin edema
Hemorragia	Hemorragia post instrumentación	Hemorragia post instrumentación	No sangra post instrumentación o es leve
Exudado	Puede existir exudado purulento	Sin exudado purulento	Sin exudado purulento
Impotencia funcional	Puede existir trismus	Generalmente no hay	No existe

Tabla I. Determinación de las características inflamatorias de los sacos pericoronarios al momento del examen.

Recolección de biofilm bacteriano subgingival

Una vez identificado el saco pericoronario en el cual se iba a realizar la toma de muestra de biofilm subgingival, se procedió a anestesiarlo solamente mediante técnicas de anestesia tronculares (mepivacaína 3%; Adrenalina 1:100.000) de manera de impedir la contaminación con sangre del saco.

Luego se aisló el saco pericoronario seleccionado con gasas estériles, la placa bacteriana supra gingival fue eliminada mediante una tórula de algodón, sin tocar el margen gingival. Posteriormente el saco pericoronario fue secado con tórulas de algodón. El biofilm subgingival fue tomado con una cureta estéril (Hu-Friedy $\frac{1}{2}$ o $\frac{3}{4}$ debido a su facilidad de adaptación a los tubos de crio-conservación y a adaptarse mejor a los planos de los sacos pericoronarios) sin que existiera hemorragia del saco al momento del examen, ni que la muestra de biofilm fuera contaminada con sangre o saliva en ninguna zona. Obteniéndose una muestra que cubriera por completo la superficie superior del extremo activo de la cureta. Inmediatamente fue sumergida enérgicamente en el medio de transporte a 4°C, de manera de que se distribuyera homogéneamente, para su posterior almacenamiento previo a ser procesada. Muestras contaminadas con algodón, hilos de gasa, saliva o sangre fueron excluidas del estudio. Se obtuvo una muestra por paciente.

Medio de transporte

El medio de transporte utilizado en este estudio fue RTF (*reduced transport fluid*) estéril (Loesche & Syed, 1972) sin EDTA, el cual fue alicuotado a 1 ml en un tubo de crio conservación con tapa rosca, con goma de cierre para evitar filtraciones (Figura 5). Este medio fue mantenido en refrigeración a 4° C durante todo el desarrollo del estudio evitando romper la cadena de frío en ninguna de las etapas, hasta finalmente ser procesadas las muestras.



Figura 5. Tubo de crio conservación modificado con tapa rosca, el cual presenta RTF en su interior alicuotado en 1ml.

Composición química de RTF (Loesche & Syed, 1972)

Components Amount (ml), (Componentes en ml.), fórmula por litro.

1. Stock mineral salt solution no. 1 75	Solución salina no. 1..... 75
2. Stock mineral salt solution no. 2' 75	Solución salina no. 2.....75
3. 0.1 M EDTA 10	3. 0.1 M EDTA 10
4. 8% Na ₂ CO ₃ 5	4. 8% Na ₂ CO ₃ 5
5. 1% dithiothreitol (freshly prepared) 20	5. 1% dithiothreitol (preparación fresca) 20
6. Resazurin 0.1% (optional) 1	6. Resazurin 0.1% (opcional) 1
7. Distilled water 814	Agua destilada.....814

Trasporte de muestras en RTF

Una vez sumergidas las muestras en RTF, estas fueron transportadas en un plazo no mayor a 3 hrs. cronológicas a 4°C. + - 2°C. (medidas con termómetro introducido dentro de la caja), dentro de una caja de material aislante con geles congelados (*gel pack, Esky Coleman de 450 ml*), y procesadas inmediatamente.

Procesamiento de Muestras

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Anaerobios del Departamento de Microbiología Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Edificio Dr. Juan Collin, 3er. piso, calle Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago de Chile.

Dilución seriada (Figura 6)

Se realizó una dilución seriada de la siguiente forma: las muestras en RTF fueron sometidas a un primer vortex por 10 segundos para homogenizar su contenido, posteriormente se tomó con una micropipeta graduada 100 microlitros (ul) de solución para ser diluida en 900 ul. de solución buffer fosfato en un tubo Eppendorf, estéril, posteriormente de esta solución se tomaron 100 ul. los cuales fueron diluidos en 900 ul. de Buffer fosfato, repitiendo el procedimiento 3 veces, para obtener diluciones seriadas en 3 veces como máximo (-1; -2; -3). Todas las diluciones fueron sometidas a un segundo vortex por 15 segundos. En cada procedimiento se utilizaron puntas estériles de micropipetas las cuales fueron desechadas posteriormente a su utilización. La solución de RTF restante fue congelada a -20°C. Todo el procedimiento fue realizado bajo una campana extractora de aire para evitar contaminación de las muestras.



Figura 6. Grada con tubos Eppendorf posterior a realizar la dilución seriada

Cultivo inespecífico

Posteriormente se sembraron 100 ul. de dilución -2 y -3 en agar sangre hemina-menadiona y 100 ul de RTF no diluido y de dilución -1 en agar TSVB, colocando la alícuota en la superficie del agar precalentado a 37°C y esparciéndola por toda la superficie con una asa de Drigalski, logrando así una capa uniforme.

Por lo tanto cada muestra se cultivó en 4 Placas: 2 Placas de Agar base N° 2 (Oxoid CM0271) no específico con 5% sangre de caballo defibrinada, 1 mg/L hemina y 0.5 mg/L menadiona, para el recuento de UFC anaeróbicas totales (UFC/ml) y para la detección y cuantificación de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella spp.* y 2 placas agar Tryptona de soya (Oxoid CM0131), 10% suero de caballo, Bacitracina y Vancomicina (TSVB) para cultivo selectivo de *Aggregatibacter Actinomycentencomitans*. Todo este procedimiento fue realizado bajo campana extractora de aire para evitar contaminación de las muestras y placas de cultivo (Figura 7).



Figura 7. Procedimiento de cultivo en placas de agar sangre hemina-menadiona y placas de agar TSVB.

Incubación

Las placas de cultivo con agar sangre hemina-menadiona fueron colocadas en una cámara de anaerobiosis, con una bolsa generadora de gas en su interior, produciendo una atmosfera anaeróbica de 80% Nitrógeno, 10% Dióxido de Carbono y 10 % de Hidrógeno (Genbox anaer, anaerobic atmosphere generators, REF 94 124, Biomerieux) e incubadas a 37 °C \pm 2°C por un período de 12-14 días, para lograr obtener colonias maduras pigmentadas de negro. Las placas de cultivo con Agar TSVB fueron cultivadas en ambiente microaerofílico (5% de Dioxido de Carbono) por 2 a 5 días a 37°C \pm 2°C.

Identificación y cuantificación

Una vez obtenido los cultivos en agar sangre inespecífico y TSVB fueron observados bajo microscopio estereoscópico donde se realizó identificación y cuantificación de colonias pigmentadas de negro (*P. gingivalis*, *Prevotella spp.*) en

agar sangre hemina-menadiona e identificación y cuantificación de colonias con estructura interna similar a estrella (*Aggregatibacter Actinomycentencomintas*) en agar TSBV. El recuento de UFC totales se realizó en agar sangre hemina-menadiona (Figura 8).



Figura 8. Cultivo inespecífico luego de 14 días en Agar sangre hemina-menadiona.

Cultivo selectivo

Posteriormente se seleccionaron 16 colonias pigmentadas de negro por muestra y se cultivaron selectivamente en placas de agar base N° 2 (Oxoid CM0271) no específico con 5% sangre de caballo defibrinada, 1 mg/L hemina y 0.5 mg/L menadiona, dividiendo la placa de agar en 8 partes iguales (biscochos). Las colonias de *Aggregatibacter Actinomycentencomitans* se cultivaron nuevamente en TSVB para aumentar el N° de colonias. Este procedimiento fue realizado bajo la llama de un mechero Bunsten para evitar contaminación y con asas de plástico desechables por colonia o metálica calentada al rojo luego de cada el cultivo de cada colonia. Las placas de agar sangre hemina-menadiona fueron colocadas en cámaras de

anaerobiosis con sobres generadores de gas ,80% Nitrógeno, 10% Dióxido de Carbono y 10 % de Hidrógeno (*Genbox anaer, anaerobic atmosfere generators*, REF 96 124, Biomerieux) a 37°C +- 2°C por 7 a 14 días y las placas de agar TSVB colocadas ambiente microaerofílico (5% de Dioxido de Carbono) por 2 a 5 días a 37°C +- 2°C (Figura 9).



Figura 9. Muestra 3 placas de Agar sangre hemina-menadiona con cultivos selectivos de colonias pigmentadas de negro extraídas de distintas muestras clínicas

Identificación fenotípica

Parte de las colonias pigmentadas de negro cultivadas selectivamente se las seleccionó y colocó en un tubo de ensayo alicuotados con 1 ml de metanol para prueba de fluorescencia a la luz U.V. (360 nm), se les aplicó un vortex de 30 segundos por colonia para obtener una solución homogénea, posteriormente se observó bajo obscuridad la fluorescencia de las colonias bajo la estimulación a luz ultravioleta, identificando *P.gingivalis* por no generar fluorescencia y *Prevotella spp.* por producir fluorescencia la estimulación con UV, las colonias fueron comparadas con la cepa control de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 49417 (Figura 10) la cual emitió fluorescencia roja (Figura 11). Las colonias con características de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* fueron identificadas mediante reacción positiva a la catalasa.

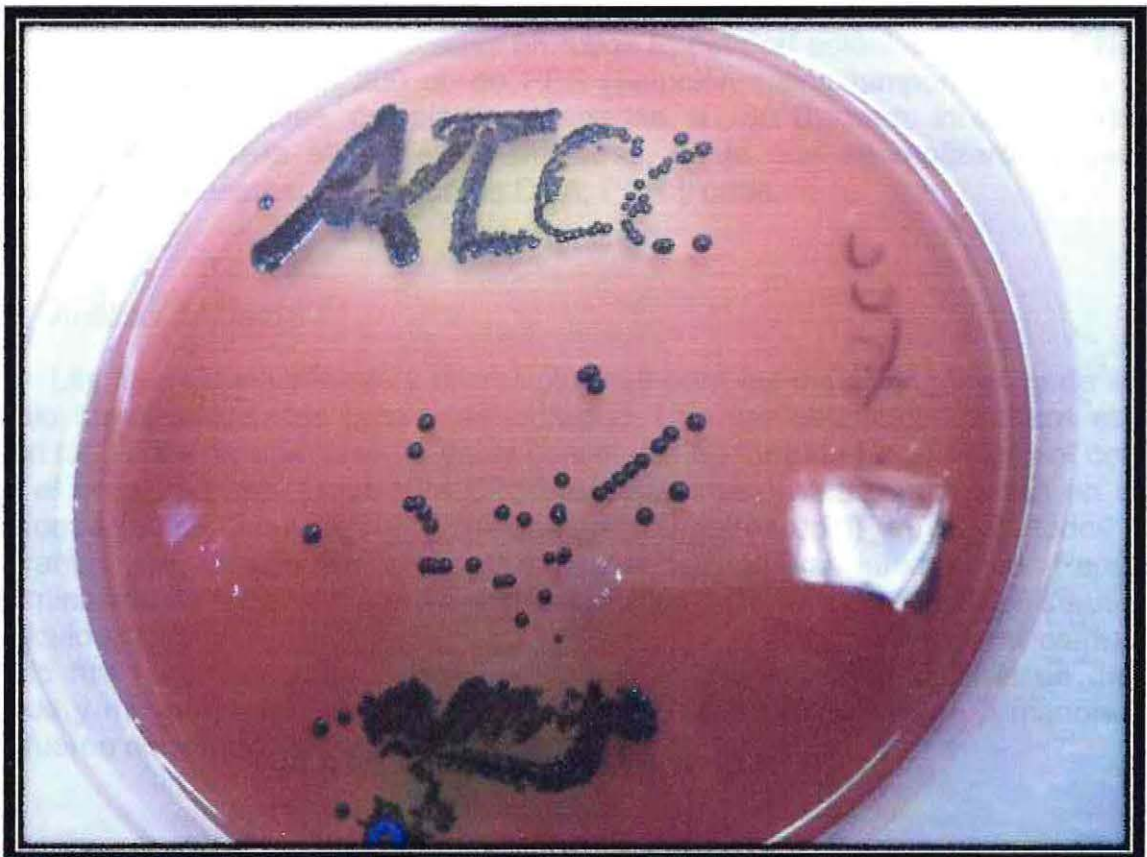


Figura 10. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 49417. Cepa control.

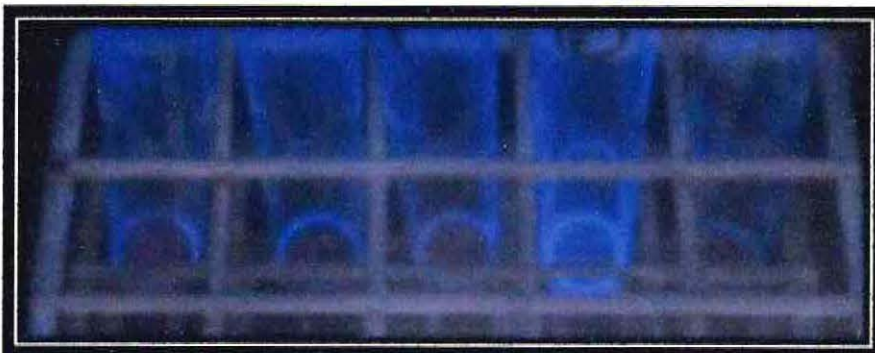


Figura 11. 3 colonias pigmentadas de negro cultivadas selectivamente en 1 ml de metanol a la izquierda, junto a un tubo control con metanol y finalmente la cepa control para *Porphyromonas gingivalis* ATCC 49417.

Almacenamiento para pruebas moleculares posteriores

Otra parte de las colonias cultivadas selectivamente fueron recolectadas con asas de plástico estériles y colocadas en tubos Eppendorf estériles libres de DNasa y RNasa, alicuotados con 200 μ l. de PBS (Solución salina tamponada), para ser almacenados en gradas de plástico cerradas a -80°C , para inhibir actividad enzimática que pueda alterar a las muestras, hasta que se realizaron pruebas moleculares posteriores: extracción de DNA, PCR y otras.

Análisis de Datos

Las mediciones clínicas y microbiológicas para las especies, objetivo de este estudio fueron calculadas para cada individuo. Una vez obtenidos los datos estos fueron tabulados en una base de datos constituida en formato Excel (Microsoft corp.) y en el programa estadístico IBM SPSS Statistic versión 8.0 y guardados en una plataforma virtual Dropbox (www.dropbox.com, Dropbox, Inc.) en donde todos los integrantes del estudio tenían acceso a leer y modificar información. Para la determinación de tamaño muestral de 100 colonias para cultivos selectivos se utilizó el cálculo ofrecido por www.netquest.com (Netquest Softwares, Netquest corp.), el cálculo fue realizado con un nivel de error de 5%(0,05). Para análisis de datos clínicos y microbiológicos se utilizó prueba de T-Student, valores de p menores a 0,05 fueron considerados significantes.

Resultados

I.- Pacientes

Solo 11 pacientes cumplieron con todos los criterios de inclusión y exclusión, todos los pacientes examinados estuvieron en un rango etario entre los 18 y 35 años de edad con al menos 1 tercer molar presentes en semi inclusión y con un máximo de 4 terceros en boca y con 2 en semi inclusión. De los cuales 10 presentaba signos evidentes de inflamación del saco pericoronario al momento del examen y 1 con signos leves, de acuerdo a los criterios acordados previo al examen. Todos los pacientes presentaban como máximo un valor de 1 en el código CPITN, correspondiendo a 6 códigos 1 y a 4 códigos 0. Cuatro de los siete terceros molares muestreados corresponden a dientes 3,8, dos corresponden a dientes 4,8 y uno a un diente 1,8. Solamente 4 pacientes portaban en sus fichas a lo menos 1 radiografía al momento del examen y los otros 3 no la presentaban, pero para fines del estudio este examen no era de importancia imprescindible. Los datos clínicos individuales de cada paciente se resumen en tabla II y figura 12.

Paciente	Edad	N° 3s Mol.	3s Mol. SE	CPITN	Sign. Inf	Rx	N° de Muest
1	18	4	2	0	Si	no	1
2	23	1	1	1	Si	Rx	1
3	22	2	2	1	Si	Rx	1
4	30	4	2	1	Si	Rx	1
5	25	2	1	1	Si	no	1
6	30	2	2	0	leve	no	1
7	18	3	2	0	Si	Rx	1
8	18	4	2	0	Si	Rx	1
9	20	2	2	1	Si	no	1
10	21	1	1	1	Si	Rx	1
11	18	4	2	0	Si	no	1
Media	22,0909091						
Devest	4,5487261						

Tabla II. Muestra los datos clínicos recopilados al examen por paciente.

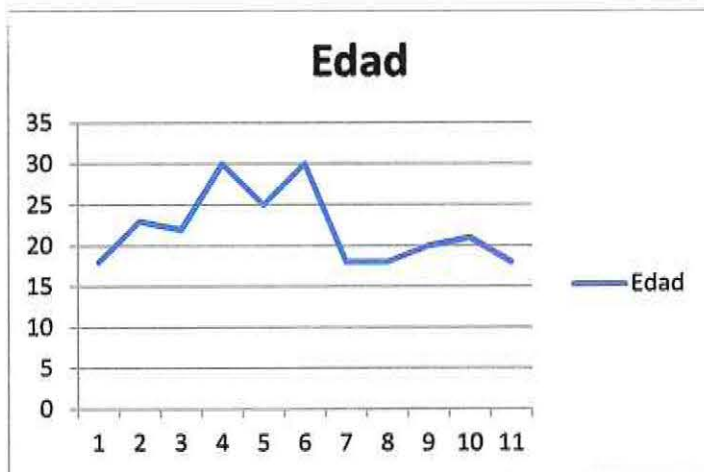


Figura 12, muestra las edades de los pacientes.

II.- Cultivo inespecífico

Posterior a 14 días de cultivo inespecífico los UFC totales fueron contados encontrándose UFC pigmentadas de negro en 10 de los 11 pacientes examinados, estando ausente en aquel paciente que presentaba signos inflamatorios leves. Luego de realizar el conteo de UFC se encontró un total de UFC pigmentados de negro y un total final de UFC (tabla 3). Los datos fueron analizados de acuerdo a las diluciones realizadas estableciéndose los siguientes valores totales señalados en la tabla III. Cultivos por muestra en tabla IV.

Paciente	UFC ml RTF	UFC N ml RTF	% P. Negro
1	13000000	4560000	35,307
2	26000000	14480000	55,69
3	60000000	8700000	14,5
4	55100000	18250000	33,12
5	55800000	22600000	40,501
6	35000000	0	0%
7	68900000	9700000	14,11
8	54000000	11000000	20,37
9	63000000	20400000	32,3
10	58700000	13000000	22,15
11	45300000	9000000	19,87
Total	534800000	131690000	
Devest	17171593,88	6742831,48	15,17
Media	48618181,82	11971818,18	26,1743

Tabla III. Resultados de cultivos inespecificos.

Paciente	RTF 1 ml.	Cult. Ashm	Cult TSBV	Ashm (días)	TSBV (días)
1	1	2	2	14	5
2	1	2	2	14	5
3	1	2	2	14	5
4	1	2	2	14	5
5	1	2	2	14	5
6	1	2	2	14	5
7	1	2	2	14	5
8	1	2	2	14	5
9	1	2	2	14	5
10	1	2	2	14	5
11	1	2	2	14	5
Total	11	22	22		

Tabla IV. Cultivos realizados por muestra. Ashm: agar sangre hemina-menadiona; TSBV: agar triptona de soya, bacitracina y vancomicina

El recuento final de los 11 pacientes de UFC/ml fue de 534800000 con una media de 17171593,88 (SD +- 48618181,82), de los cuales un total de 131690000 UFC/ml pigmentadas de negro representando en promedio un 26,1743% (SD +- 15,17) del recuento total. Los recuentos totales de UFC/ml RTF se encontraron en un rango de 13000000-68900000 como valores mínimos y máximos (SD +- 17171593,88) y los recuentos de UFC/ml RTF de Pigmentados de negro en un rango de 0-22600000 (SD +- 6742831,48). Es de destacar que en la única muestra que no se encontró UFC pigmentadas de negro correspondió a la muestra número 6, aquel paciente que presentaba signos clínicos de inflamación leve. Información graficada en Figura 13 y Figura 14.

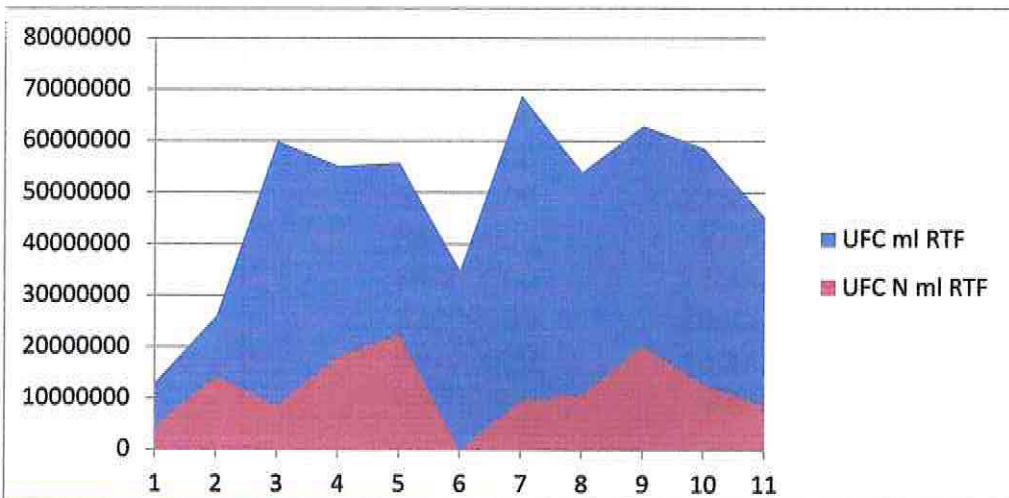


Figura 13. En azul UFC ml RTF totales por pacientes y en rojo UFC ml pigmentadas de negro.

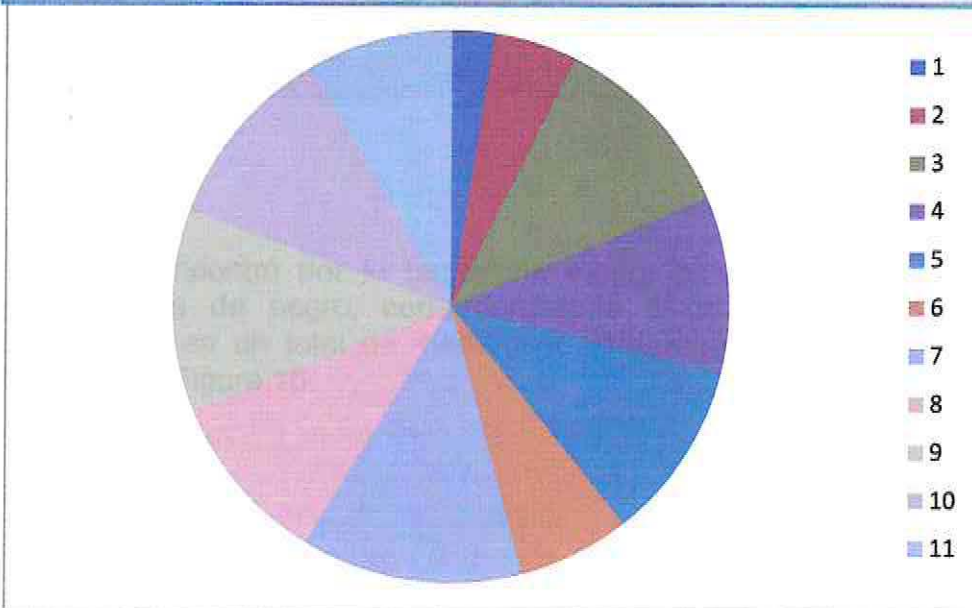


Figura 14. UFC ml totales por pacientes.

Análisis de datos de pacientes sin considerar paciente 6 (Signos inflamatorios leves)

Debido a que el paciente N°6 no cumplió con los criterios diagnósticos completos y a que sus resultados se alejaron de la media de los demás pacientes realizaremos un análisis de datos sin considerarlo. (Tabla V)

Paciente	UFC ml RTF	UFC N ml RTF	P. Negro %
1	13000000	4560000	35,307
2	26000000	14480000	55,69
3	60000000	8700000	14,5
4	55100000	18250000	33,12
5	55800000	22600000	40,501
6	68900000	9700000	14,11
7	54000000	11000000	20,37
8	63000000	20400000	32,3
9	58700000	13000000	22,15
10	45300000	9000000	19,87
Total	499800000	131690000	
Media	49980000	13169000	28,7918
Devest	17463091,24	5744571,254	13,11723496

Tabla V. Resultado de cultivo inespecífico de pacientes con pericoronaritis, sin considerar al paciente N°6

Se encontró por lo tanto una media de 28,7918% (+- 13,12) de UFC/ml pigmentadas de negro, correspondiendo a un total de 131690000 (4560000-20400000), en un total de 499800000 (13000000-68900000). Datos graficado en Figura 15 y Figura 16.

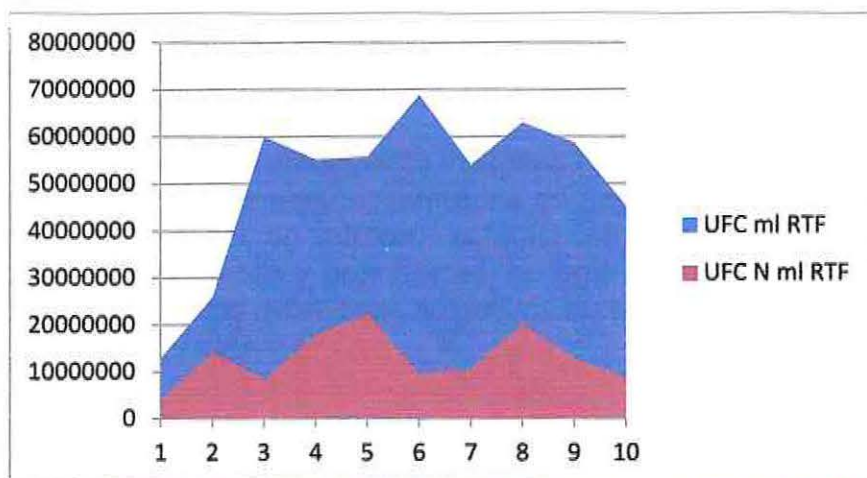


Figura 15. En azul UFC ml RTF totales y en rojo UFC ml RTF pigmentados de negro. Sin considerar paciente con inf. leve

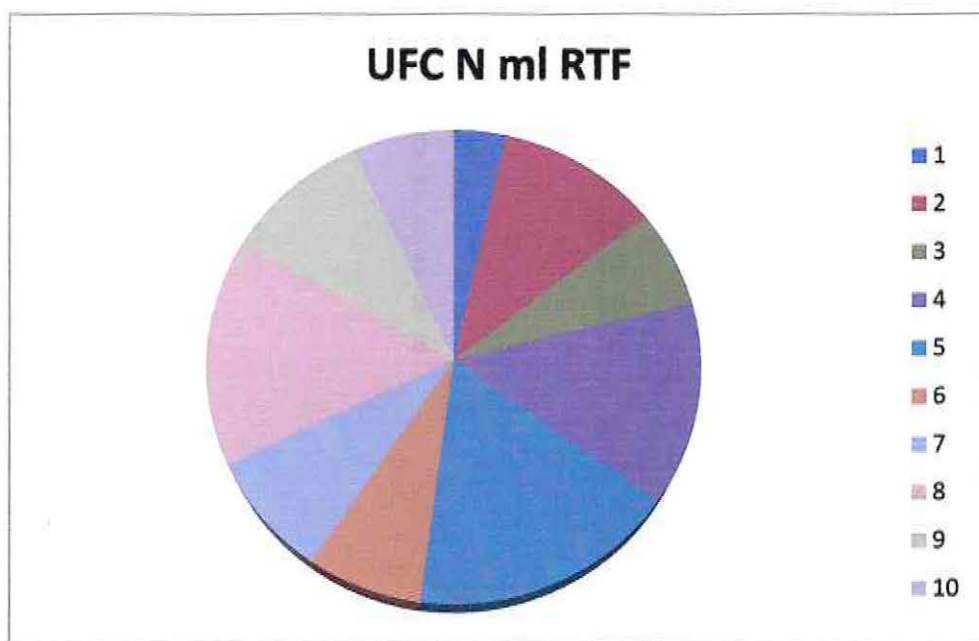


Figura 16. UFC ml RTF pigmentados de negro por pacientes.

En Figura 16 se muestra el tamaño de UFC/ml RTF pigmentada de negro por muestra en relación al total de UFC/ml RTF, donde la muestra número 5 presenta el mayor crecimiento de UFC pigmentadas de negro y la muestra 1 la menor cantidad de UFC/ml RTF pigmentadas de negro.

III.- Cultivo selectivo.

Posterior al crecimiento inespecífico de las muestras de biofilm subgingival, se seleccionaron colonias pigmentadas de negro para cultivarlas selectivamente con el objetivo de tener un número, estadísticamente significativo, de UFC para realizar pruebas fenotípicas y genotípicas, en agar sangre hemina-menadiona dividido en 8 biscochos. Datos de cultivos selectivos en tabla VI. Datos en Figura 17.

Paciente	Cult Ashm	N° col por Ashm	Tot Col Cult	Crec. Pos N	Crec. Pos Co	Crec. Negat
1	2	8	16	7	0	9
2	2	8	16	8	0	8
3	0	0	16	8	0	8
4	2	8	16	7	1	8
5	2	8	16	16	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	2	8	16	12	2	2
8	2	8	16	7	1	8
9	2	8	16	16	0	0
10	2	8	16	7	1	8
11	2	8	16	12	3	1
Total			160	100	8	52
% Cre.				62,5	5	32,5
Media				9,090909091	0,727272727	4,727272727
Devest				4,635828846	1,009049958	4,002272082

Tabla VI. Cultivos selectivos por pacientes.

Se cultivaron en total 160 colonias pigmentadas de negro 16 por cada paciente a excepción del paciente N° 6 al cual no se cultivaron colonias, reduciendo el universo a 10 pacientes, de los cuales crecieron positivamente 108 (100 colonias pigmentadas de negro y 8 sin pigmentación consideradas como contaminación inhibitoria de crecimiento de colonias pigmentadas de negro) y 52 biscochos no fueron positivo para el crecimiento. De las 100 colonias pigmentadas de negro por pacientes crecieron en promedio 9,09 % (+- 4,6358) y de las 8 con crecimiento positivo no pigmentadas de negro por pacientes crecieron en promedio 0,73 % (+- 1,009)

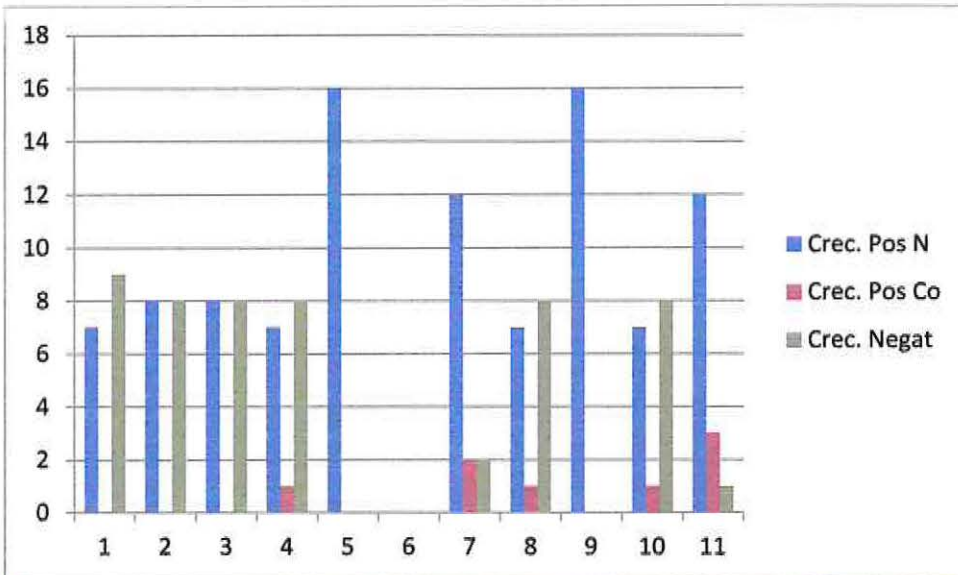


Figura 17. Resultados de los cultivos selectivos de UFC pigmentadas de negro.

IV.- Identificación fenotípica

Una vez obtenido los cultivos selectivos positivos para pigmentados de negro, se realizó la prueba de identificación fenotípica de fluorescencia a la luz U.V. (360nm.) en metanol (CH₃), para aumentar la fluorescencia de las especies que la emitan. Considerando fluorescencia positiva para *Prevotella spp.* y fluorescencia negativa para *Porphyromonas gingivalis* (Figura 18). Los resultados se grafican en la tabla VII.

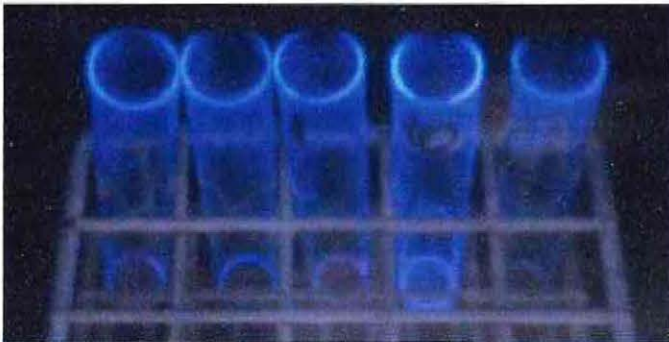


Figura 18. Se observa de derecha a izquierda 3 tubos con colonias pigmentadas de negro de muestras clínicas sumergidas en 1 ml de CH₃, 1 tubo de CH₃ puro, 1 tubo de cepa control *Porphyromonas gingivalis* ATCC, todo bajo luz U.V. (360 nm)

Paciente	Crec. Pos N	Crec. Pos		Crec. Negat	F. Pos	F. Neg
		Co				
1	7	0		9	3	4
2	8	0		8	4	4
3	8	0		8	4	4
4	7	1		8	4	3
5	16	0		0	13	3
6	0	0		0	0	0
7	12	2		2	4	8
8	7	1		8	3	4
9	16	0		0	13	3
10	7	1		8	3	4
11	12	3		1	4	8
Total	100	8		52	55	45
% PN	62,5			160		100
% CN	5					
% NP	32,5					
Media	9,090909091	0,727272727		4,727272727	5	4,09090909
Devest	4,635828846	1,009049958		4,002272082	4,12310563	2,2563043

Tabla VII. Resultados de prueba de fluorescencia de colonias pigmentadas de negro.

Los resultados de la tabla 7 muestran que de las 100 colonias pigmentadas de negro 55 presentaron fluorescencia positiva color rojo ladrillo, compatible con *Prevotella spp.*, (media de 5 +/- 4,12) por el contrario sólo 45 (media de 4,09 +/- 2,256) presentaron fluorescencia negativa compatible con la especie bacteriana, *Porphyromonas gingivalis*. Equivalentes a un 55% y un 45% respectivamente.

VI.- Identificación final de especies pigmentadas de negro en sacos pericoronarios inflamados (Tabla VIII en Anexo IV).

Se encontró en promedio 14,49% (+- 7,212) de *Prevotella spp.* en los sacos muestreados con un rango de 30,63-7,73; en cambio, la especie bacteriana *Porphyromonas gingivalis* se encontró en promedio 11,8568 % (+- 5,899) con un rango de 25,06-6,34. Datos graficados en Figura 19, 20 y 21.

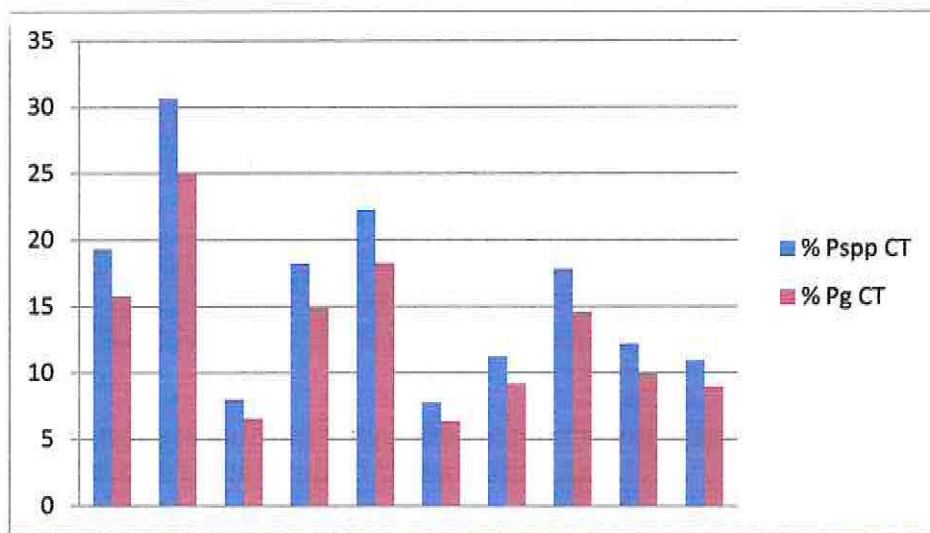


Figura 19. Porcentaje de *Porphyromonas gingivalis* en rojo en ml de RTF por pacientes y especies de *Prevotella* en azul en ml RTF por pacientes

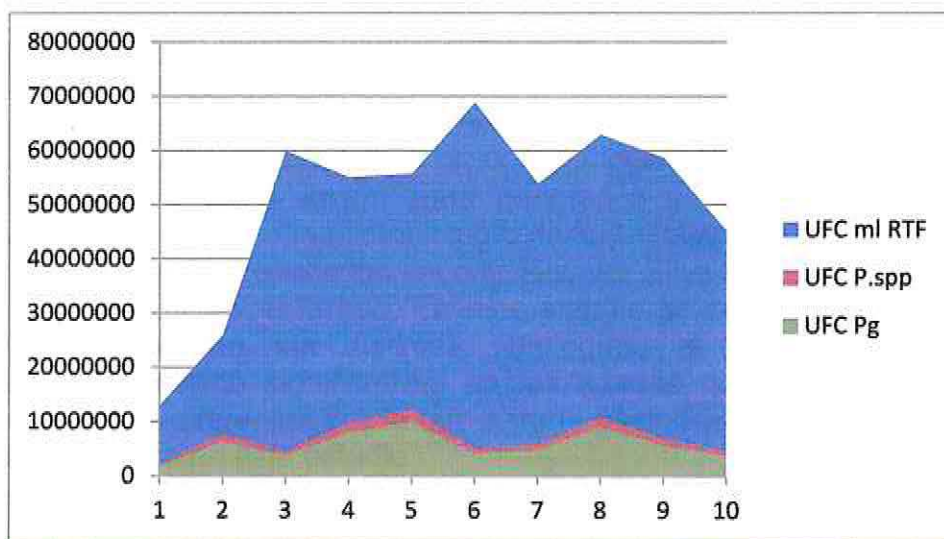


Figura 20. UFC ml RTF total por pacientes en azul, UFC ml RTF de *Porphyromonas gingivalis* en verde por pacientes, UFC ml RTF de especies de *Prevotella* en rojo.

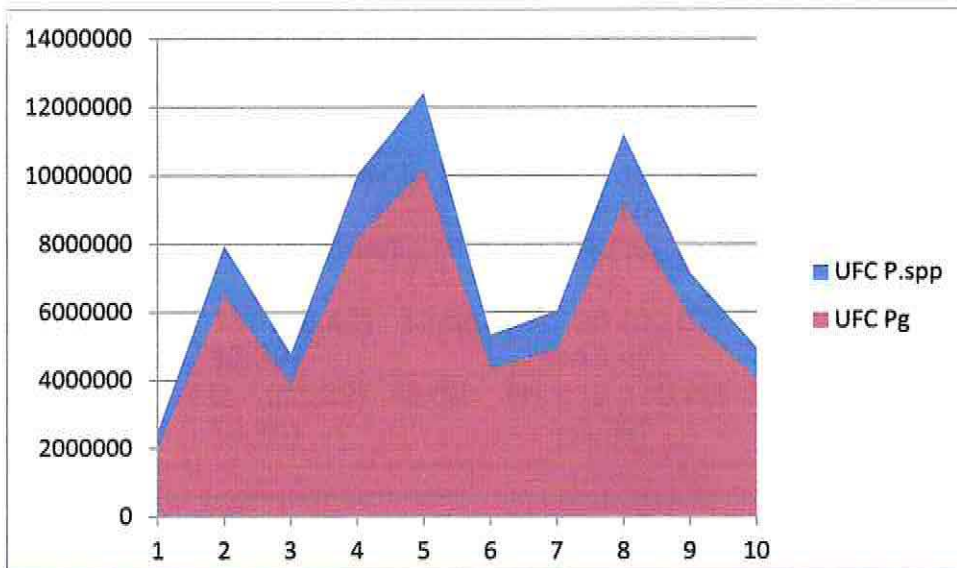


Figura 21. Recuento total de UFC/ml de RTF por pacientes de *Porphyromonas gingivalis* en rojo y especies de *Prevotella* en azul.

VII.- Análisis comparativo de poblaciones bacterianas en hábitat similares en condiciones epidemiológicas igualadas.

Para realizar un análisis comparativo de proporciones bacterianas se tomó como referencia el estudio realizado por Silva et al., (2005) en el cual se reportó las prevalencias y proporciones bacterianas para, periodontitis crónica (CP), periodontitis agresiva localizada (AgLP) y periodontitis agresiva generalizada (AgGP). Este estudio fue seleccionado por: (i) ser uno de los pocos estudios microbiológicos de la flora bacteriana periodontal existentes en Chile, (ii) presentar una metodología de estudio similar a la utilizada en este estudio, (iii) imposibilidad de utilizar estudios realizados en otras áreas geográficas debido a que las proporciones bacterianas varían según zona geográfica y (iv) no existir actualmente ningún estudio en Chile de la microbiología periodontal en sacos pericoronarios. En tabla IX se muestran los resultados encontrados por Silva et al., (2005) para *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella spp.* En este estudio se comparó entre las cuantificaciones encontradas en las distintas patologías, a pesar de encontrar diferencias estadísticamente significativas en las edades de los pacientes y tener tamaños muestrales diferentes por lo que abre la posibilidad de comparar con los resultados encontrados en este estudio.

	Peridontitis Crónica (CP) (n: 17)		Periodontitis Agresiva localizada (AgLP) (n: 30)		Periodontitis Agresiva generalizada (AgGP) (n:6)	
	% del recuento total de UFC	media (SD +/-)	% del recuento total de UFC	media (SD +/-)	% del recuento total de UFC	media (SD +/-)
Bacteria	N (%)		N (%)		N (%)	
<i>P. gingivalis</i>	13 (76,47)	13,65 (+- 13,39)	26 (86,67)	12,19 (+- 15,47)	6 (100)	17,2 (+- 10)
<i>Prevotella spp.</i>	6 (35,29)	9,62 (+- 18,26)	12 (40,00)	2,12 (+- 3,79)	1 (16,66)	0,86 (+- 1,86)

Tabla IX. Datos de prevalencia de detección y proporciones de *Prevotella spp.* y *Porphyromonas gingivalis*, datos extraídos de Silva et al., (2005). PC, periodontitis crónica, AgLP, periodontitis agresiva localizada y AgGP, periodontitis agresiva generalizada.

Análisis estadístico resultados de Tabla VIII

Se realizó un análisis estadístico de las proporciones bacterianas para las especies en los 10 sacos pericoronarios con inflamación, excluyendo la muestra del paciente N°6, como medida de evitar distorsiones en el análisis estadístico.

Al comparar las proporciones de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella spp.*, se encontró una diferencia no significativa entre la proporción de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella spp* en sacos pericoronarios inflamados y la encontrada en periodontitis crónica (T- Student p de 0,69 para *Porphyromonas gingivalis* y p de 0,4301). No se encontró una diferencia estadísticamente significativo entre las proporciones de *Porphyromonas gingivalis* encontradas en AgLP y sacos pericoronarios inflamados (T Student p de 0,944), pero si se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones bacterianas encontradas en AgLP y sacos pericoronarios inflamados para *Prevotella spp.*(T Student p de 0,0001), al comparar los resultados de sacos pericoronarios inflamados con los encontrados en AgGP se encontró una diferencia estadísticamente significativa para las proporciones de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella spp.* (T-Student p de 0,0008 para *Prevotella ssp* y p de 0,0001 para *Porphyromonas gingivalis*).

Discusión.

I.- Estudio

Correspondió a un estudio descriptivo de corte transversal, en el cual se detectó y cuantificó la presencia de especies pigmentadas de negro mediante técnicas de cultivo y pruebas de identificación fenotípicas para *Aggregatibacter Actinomycentecomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella spp.*

II.- Métodos de estudio de especies bacterianas periodontopatogénicas utilizadas

Actualmente existen pocos estudios en Chile, que investiguen la microbiología presente en la cavidad oral tanto en condiciones de salud como en condiciones de enfermedad. Esto debido a lo dificultoso y costoso de las técnicas de estudio. En este contexto, es que se hace aún más difícil el estudio de especies bacterianas periodontopatogénicas. En la actualidad el "gold standard" de cualquier investigación científica en microbiología, sigue siendo la utilización de cultivos bacterianos, ya sea como método principal o como complementario-comparativo a otras técnicas diferentes.

Cultivar especies bacterianas periodontopatogénicas, es de particular dificultad, debido a ser especies de crecimiento fastidioso con altos requerimientos nutricionales, ambientales y ser por lo general especies de anaerobiosis estricta. Así su estudio se complica por el costo asociado en comparación con otras especies bacterianas y por el estricto rigor metodológico que se debe seguir para obtener resultados fidedignos. A pesar de todo, dentro de sus ventajas, este método sigue siendo de bajo costo y de fácil implementación, comparado con otras técnicas de estudio microbiológico, por ejemplo: sondas de DNA o PCR, permite una rápida detección y cuantificación de las especies estudiadas, posibilita la detección de nuevas especies bacterianas y además permite probar susceptibilidad bacteriana a diferentes antimicrobianos. A pesar de esto, presenta desventajas importantes: poca sensibilidad ante cargas bacterianas de pequeño tamaño, dificultad para la identificación exacta de las especies bacterianas en estudio, cuantificación bacteriana de baja calidad, rigurosidad de la técnica, facilidad de contaminación y en algunos casos largos periodos de incubación (Sanz et al., 2004).

En este estudio hemos decidido utilizar la técnica de cultivo microbiológico, complementado con técnicas rápidas de confirmación diagnóstica para especies periodontopatogénicas, ya que nos permitió un primer acercamiento a la microbiología existente en los sacos pericoronarios, posibilitando encontrar especies nuevas, realizar un conteo total de UFC por muestra e identificar cuantitativa y cualitativamente las especies bacterianas en estudio, además de ser una metodología económicamente más asequible.

Un aspecto metodológico importante de señalar es la técnica de recolección de biofilm subgingival. Todos los estudios revisados utilizaron conos de papel para la

toma de muestra, método que implica un error al momento de estudiar estos sacos, ya que esta técnica fue ideada para el estudio de los sacos periodontales, sacos de acceso angosto y de fondo en filo de cuchillo, en cambio los sacos pericoronarios son sacos de entrada amplia, que abarcan muchas veces $\frac{1}{2}$ o $\frac{3}{4}$ de la corona, por lo que esta metodología no es aplicable para estos sacos ya que no abarca completamente todo el biofilm presente, sesgando la muestra en composición. En este estudio la metodología empleada fue la de recolección de biofilm mediante curetas (Hu-Friedy), de esta manera se logró obtener muestras que abarcaran todas las zonas del saco pericoronario, sin sesgar las muestras.

Cabe destacar que la implementación de la técnica de cultivo utilizada en esta tesis, se debió realizar en el laboratorio de microbiología bucal de la facultad de Odontología de la Universidad de Chile, debido a que actualmente no se encuentran las condiciones adecuadas en nuestra Universidad para realizarlo.

III.- Edad de los pacientes

Medida	Periodont, C. (n:17)	Perio. AgL. (n:30)	Periodont AgG. (n:6)
Edad	47,29 +- 7,48	24,39 +- 3,77	29,5 +- 6,12

Tabla X. Datos extraídos de: " *Prevalence of Periodontopathic Bacteria in Aggressive Periodontitis Patients in a Chilean Population*" (Silva y cols., 2005)

Al comparar la edad de los pacientes muestreados en este estudio con los utilizados por Silva et al., (2005) (Tabla 10), se encontró una diferencia significativa ($p > 0,05$) con las edades de los pacientes con CP y con AgGP, pero no se encontró una diferencia significativa entre las edades de los pacientes con AgLP. Si bien estos resultados podrían ser útiles en la comparación de el tiempo de colonización bacteriana es los sitios muestreados, estos resultados no son del todo posibles debido a que las edades eruptivas son diferentes para los distintos dientes alterando los períodos de colonización bacteriana. De todas formas estandariza en cierta medida los resultados ante otras variables no alteradas por las edades de erupción.

En cierta medida estos resultados pueden explicar que si bien las proporciones bacterianas encontradas en los sacos pericoronarios no varían significativamente con los de la CP, pero sí respecto a la AgLP y AgGP, estas diferencias ayudarían a explicar las diferencias en la expresión de la enfermedad encontrada en los sacos pericoronarios y los sacos periodontales de AgLP y AgGP. En la CP, probablemente por el tiempo en que la enfermedad ha estado presente, en comparación con la pericoronaritis y en la AgLP y AgGP por la presencia significativamente mayor de PG, aún así, es necesario estudios exhaustivos sobre los mediadores proinflamatorios presentes en la pericoronaritis para poder

establecer una teoría completa de la expresión fenotípica de la patología dada por las características propias de las especies predominantes y la expresión de sus factores de virulencia y por la respuesta inmune inflamatoria específica del hospedero a la noxa bacteriana presente. Estos resultados solo sirven como una primera aproximación.

IV.- Consideraciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas de los sacos pericoronarios.

Anatómicamente un saco pericoronario corresponde a una cavidad virtual, comprendida entre tejido duro, esmalte de la corona de un diente y una cubierta de tejido blando compuesto de periodonto de protección (capuchón pericoronario), esta anatomía solo es posible de encontrar nuevamente en el cuerpo humano en los sacos periodontales. Ambos presentan una profundización del espacio presente pero los sacos periodontales se producen por una alteración al metabolismo óseo, en donde, predomina la actividad osteoclástica (RANKL) y destructiva (MMP-8 y 13) (Hernández et cols., 2011) de los tejidos periodontales blandos, inducida por una noxa bacteriana (factores de virulencia), de especies encontradas en el biofilm subgingival, en cambio, en los sacos pericoronarios la profundidad del saco, se encuentra dada por una mala posición eruptiva que genera un capuchón de tejido blando formando un saco con fondo ciego, actualmente no existen estudios exhaustivos que investiguen la fisiología y fisiopatología de los tejidos pericoronarios por lo que no se puede determinar cuáles factores proinflamatorios se encuentran presentes, en qué cantidad y por lo tanto que actividad metabólica se encuentra predominante en estos sacos y que diferencia existe entre la manifestación clínica de las patologías asociadas a estos sacos y los sacos periodontales, asociada a la expresión fenotípica de mediadores proinflamatorios.

V.- Especies periodontopatogénicas

A pesar de la existencia de pocos estudios sobre la biología de los sacos pericoronarios, existen actualmente una pequeña cantidad de estudios microbiológicos de estos sacos, en los cuales han indentificado a con alta frecuencia especies de *prevotella* (Sixou et al., 2003 y Rajasuo et al., 2007) considerándola como uno de los patógenos principales, estos resultados se condicen con los encontrado en este estudio, diferenciando significativamente (p valores $<0,05$) la proporción de *prevotella spp.* en sacos pericoronario de pacientes chilenos comparado con las proporciones bacterianas de esta especie en AgPL y AgGp, además se ha encontrado con alta frecuencia especies de *Capnocytophaga*,

considerándolas como otros patógenos putativos. En cuanto a la presencia de *Porphyromonas gingivalis*, los resultados son contradictorios, desde prácticamente no ser detectada 2,9 % de las muestras (Sixou et al., 2003) a ser detectada en todas las muestras (Loug et al., 1993), a pesar de esta amplia variedad de resultados, en pacientes chilenos hemos encontrado proporciones bacterianas de *Porphyromonas gingivalis*(PG) similares a las encontradas en pacientes con CP en la misma población, pero con diferencias significativas (p valor $< 0,05$) en comparación con AgLP y AgCP (Silva et al., 2005), en donde, la presencia de esta bacteria es significativamente mayor. Estos resultados pueden explicar la diferencia en la expresión de las diferentes patologías, encontrada al comparar ambas. Un estudio realizado por Mombelli, (2000) encontró una asociación significativa entre la presencia de PG en altas proporciones y sitios con profundidades mayores de sondaje, por otra parte Socransky y Hafagee (2005), encontró una mayor cantidad de PG en sitios con sondaje periodontal mayor a 5 mm. Es posible inferir, por lo tanto, que una causa posible de la diferencia de la expresión de la enfermedad encontrada en estas patologías sea por la diferencia en la cantidad de PG presente. En el mismo estudio Mombelli (2000) basándose en un modelo de regresión de multivariantes, señaló una asociación significativa entre sangrado al sondaje (índice hemorrágico) y la presencia de *prevotella intermedia/nigrescens*, es decir, su presencia está asociada a inflamación, así los resultados encontrados por este estudio y otros sobre la presencia de esta especie afirman que su presencia puede ser la causante de la inflamación en los sacos pericoronarios.

Ahora bien, si la mayoría de los estudios (Sixou et al., 2003; Rajasuo et al., 2007 y Rajasuo et al., 2004), incluyendo éste, confirman una diferencia en la composición del biofilm presente (aún cuando algunos presenten errores metodológicos en la técnica de muestra), en términos cuantitativos, es importante entender el por qué. Para esto debemos enfocar el estudio en la composición temporal del biofilm subgingival (Figura 22), este se origina por una colonización primaria de especies de cocos gram positivos, los denominados colonizadores *primarios* o *pioneros*, estas especies se adhieren en pocos segundos a la superficie dura (fase I), luego viene la fase de crecimiento exponencial, en donde estas bacterias se reproducen aprovechando las condiciones favorables del medio, con abundancia de nutrientes y espacio suficiente, al crecer en cantidad establecen relaciones entre ellas, y comienzan a reclutar otras especies, esta fase (fase II) corresponde a la fase de mayor crecimiento, hasta que el biofilm llega a la fase III, en donde el biofilm se expresa completamente, existen los mejores mecanismos de intercambio y flujo de nutrientes, expresión de nuevos factores de virulencia y mejoramiento del intercambio genético interespecies, finalmente entra a la fase IV de muerte celular, erosión y pérdida de adherencia. Como se observa en la Figura 22.

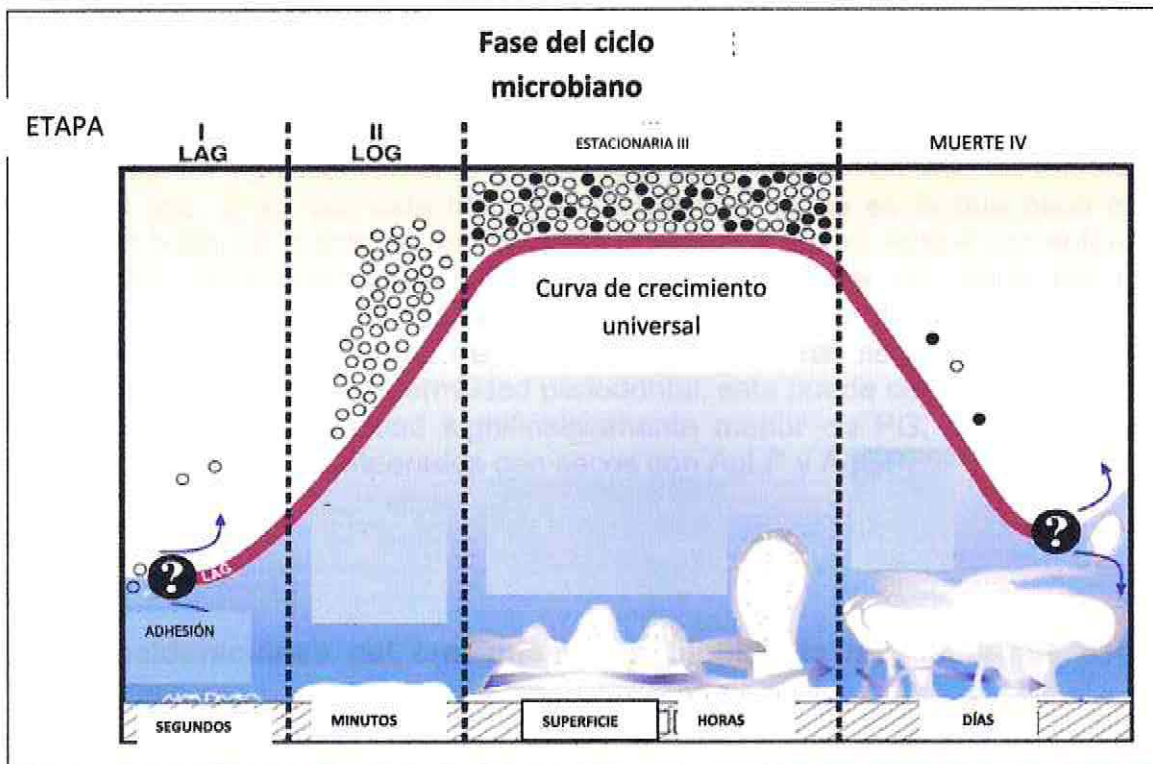


Figura 22. Muestra la formación del biofilm sugingival. Análisis temporal. Foto extraída y adaptada de Thomas & Nakaishi, (2006)

A nivel de biofilm subgingival las especies de *Prevotella* y *Porphyromonas gingivalls*, son considerados colonizadores secundarios, es decir, solo los encontramos en un biofilm maduro bien establecido (Thomas & Nakaishi, 2006). Los resultados encontrados en nuestro estudio señalan que puede existir biofilms bien establecidos bajo los capuchones pericoronarios, pero que su composición varía cuantitativamente en comparación al estudio previo de Silva et al., 2005. Topográficamente se ha establecido que las *Prevotella spp.* colonizan primariamente el biofilm subgingival, a pesar de que actualmente esta estricta división ha sido rebatida por una concepción más genérica de colonizadores secundarios y primarios. Como está bien establecido es raro encontrar en grandes cantidades colonizadores secundarios perteneciente al complejo rojo en sacos de una profundidad menor de 5 mm. Para que se produzca un saco periodontal con estas características muchas veces son necesarios años de pérdida de inserción clínica,

tiempo que permite una colonización progresiva de especies según las condiciones ambientales presentes en ese momento en estos sacos que favorezcan su crecimiento.

Esta progresión de eventos no sucede en los sacos pericoronarios, la profundidad del saco, se establece por motivos mecánicos y no como una respuesta inmuno inflamatoria autodestructiva, por lo en un primer momento tenemos sacos profundos en zonas difíciles de higienizar y que no han sido sometidos a noxa bacteriana alguna. Una de las posibles explicaciones de las características agudas de las patologías, es que rápidamente se pueden establecer biofilms, con características patológicas (especies Gram negativas anaerobias estrictas) en pocos días, pero así como rápidamente se establecen, las especies predominantes tienden a ser las que primero colonizan el biofilm, es por esto que encontramos una predominancia significativamente mayor de *prevotella spp.*, en vez, de especies del complejo rojo. A su vez esta misma característica aguda es la que hace que los pacientes busquen ayuda de manera más pronta que los pacientes con enfermedad periodontal, posibilitando una intervención más temprana por parte del clínico, disminuyendo la carga bacteriana y desorganizando el biofilm no dejando el crecimiento y establecimiento de especies colonizadoras secundarias, de manera más temprana que en la enfermedad periodontal, esta puede ser una de las posibles explicaciones de la cantidad significativamente menor de PG, encontrada en los sacos pericoronarios comparados con sacos con AgLP y AgGP.

VI.- Consideraciones del crecimiento en biofilm de las diferentes especies bacterianas

A pesar de que las características propias de cada especie bacteriana, codificadas en su genoma y que se evidencia mediante la expresión fenotípica, es el vivir y convivir en biofilms el que hace que estas especies varíen su comportamiento y características demostradas en un crecimiento planctónico, ya que se favorece el intercambio genético y se produce utilización de metabolitos y desechos de otras especies bacterianas. Un ejemplo de esto, es la mejor resistencia antibacteriana que presentan las especies en biofilm, la que dificulta evaluar mediante técnicas *in vitro* la resistencia bacteriana a compuestos antimicrobianos. En este sentido, podemos decir que el tomar conciencia de que las bacterias presentes bajo los sacos pericoronarios viven y conviven en biofilm, permite un mejor enfoque terapéutico, basado no solamente en la evidencia y experiencia clínica. De este modo adquiere relevancia la desorganización del biofilm como estructura, en conjunto a los agentes antibióticos específicos que pudieran ser dirigidos a las bacterias más prevalentes en este nicho ecológico

VII.- Aplicación clínica

Al igual que cualquier patología oral producida por biofilms, el objetivo principal del enfoque terapéutico es a la desorganización del biofilm y a la disminución de la carga bacteriana con niveles compatibles con la salud del hospedero, debido a que la eliminación completa de las bacterias es imposible (Thomas & Nakaishi, 2006). Actualmente no existen estudios sobre la microbiología de los sacos pericoronarios en Chile, debido a esto es que el enfoque terapéutico estaba basado en un enfoque empírico o en base a estudios realizados en otros países como Finlandia (Rajasuo et al., 1994 y 2007), actualmente es sabido que la microbiología periodontal varía de acuerdo a las distintas regiones geográficas, esto hace que estos estudios presenten un sesgo importante al momento de realizar su aplicación en países lejanos como Chile. La recomendación actual es dada por el Minsal (mejor evidencia disponible para Chile) es la de aplicar, en caso de patologías locales de los sacos pericoronarios, medidas de remoción mecánica del biofilm y guardar una terapia en base de antibióticos (amoxicilina) solo en caso de compromiso del estado general. Si bien estas medidas son correctas en cierta medida, debemos considerar, que los resultados obtenidos en esta investigación señalan una alta cantidad de anaerobios estrictos bajo los sacos pericoronarios, por lo tanto, cualquier enfoque antimicrobiano, deberá considerar la utilización de antimicrobianos efectivos contra anaerobios estrictos, es decir, indicaciones de antibióticos similares a los utilizados en casos de enfermedad periodontal. A pesar de eso en caso de compromiso local, la mejor medida considerando las bases microbiológicas de las patologías generadas en estos hábitats, es la de remoción mecánica y cambio del ecosistema presente. Clínicamente la utilización de irrigaciones con suero salino, obtendrían buenos resultados debido a que cumplirían los dos objetivos principales: (i) remoción y desorganización del biofilm, (ii) cambio de las condiciones ambientales rompiendo la anaerobiosis preexistente, variando los potenciales de oxido reducción presentes. Es esta la causa de que la pericoronaritis responda tan bien a las medidas en base a irrigaciones. De todas formas son necesarias nuevas investigaciones en seres humanos en que se estudie la efectividad de estas medidas, así, un objetivo importante de esta investigación es la de servir de soporte a futuros estudios clínico que busque la mejores alternativas posibles para el manejo de patologías asociadas a los sacos pericoronarios.

VIII.- *Prevotella spp.*

El hecho de haber encontrado especies de *Prevotella* bajo sacos pericoronarios, en cantidades importantes, hace pensar en las fuertes posibilidades que se generen casos de resistencia bacteriana, ante un enfoque terapéutico basado en la utilización solamente de amoxicilina. Se ha demostrado que tanto *Prevotella Intermedia* como *Prevotella Nigrescens*, presenta resistencia bacteriana a la amoxicilina en un 50% aproximadamente de las cepas clínicas aisladas (Luong et al., 2001), de todas formas, estos estudios no son aplicables al hábitat

microbiológico en cuestión y son necesarios nuevos estudios que aislen cepas clínicas y prueben su resistencia microbiana. Es importante, por lo tanto, recalcar que un enfoque terapéutico basado solo en la utilización de dosis sistémicas de amoxicilina, no es del todo ideal, y posiblemente genere selección bacteriana y haga que futuras terapias realizadas de esta forma sean inefectivas, desperdiciando recursos en salud.

Conclusiones

Mediante este estudio y de acuerdo al método de estudio utilizado hemos podido comprobar la existencia de especies anaeróbicas presentes en los sacos pericoronarios, dentro de las cuales destacan especies formadoras de colonias con pigmentación negra, entre los que identificamos a *Porphyromonas gingivalis* y especies de *Prevotella*, en las proporciones descritas en los resultados. Estas bacterias, conocidas por su importante rol en el desarrollo de la periodontitis, no ha sido bien establecido su participación en otras infecciones de la cavidad oral, especialmente para *Porphyromonas gingivalis*. Así podemos decir que en pacientes sanos periodontales pero con pericoronaritis se puede encontrar a esta especie bacteriana, confirmando su presencia en otros sectores que no sea solamente sacos periodontales profundo. Este hallazgo es muy importante, ya que los sacos pericoronarios pueden servir de nichos de colonización temprana de esta especie bacteriana o pueden ser sitios de invasión sistémica debido a su conocida capacidad de invadir las células epiteliales y producir bacteremia, llegando a alojarse en tejidos distantes como células endoteliales y producir noxas o acelerar el desarrollo de placas ateroscleróticas (Nakagawa y cols., 2006).

Por otro lado otros estudios han demostrado la importancia del rol patogénico de las especies de *Prevotella* en el desarrollo de pericoronaritis (Sixou y cols. 2003; Rajasuo y cols. 2007), pero hasta ahora no han se han desarrollado estudios en Chile, que evalúen a estas especies periodontopatógenas en sacos pericoronarios, representando esta tesis la primera, en hacer esta investigación en Chile.

Además este estudio nos permitió desarrollar un método de identificación y cuantificación de especies periodontopatogénicas tan importantes como la *Porphyromonas gingivalis* y especies de *Prevotella*, posibilitando de ser aplicado en cualquier otro estudio que quiera evaluar la presencia de estas bacterias en determinadas zonas anatómicas de la cavidad oral.

Finalmente hemos decidido comparar estadísticamente las proporciones encontradas de estas bacterias con otras patologías, que presentan un hábitat ecológico similar dentro de los estudios realizados en Chile (Silva y cols., 2004) debido a que es sabido que existen variaciones de las proporciones de los periodontopatógenos encontrados en las diferentes zonas geográficas del mundo (Socransky y cols., 2005).

Limitaciones

Las principales limitaciones de este estudio son:

- Tamaño muestral pequeño, debido al corto tiempo obtenido para la fase experimental, comprendido entre mayo de 2012 y julio de 2012, y los largos períodos de incubación necesarios para el cultivo de especies periodontopatogénicas.
- Utilización de cultivos microbiológicos como técnicas de identificación de las especies bacterianas en estudios, siendo una técnica poco sensible y específica, más dificultosa y fácilmente contaminable, pero muy útil al necesitar realizar una primera aproximación microbiológica.

Propuesta

- Necesidad de futuros estudios multicéntricos para determinar si las especies encontradas en este estudio son similares a las de otras regiones geográficas del país.
- Necesidad de estudios futuros que realicen aislamientos de especies bacterianas y evalúen su susceptibilidad a diferentes antimicrobianos.
- Necesidad de estudios futuros que realicen aproximaciones terapéuticas a las patologías presentes en este hábitat ecológico y que comprueben los resultados obtenidos en este estudio.
- Necesidad de futuros estudios en que se utilicen técnicas moleculares de identificación de especies bacterianas de manera más exacta que con las actuales utilizadas.

Bibliografía

Amano A; Ishimoto T; Tamagawa H; Shizukuishi S. (1992): Role of Superoxido Dismutase in resistance of *Porphyromona gingivalis* to killing by polimorphonuclear leukocytes. *Infect Immunolog.* 60: 712-414.

Amano A; Shizukuishi S; Tamanaga H; Iwakura K; Tsunawa S; Tsunemitsu A (1990): Characterization of superoxide dismutase purified from either anaerobically mantened or aerated *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol.* 172: 1457-1463.

Amano A; Shizukuishi S; Tsunemitsu A; Tsuanasawa S (1992): Identity of amino acid sequence of superoxido dismutase purified from both anaerobically mantened and aerated *Porphyromona gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 7: 368-371.

Amano A; Sojar H; Lee J; Sharma A; Levine J; Genco R (1994): Salivary receptors for recombinant fimbrillin of *Porphyromona gingivalis*. *Infect Immun.* 64: 3372-3380.

Ashimoto A; Chen C; Bakker I; Slots J (1996): Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesion. *Oral Microbiol Immunol.* 11: 266-273.

Asikainen S & Chen C (1999): Oral ecology and person to person transmission of *Actinobacillus Actinomycentecomintans* and *Porphyromona gingivalis*. *Periodontology 2000.* 9: 65-81.

Beck JD; Koch GG; Zambon JJ; Genco RJ; Tudor GE (1992): Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *Journal clin peridont.* 63: 93-99.

Belstrøm D; Holmstrup P; Damgaard C; Borch T; Skjødt MO; Bendtzen K; Nielsen C (2011): The Atherogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* Evades Circulating Phagocytes by Adhering to Erythrocyte. *Infec Immun.* 79(4): 1559-1565.

Beveridge T; Making S; Kadurugamuwa J; Li Z (1997): Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev.* 20: 291-303.

Blaser MJ; Parsonet J (1994): Parasitism by the "Slow" Bacterium *Helicobacter pylori* Leads to Altered Gastric Homeostasis and Neoplasia. *J Clinical Inv.* 19: 4-8.

Bizzarro S; Elena AN; van der Velden U; Laine ML; Loos BG (2000): Association of serum immunoglobulin G (IgG) levels against two periodontal pathogens and prothrombotic state: a clinical pilot study. *Thrombosis Journal.* 20: 8: 16.

Bodinka A; Schmidh H; Henkel B; Flemmin TF; Klaiber B; Karch H (1994): Polymerase chain reaction for identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. *Oral Microbiol Immunol.* 9: 161-165.

Boutaga K; Winkelhoff A.J; Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E; Savelkoul P.H.M (2005): Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. FEMS 45: 191-199.

Boutaga K; Winkelhoff A.J; Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E.; Savelkoul P.H.M (2003): Comparison of Real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. J Clinical Microbiol. 20: 4950-4954.

Bramanti TE & Holt SC (1990): Iron regulated outer membrane proteins in the periodontopathogenic bacterium *Bacteroides gingivalis*. Biochem Biophys Res Commun . 166: 1146-1154.

Brunner J; Scheres N; El Idrissi NB; Deng DM; Laine ML; van Winkelhoff AJ; Crielaard W(2010). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. BMC Microbiol. 11: 10-15.

Chen C & Slots J (1999): Microbiological test for *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Periodont. 2000. 20: 53-64.

Christensson LA; Fransson CL; Dunford RG; Zambron JJ (1992): Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganism in adult periodontitis. J Periodontol. 63: 418-425.

Coats SR; Berezow AB; To TT; Jain S; Bainbridge BW; Banani KP; Darveau RP (2011): The lipid A phosphate position determines differential host Toll-like receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria. Infect Immun. 79(1): 203-10.

Curtis MA; Percival R; Devine D; Darveau RP; Coats S; Rangarajan M; Tarelli E; Marsh P (2011). Temperature-dependent modulation of *Porphyromonas gingivalis* Lipid A structure and Interaction with the innate host defenses. Infect Immun. 79(3): 1187-1193.

Ellen RP & Grove DA (1989): *Bacteroides gingivalis* vesicles bind to and aggregate *Atinomyces viscosus*. Infec Immun. 57: 1618-1620.

Enersen M (2011): *Porphyromonas gingivalis*: a clonal pathogen? Inst. Oral Bio, Fac. Dent, University of Oslo, J of Oral Mic. 3: 8487.

D'Aiuto F; Parkar M; Andreou G (2004): Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. J Dent Res. 83(2):156-60.

Delbosc S; Alsac JM; Journe C; Louedec L; Castier Y; Bonnaure-Mallet; Ruimy R, Rossignol; Bouchard P; Michel JB; Meilhac O (2011): *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. PLoS one. 6(1): e18679.

Deshpande RG; Khan MB; Genco CA (1998): Invasion of aortic and heart endothelial cell by *Porphyromona gingivalis*. *Infect Immun.* 66: 5337-5343.

Demmer RT & Desvarieux M (2006): Periodontal infections and cardiovascular disease. *J American Dent Ass.* 137: 14S-19S.

Dorn BR; Dunn WA; Progulske-Fox A (1999): Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun.* 67: 5792-5798.

Ferraz CC; Henry MA; Hargreaves KM; Diogenes A (2011): Lipopolysaccharide From *Porphyromonas gingivalis* sensitizes Capsaicin-Sensitive Nociceptors. *J Endod.* Jan:37(1):45-8.

Flemming T & Nachnami S (1991): Bacteremia following subgingival irrigation and scaling and root planning. *J Periodonto.* 62: 602-607.

Fujise O; Hamachi T; Hidrofuji T; Maeda K (1995): Colorimetric microtiter plate based assay for detection and quantification of amplified *Actinobacillus actinomycetemcomitans* DNA. *Oral Microbiol Immunol.* 33: 3102-3105.

Gajardo M; Silva N; Gómez L; Leon R; Parra B; Contreras R; Gamona J (2005): Prevalence of Periodontopathic Bacteria in Aggressive Periodontitis Patients in a Chilean Population. *J Periodontol.* 76: 289-294.

Gay Escoda C; Piñera M; Velasco V; Berini L (2004): Tratado de Cirugía Bucal. Ergón. Tomo I 362-365.

Giacona MB; Papapanou PN; Lamster IB (2004): *Porphyromonas gingivalis* induces its uptake by human macrophages and promotes foam cell formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett.* 241(1):95-101.

Godoy C; Silva N; Melej N (2010): Medición de Cambios Cuantitativos de la Microbiota Subgingival Posterior a la Remoción de Placa Bacteriana Supragingival. *SPIRO.* 3: 5-10

Haapasalo M; Shah H; Gharbia S; Seddon S; Lounnatmaa K (1989): Surface properties and ultrastructure of *Porphyromona gingivalis* W50 and pleiotropic mutants. *Scand J Dent Res.* 97: 355-60

Hajishengallis G (2011): Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Biosci.* 53: 233-240.

Holt SC; Kesavalu L; Walker S; Genco CA (1999): Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* 20: 168:238.

Jervoe-Storm PM; Koltzsch M; Falk W; Dorfler A; Jepsen S (2005): Comparison of culture and real time PCR for detection of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clinical Period.* 32: 778-783.

Joe A; Murray CS; McBride BC (1994): Nucleotide sequence of a *Porphyromonas gingivalis* gene encoding a surface associated glutamate deshydrogenase and construction of a glutamate deshydrogenase-deficient isogenic mutant. Infect Immun. 62: 1358-1368.

Kennel W & Holt SC (1990): Comparative studies of the outer membranes of *Bacteroides gingivalis*, strain ATCC 33277, W50, W83, 381. Oral Microbiol Immunol. 5: 121-130.

Koga T; Nishihara T; Fujiwara T; Nisizawa T; Okahashi N; Noguchi T; Hamada S (1985): Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *E. Coli*. Infect Immun. 47: 638-642.

Kumada Ai; Matsuka Y; Mine A; Ono M; Uehara J; Sono N; Ito T; Takashiba S; Kuboki T (2012): Influence of resin coating materials on *Porphyromonas gingivalis* attachment. Dent Materials Journal 2012. 31: 86-91.

Kinder SA & Holt SC (1989): Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. Infect Immun. 57: 3425-3433.

Lamaster I; Kaluszabner-Shapira I; Herrera-Abreu M; Sinha R; Grbic J (1998): Serum IgG antibody response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. J Clinical Period. 25: 510-516.

Lau I; Sanz M; Herrera D; Morillo JM; Martín C; Silva A (2004): Quantitative real time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. J Clinical Period. 31: 1061-1069.

Lee JY; Sojar HT; Bedi GS; Genco RJ (1991). *Porphyromonas gingivalis* Fimbrillin: size, amino-terminal sequence and antigenic heterogeneity. Infect Immun. 59: 383-389.

Leung WK; Theilade E; Comfort MB; Lim PL (1993): Microbiology of pericoronal pouch in mandibular third molar pericoronaritis. Oral Microbiol Immunol. 8: 306-312.

Loung WK; Tsai J; Chen C (2001): Susceptibilities of *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* clinical isolates to amoxicillin. Anti agents and chemother. 45: 3253-3255.

Loesche WJ & Salam AS (1972): Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl microbiology. 24: 638-644.

Loesche WJ; Schork A; Terpenning MS; Chen YM; Dominguez B; Grossman N (1998): Assessing the relationship between dental disease and coronary heart disease in elderly U.S. veterans. J Am Dent Ass. 129: 301-311.

- Lopez N; Socransky S; Da Silva I; Japlint M; Haffagee A (2004): Subgingival microbiota of Chileans patients with chronic periodontitis. 75: 718-725.
- Masunaga H; Tsutae W; Oh H; Shinozuka N; Noriyoshi K; Ogata Y (2010): Use of quantitative PCR to evaluate methods of bacteria sampling in periodontal patients. J Oral Science. 52: 615-621.
- Marcotte H & Lavoie M (1998): Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. Microbiol Mol Biol Rev. 62: 71-109.
- Matilla KJ; Valle MS; Nieminen M; Huttunen JK (1995): Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary artery disease. Clin Infect Dis. 20: 588-592.
- Messas E; Li L; Batista EL; Levine RA; Amar S (2002): *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of Atherosclerosis in a Heterozygous apolipoprotein e-deficient murine model. Circulation. 105: 861-867.
- Mombelli A; Buser D; Lang NP; Berthold H (1990): Suspected periodontopathogens in erupting third molar sites of periodontally healthy individuals. J Clinical Periodontol. 17: 48-54.
- Monroe (2007): Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. Plos one. 20: 30-35.
- Mullis KB; Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-350.
- Nakao R; Hasegawa H; Ochiai K; Takashiba S; Ainai A; Ohnishi M; Watanabe H; Senpuku H (2011): Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. 6(10): e26163.
- Nakagawa I; Inaba I; Yamamura T; Kato T; Kawai S; Ooshima T; Amano A (2006). Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. Infect Immun. 30: 3773-3782.
- Nishihara T & Yoshimura F (1991): Characterisation of *Porphyromonas Gingivalis* Haemagglutinin as a protease. Biochim Biophys Acta. 178: 336-341.
- Njoroge T; Genco RJ; Sojar HT; Hamada N; Genco CA (1997): A role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. Infect Immun. 65: 1980-1984.
- Ogawa T & Hamada S (1994): Hemagglutinating and chemotactic properties of synthetic peptide segments of fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 62: 3305-3310.
- Okuda K; Fukumoto Y; Takazoe I; Slots J; Genco RJ (1987): Capsular structures of black-pigmented *Bacteroides* isolated from human. Bull Tokyo Dent Coll. 28: 1-11.

Okuda K & Kato T (1987): Hemagglutinating activity of lipopolysaccharide from subgingival plaque bacteria. *Infect Immun.* 55: 3192-2196.

Okuda K; Kato T; Naito Y; Ono M; Kikuchi Y; Takazoe I (1986): Suceptibility of *Bacteroides gingivalis* to bactericidal activity of human serum. *J Dent Res.* 65: 1024-1027.

Olsen I; Haraund; N, Shah; Saheer E; Gharbia (1999). Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000.* 20: 14-52.

Pallash TJ; Slots J (1996). Antibiotic prophylaxis and the medically compromised patient. *Periodontol 2000.* 10: 107-138.

Pereira RB; Vasquez EC; Stefanon I; Meyrelles SS (2011). Oral *Porphyromonas gingivalis* infection alters the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice. *Lipids in Health and Disease.* 10: 80-84.

Pike R; McGraw W; Potempa J; Travis J (1994): Lysine and arginina specific proteinases from *Porphyromona gingivalis*. Isolation, characterization and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J Biol Chem.* 269: 406-411

Progluske-Fox A; Tumwansorn S; Holt SC (1989): The expression and function of *Bacteroides gingivalis* hemagglutinin gene in *E.Coli* *Oral Microbiol Immunol.* 4: 121-131.

Rajasuo A; Sihvonen OJ; Peltola M; Meurman JH (2007): Periodontal pathogens in erupting third molars of periodontally healthy subjects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 36: 818-821.

Rajasuo A; Jousimies-Somer H; Savolainen S; Leppänen J; Murtomaa H; Meurman JH (1996): Bacteriologic findings in tonsillitis and pericoronitis. *Clin Infect Dis.* 23(1):51-60.

Rapala-Kozik M; Bras G; Chruscicka B; Karkowska-Kuleta J; Sroka A; Herwald H; Nguyen KA; Eick S; Potempa J; Kozik A (2011): Adsorption of Components of the Plasma Kinin-Forming System on the Surface of *Porphyromonas gingivalis* involves Gingipains as the Major Docking Platforms. *Infect Immun.* 79(2) 797-805.

Schifferle RE; Reddy MS; Zambon JJ; Genco RJ; Levine MJ (1989): Characterization of polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *J Immunol.* 143: 3035-3042.

Schillinger C; Petrich A; Lux R; Riep B; Kikheny J; Friedmann A; Wolinsky L; Gobel U; Daims H; Møller A(2010): Co-Localized or Randomly Distributed? Pair Cross Correlation of In Vivo Grown Subgingival Biofilm Bacteria Quantified by Digital Image Analysis. *Plos one.* 7:e37583

Sanz M; Lau L; Herrera D; Morillo JM; Silva A (2004): Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella*

forsythusis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. J Clinical Period. 31: 1034-1047.

Shah HN; Gharbia SE; Kowlessur D; Wilkie E (1991): Isolation and characterization of gingivain a cysteine protease. Microb Ecol Health Dis. 4: 319-328

Shah HN & Williams RAD (1987): Catabolism of aspartate and asparagine by *Cateroides intermedius* and *Bacteroides Gingivalis*. Curr Microbiol. 15: 313-318

Sixou JL; Magaud C; Jolivet-Gougeon A; Cormier M; Bonnaure-Mallet M (2003): Microbiology of mandibular third molar pericoronitis: incidence of beta-lactamase-producing bacteria. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 95(6):655-9.

Sixou JL; Magaud C; Jolivet-Gougeon A; Cormier M; Bonnaure-Mallet M (2003): Evaluation of the Mandibular Third Molar Pericoronitis Flora and Its Susceptibility to Different Antibiotics Prescribed in France. J Clinical Microbiol. 41: 5794-5797.

Slots J & Gibbons JR (1998): Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* sub. *Asaccharolyticus* to oral surface and possible role in colonization of mouth and periodontal pockets. Infect Immun. 19: 254-264.

Slots J (1981). Enzymatic characterization of some oral and non oral gram-negative bacteria with the API-ZYM system. J Clinical Microbiol. 14: 288-294.

Slots J & Ting M (1999). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000. 20: 82-121.

Smaley JW; Birss AJ; Szmigielski B; Potempa J (2006): The HA2 haemagglutinin domain of lysine-specific gingipain (Kgp) of *porphyromona gingivalis* promotes u-oxo bishaem formation from monomeric iron (III) protoporphyrin IX. Microbiology. 152, 1839-1845.

Socransky SS & Haffajee AD (2005): Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 38: 135-187.

Socransky SS; Haffajee AD; Ximenez-Fyvie LA; Feres M; Mager D (1999): Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. Periodontol 2000. 20: 341-352.

Socransky SS; Haffajee AD; Smith C; Dibart S (1991): Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. J Clinica Periodont. 18: 766-775.

Tanamoto K; Azumi S; Haishima Y; Kumada H; Umemoto T (1997): Endotoxic properties of free lipid A from *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. 143: 63-71.

Thoden van Velzen SK; Abraham-Inpijn L; Moorer WR (1984): Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. J Clin Periodontol. 11(4):209-20.

Thomas JG & Nakaishi BS (2006): Managing the complexity of a dynamic biofilm. *JADA*. 137: 10-16.

Tran SD & Rudney JD (1999) Improved multiplex PCR using a conserved and Species-Specific 16S rRNA Gene Primers for Simultaneous Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clinical Microbiol.* 3504-3508.

Tenorio EL; Klein BA; Cheung WS; Hu LT (2011): Identification of interspecies interactions affecting *Porphyromonas gingivales* virulence phenotypes. *J Oral Microbiol.* 3: 8396.

Maekawa T; Takahashi N; Tabeta K; Aoki Y; Miyashita H; Miyauchi S; Miyazawa H; Nakajima T; Yamazaki K (2011): Chronic Oral Infection with *Porphyromonas gingivalis* Accelerates Atheroma Formation by Shifting the Lipid Profile. *PLoS one.* 6 (5): e20240.

Tribble GD; Rigney TW; Dao DH; Wong C; Kerr JE; Taylor BE; Pacha S; Kaplan H (2012): Natural competence is a major mechanism for horizontal DNA transfer in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *mBio.* 3(1): 00231-11.

Van Winkelhoff AJ & Slots (1999). *Actinobacillusactinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in non oral infections. *Periodont* 2000. 6: 122-135.

Watanabe K; Yamaji Y; Unemoto T (1992): Correlation of Cell-adherent activity and surface structure in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 1992: 7: 357-363.

Yilmaz O; K. Watanabe; R. J. Lamont (2002): Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol.* 4:305–314.

Yilmaz, O; P. A. Young; R. J. Lamont; G. E. Kenny (2003) Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiology* 149:2417–2426.

Yoshimura A; Kaneko T; Kato Y; Golenbock DT; Hara Y (2001): Lipopolysaccharides from Periodontopathic Bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* Are Antagonists for Human Toll-Like Receptor 4. *Infect Immun.* 70: 218-225.

Resumen

La Pericoronaritis es una inflamación e infección alrededor de la corona de un diente semierupcionado. El principal objetivo de este estudio es realizar una aproximación al estudio de la microbiología bacteriana de estos sacos.

Corresponde a un estudio descriptivo de corte transversal, en el cual se examinó a 40 pacientes con sacos pericoronarios inflamados e infectados de los cuales, 11 pacientes del Servicio de Cirugía y Traumatología Máxilo Facial del Hospital Carlos van Buren de Valparaíso, en el período comprendido entre Mayo a Julio de 2012, cumplieron los criterios de inclusión y exclusión. Las muestras de biofilm fueron tomadas del saco pericoronario más inflamado y transportadas en un RTF (medio de transporte de reducido) al laboratorio de microbiología bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en donde se cultivaron en agar sangre hemina-menadiona.

Los pacientes estuvieron en un rango etario entre los 18 y 35 años, con al menos 1 tercer molar presentes en semi inclusión y con un máximo de 4 terceros en boca y con 2 en semi inclusión. Todos los pacientes presentaban como máximo un valor de 1 en el código CPITN. Los UFC fueron contados encontrándose UFC pigmentadas de negro, de estas: un 55% correspondió a especies de *Prevotella* y un 45% correspondió a *Porphyromonas gingivalis*.

Mediante este estudio se comprobó la existencia de especies anaeróbicas presentes en los sacos pericoronarios, dentro de las cuales destacan *Porphyromonas gingivalis* y especies de *Prevotella*. Los sacos pericoronarios pueden servir de nichos de colonización temprana de estas especies bacteriana.

Anexo I



Consentimiento Informado

Estimado(a) Sr(a):

Estamos realizando un estudio, proyecto de tesis, de la Universidad de Valparaíso, Facultad de Odontología en conjunto con el servicio de cirugía y traumatología maxilofacial del Hospital Carlos van Buren de Valparaíso, denominado: "Detección y cuantificación de Porphyromonas gingivalis y especies de Prevotella en sacos pericoronarios inflamados en pacientes del Servicio de cirugía y traumatología maxilofacial del Hospital Carlos van Buren de Valparaíso". Para ello estamos examinando y tomando muestras microbiológicas a personas que presenten sacos pericoronarios en sus terceros molares, atendidos en el Hospital Carlos van Buren de Valparaíso, en el período comprendido entre abril y julio del año 2012. Nos gustaría invitarlo a participar en esta investigación, mediante una toma de muestra microbiológica de sacos pericoronarios y un exámen microbiológico a esa muestra, gratuitos para Ud.

El examen consistirá en una muestra tomada con una cureta Gracey introducida en el saco pericoronario (encía que envuelve la corona). Su participación es muy importante para nosotros, si participa sus datos e información será manejada con absoluta confidencialidad y no serán divulgados, además posterior a las pruebas de laboratorio las muestras serán completamente eliminadas.

Yo..... Rut N°.....acepto participar en el estudio y permito realizar muestras microbiológicas en sacos pericoronarios, para la realización del proyecto de tesis: "Detección y cuantificación de Porphyromonas gingivalis y especies de Prevotella en sacos pericoronarios inflamados en pacientes del Servicio de cirugía y traumatología maxilofacial del Hospital Carlos van Buren de Valparaíso".

.....
Firma del paciente aceptando los términos.

Valparaíso,dede 2012.

Anexo II

Ficha clínica y microbiológica

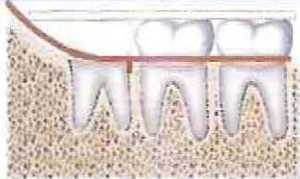


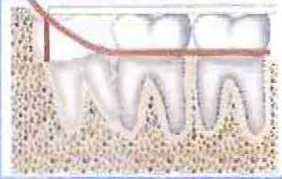


I. Identificación			
Nombre Paciente:			
Sexo	Edad	Rut:	
Consentimiento informado:			Fono
			Fecha de examen

II. Anamnesis
Antecedentes sistémicos
Antecedentes Orales

III. Examen general e intraoral
Examen general
Examen Intraoral

IV. Exámen específico	
N° de terceros molares en boca	Semi erupcionado
Exámenes complementarios	

V. Tipo de tercer molar			
			
Cordal posición vertical	Cordal posición horizontal	Cordal posición mesio – angular	Cordal en distoversión
Colocar una X en el tipo(s) de tercer(os) molares en que se tomó la(s) muestra(s) microbiológicas			

VI. Muestra microbiológica	
N° de muestras por paciente	Instrumento utilizado Cureta Gracey
N° de muestras por diente	Medio de transporte RTF

VII. Procesamiento de muestra	
Procesamiento previo	
Método de cultivo	
Incubación	

Anexo III




**COMITE CIENTIFICO
HOSPITAL CARLOS VAN BUREN**

Valparaíso 13 marzo 2012.

Dra.
Claudia Cartagena Salinas
Encargada Sección Investigación
Oficina de Gestión Docente
Hospital Carlos Van Buren
Presente

Tenemos el agrado de saludar e informar a Ud. que en reunión del Comité Científico del día de hoy, hemos aprobado el trabajo de tesis "**Presencia de *Porphyromonas gingivalis* en sacos pericoronarios de terceros molares semi erupcionados detectada mediante técnica de PCR**" a realizar por el Sr. Franco Paveri S., alumno de Odontología de la Universidad de Valparaíso, en pacientes atendidos en el Hospital Carlos van Buren de Valparaíso con terceros molares semi erupcionados y sacos pericoronarios, en el período comprendido entre Abril de 2012 y Julio de 2012.

Saluda atentamente a Ud.


Dr. Juan Pablo Gigoux
Presidente (s) Comité Científico
Hospital Carlos Van Buren



Ref.: Memo N° 05
16.01.2012

Anexo IV

Tabla VIII. Recuento absoluto y porcentual de *Prevotella spp.* y de *Porphyromonas gingivalis* por pacientes con sacos pericoronarios inflamados. Recuento total, media, desviación estándar y rango absoluto y porcentual, por variable.

Paciente	UFC N ml		P. Negro	UFC P.spp	UFC Pg	% P spp	TC	% Pg	TC
	UFC ml	RTF							
1	13000000	4560000	35,307	2508000	2052000	19,29	15,78		
2	26000000	14480000	55,69	7964000	6516000	30,63	25,06		
3	60000000	8700000	14,5	4785000	3915000	7,98	6,525		
4	55100000	18250000	33,12	10037500	8212500	18,22	14,9		
5	55800000	22600000	40,501	12430000	10170000	22,27	18,23		
6	68900000	9700000	14,11	5335000	4365000	7,73	6,34		
7	54000000	11000000	20,37	6050000	4950000	11,2	9,17		
8	63000000	20400000	32,3	11220000	9180000	17,81	14,57		
9	58700000	13000000	22,15	7150000	5850000	12,18	9,97		
10	45300000	9000000	19,87	4950000	4050000	10,93	8,94		
Total	499800000	131690000		72429500	59260500				
Media	49980000	13169000	26,34	7242950	5926050	14,4916867	11,8568427		
Devest	17463091,24	5744571,254	13,11723496	3159514,19	2585057,06	7,21202114	5,89903855		
max	68900000	22600000	55,69	12430000	10170000	30,63	25,06		
min	13000000	4560000	14,11	2508000	2052000	7,73	6,34		

UFC: Unidad Formadora de Colinas. RTF: *Reduced Transpor Fluid.* P.spp: Especies de *Prevotella*. PG: *Porphyromonas gingivalis*. TC: Total cultivo. P. Negro: UFC pigmentada de negro.