



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR
CARRERA DE ODONTOLOGÍA

Aggregatibacter actinomycetemcomitans EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL DE
PROGRESIÓN LENTA QUE ACUDEN A LA CLÍNICA
ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
PERÍODO MARZO-AGOSTO 2019.

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO
A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE ODONÓLOGA

AUTOR: Calderón Ruilova, Kamila Rafaela

TUTOR: Yarzabal Rodríguez, Luis Andrés, PhD.

CUENCA

2019

DECLARACIÓN:

Yo, **Calderón Ruilova Kamila Rafaela**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado la totalidad de las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento; y eximo expresamente a la UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

La UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la ley de propiedad actual, por su reglamento y normatividad institucional vigente.

Autor: Calderón Ruilova Kamila Rafaela

C.I.: 0106826225

CERTIFICACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN

Sra. Dra. Liliana Encalada Verdugo

COORDINADORA DEL DPTO. DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado **“*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL DE PROGRESIÓN LENTA QUE ACUDEN A LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA PERÍODO MARZO-AGOSTO 2019.”**, realizado por **CALDERÓN RUILOVA KAMILA RAFAELA**, ha sido inscrito y es pertinente con las líneas de investigación de la Carrera de Odontología, de la Unidad Académica de Salud y Bienestar y de la Universidad, por lo que está expedito para su presentación.

Cuenca, octubre 2019

Dr. Ebingen Villavicencio Caparó

DPTO. DE INVESTIGACIÓN ODONTOLÓGÍA

CERTIFICADO DEL TUTOR

Sra. Dra. Liliana Encalada Verdugo

COORDINADORA DEL DPTO. DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado **“*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL DE PROGRESIÓN LENTA QUE ACUDEN A LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA PERÍODO MARZO-AGOSTO 2019.”**, realizado por CALDERÓN RUILOVA KAMILA RAFAELA, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, octubre 2019

Tutor: Ph.D. Luis Andrés Yarzabál Rodríguez.

DEDICATORIA.

A Dios, porque todo lo que uno logra en la vida es gracias a su bendición, a mi familia por su incondicional apoyo, que siempre me enseñaron a ser mejor cada día, a nunca rendirme y siempre dar lo mejor de mí. A José Ulloa, por su motivación y por enseñarme a creer que todo es posible cuando uno se propone. Y por último a mi mejor amiga Doménica Iñiguez, quién siempre ha sido incondicional en mi vida, ha estado presente a pesar de la distancia que nos separa y me apoya en todo momento.

EPÍGRAFE

Mira que te mando que te esfuerces y que seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo a dondequiera que tu vayas.

RVR1960 Josué 1:9

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, a mis padres, a mi tutor de tesis Andrés, docentes y todas las personas que hicieron este trabajo posible. Gracias a su motivación y afecto he podido convertirme en una profesional con valores y principios.

LISTA DE ABREVIATURAS

A.a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

°C: Grados centígrados

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

ADN: Ácido Desoxirribocleico

Mm: Milímetros

N: Newtons

A.S: Agar Sangre

AGC: Agar Chocale

SDS: Dodecilsulfato sódico

Pb: Pares de bases

UV: Ultra violeta

μl: microlitros

ÍNDICE

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO I	13
1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	15
2.- JUSTIFICACIÓN	15
3.- OBJETIVOS	16
3.1.- Objetivo General:	16
3.1.- Objetivos Específicos	16
4.- MARCO TEÓRICO	17
4.2.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	24
CAPÍTULO II	24
1.- MARCO METODOLÓGICO	26
2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	26
2.1.- Criterios de selección	26
2.2.- Tamaño de la muestra:	27
3.- OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	28
4.- INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	29
4.1.- Instrumentos documentales:	29
4.2.- Instrumentos mecánicos:	29
4.3.- Materiales	29
4.4.- Recursos	29
5.- PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS	29
5.1.- Ubicación espacial	29
5.2.- Ubicación temporal	30
5.3.- Procedimiento de la toma de datos:	30

6.- PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	33
7.- ASPECTOS BIOÉTICOS.....	34
CAPÍTULO III	34
1. RESULTADOS.....	36
2. DISCUSIÓN	41
3. CONCLUSIONES.....	44
III. BIBLIOGRAFÍA:	45
ANEXOS.	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA POBLACIONAL EN FUNCIÓN DE LA EDAD Y EL SEXO.	36
TABLA 2: PRESENCIA DE A. ACTINOMYCETEMCOMITANS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL DE PROGRESIÓN LENTA.	39
TABLA 3: OCURRENCIA DE AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS EN FUNCIÓN DEL SEXO DE LOS PACIENTES.....	40

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la frecuencia con la que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se encuentra en bolsas periodontales de pacientes con periodontitis de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la UCACUE período marzo-agosto 2019. **MATERIALES Y MÉTODOS:** La investigación es transversal actual, descriptiva. La población fue de 41 pacientes con periodontitis de progresión lenta. Las muestras fueron tomadas por medio de conos estériles de papel introducidos en bolsas periodontales mayores o iguales a 5mm y transportadas a caldo de Tioglicolato para ser analizadas por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. **RESULTADOS:** Se encontraron 5 muestras positivas, dando un 12,20% de presencia de la *A. actinomycetemcomitans* en los pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta, atendidos en la Clínica Odontológica de la UCACUE.

PALABRAS CLAVES:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, PCR, Periodontitis.

ABSTRACT

OBJETIVE: To determine how frequently is *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* found in gum pockets of patients suffering from slow rate of progression periodontitis, who were attended in the Dentistry Clinic of UCACUE, during the period march-august 2019. **MATERIALS AND METHODS:** This is a descriptive, cross-sectional study. Samples were collected with a sterile paper cone, deepening in periodontal pockets of patients with > 5mm of depth. The samples were transported to the lab in Thioglycolate broth, and incubated for several days at 37°C. Total genomic DNA was extracted and the presence of *A. actinomycetemcomitans* detected by means of PCR. **RESULTS:** Five out of 41 subjects (12.20%) were shown to be positive for *A. actinomycetemcomitans* in their gum pockets.

KEY WORDS

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, PCR, periodontal disease.

INTRODUCCIÓN.

La enfermedad periodontal es una patología de carácter inflamatorio e infeccioso debido, entre otros, a la presencia de microorganismos llamados periodontopatógenos en la placa bacteriana. Estos microorganismos, entre los que se encuentran las bacterias, acceden al surco gingival dónde, por medio de liberación de enzimas, destruyen el ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento radicular. Esta interacción entre las enzimas bacterianas y el periodonto provoca “bolsas” alrededor de los dientes que, con el avance de la enfermedad y en ausencia de tratamiento, pueden causar la pérdida de piezas dentales a largo plazo⁽¹⁾.

Las bacterias periodontopatógenas son, en su mayoría, gram negativas y anaerobias. Las podemos clasificar en dos grupos principales para su identificación: el complejo rojo y el complejo naranja. Especies bacterianas pertenecientes a estos dos grupos son las que más daño causan al periodonto e inhiben la respuesta inflamatoria del hospedador⁽¹⁾.

De acuerdo con las conclusiones del Taller Mundial de Periodoncia (World Workshop) de 1996, los patógenos que causan periodontitis crónica se dividen en grupos de evidencia fuerte, moderada e inicial. Entre los primeros tenemos a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*; los de evidencia moderada incluyen a *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, y diferentes especies de espiroquetas; y, finalmente, los de evidencia inicial son *Staphylococcus spp*, *Selenomonas spp*, *Pseudomonas spp.*, *Eikenella corrodens*⁽¹⁾.

Hasta el momento en el Ecuador no se han publicado estudios que evalúen la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en bolsas periodontales de pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta⁽¹⁾.

Por tal razón, el objetivo de este proyecto de investigación es determinar la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis de progresión lenta, cuyas bolsas periodontales tengan profundidades mayores o iguales a 5mm. Los pacientes a estudiar serán aquellos atendidos en la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca⁽¹⁾.

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

El problema que se investigará es la posible presencia de *A. actinomycetemcomitans* en bolsas periodontales de pacientes con periodontitis de progresión lenta.

La interrogante que se planteó en este estudio fue: ¿Cuál es la ocurrencia de *A. actinomycetemcomitans* en bolsas periodontales de pacientes con periodontitis de progresión lenta que acuden a consulta en la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, durante el período marzo-agosto 2019?

2.- JUSTIFICACIÓN

Como relevancia científica destacamos que el presente trabajo representará un aporte a la ciencia, susceptible de ser divulgado a la comunidad científica nacional e internacional a través de publicaciones indexadas y arbitradas. El mencionado aporte se refiere a datos actuales sobre la ocurrencia de *A. actinomycetemcomitans* en bolsas de pacientes con periodontitis de progresión lenta. Estos datos podrían permitir establecer una posible relación entre la presencia del patógeno y la manifestación de la patología. Adicionalmente, aportarían información relevante en favor del posible rol de esta bacteria como un determinante para la aparición de una periodontitis de progresión lenta, además de la presencia de cálculo y placa. La relevancia social del presente estudio se refiere al beneficio que obtendrían los grupos humanos afectados por estas patologías, al socializarse los resultados del presente estudio a nivel de las instituciones del Estado Ecuatoriano responsables de garantizar la salud pública. La relevancia humana queda de manifiesto en el sentido que cada paciente sería informado y educado con respecto a su higiene bucal, con la idea de evitar la aparición de nuevas patologías, similares a la que actualmente padecen, en el futuro. El tema que se presenta es de interés personal, ya que forma parte de mi programa académico para la obtención del correspondiente título de Odontóloga, de la Universidad Católica de Cuenca. Dicho tema se enmarca dentro de las líneas de investigación y tópicos pertinentes en la carrera de Odontología, y tiene concordancia con las políticas institucionales de investigación.

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General:

Determinar la frecuencia con la que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se encuentra en bolsas periodontales de pacientes con periodontitis de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la UCACUE período marzo-agosto 2019.

3.1.- Objetivos Específicos

- A. Optimizar el método de detección de ADN genómico de *A. actinomycetemcomitans* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
- B. Identificar, mediante métodos moleculares, la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a partir de las cepas clínicas aisladas de las muestras de bolsas periodontales de pacientes con periodontitis de progresión lenta que acuden a la clínica odontológica de la UCACUE período marzo-agosto 2019.
- C. Discriminar en función del sexo la ocurrencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en los pacientes con periodontitis de progresión lenta que acude a la clínica odontológica de la UCACUE período marzo-agosto 2019.
- D. Discriminar en función de la edad la ocurrencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en los pacientes con periodontitis de progresión lenta que acude a la clínica odontológica de la UCACUE período marzo-agosto 2019.

4.- MARCO TEÓRICO

4.1.- Enfermedad periodontal

4.1.a.- Concepto.

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que afecta al tejido que soporta los dientes, causada principalmente por microorganismos periodontopatógenos y la respuesta inmune (inespecífica) del hospedador. La ocurrencia de los patógenos puede variar de acuerdo con el lugar geográfico, la etnia y el nivel socio económico de las personas ⁽²⁾.

4.1.b.- Etiología.

La etiología de esta enfermedad es multifactorial: pueden estar involucrados factores del hospedador, factores ambientales y factores bacterianos³. Una persona puede desarrollar periodontitis cuando presenta cualquiera de estos factores que se consideran de riesgo; sin embargo, el no estar expuesto a alguno de ellos no significa que la enfermedad vaya a desaparecer, sino que el riesgo a desarrollar la enfermedad periodontal sólo sería menor ⁽⁴⁾.

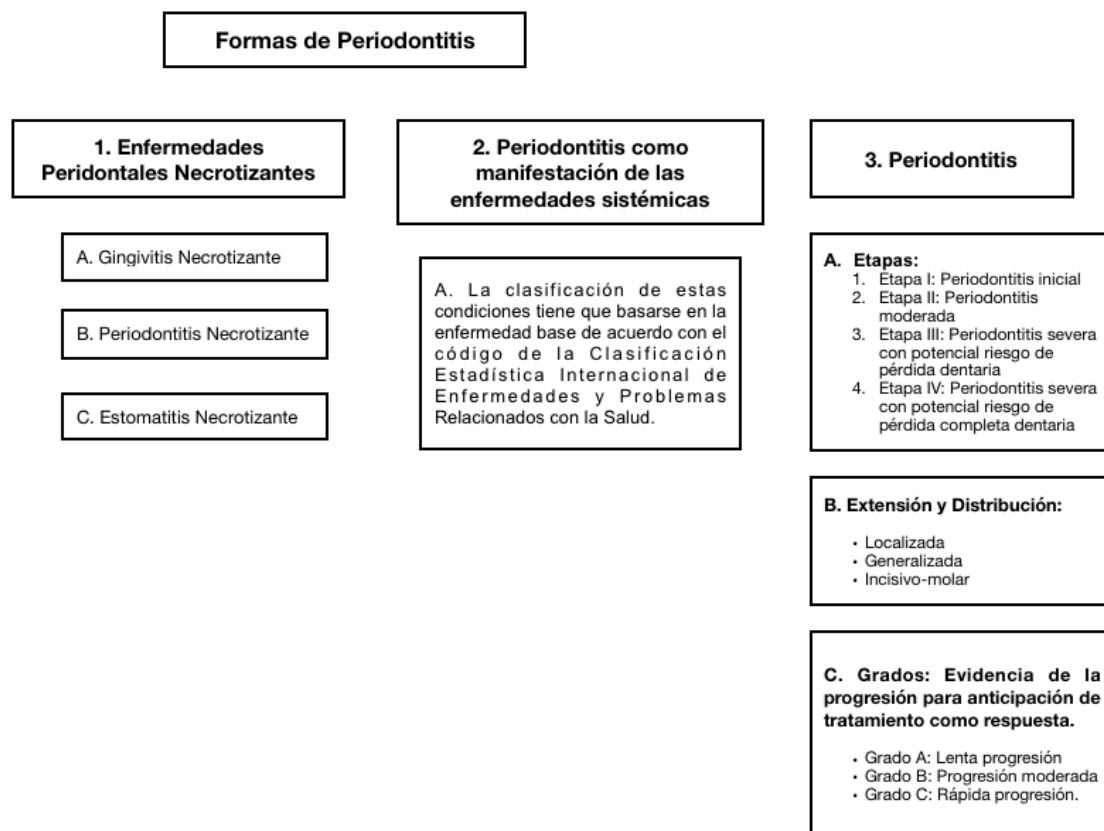
4.1.c.- Factores de riesgo.

Dentro de estos factores de riesgo se encuentran: inmunodepresión, afectaciones sistémicas, el consumo de tabaco, estrés o emociones que causen fuerte impacto, entre otros. También son considerados como factores etiológicos de la enfermedad periodontal: cálculo y placa sub y supragingival, bolsas periodontales, pérdida de inserción, sangrado al sondaje, entre otros. De acuerdo con la interacción del hospedador y los factores de riesgo, incluida la presencia de los microorganismos periodontopatógenos, dependerá la magnitud y forma en la que se verá afectado el periodonto ⁽⁴⁾.

4.1.d.- Nueva Clasificación Periodontal.

Existe una nueva clasificación de la enfermedad periodontal que fue propuesta en el Taller Mundial de Periodoncia de 2017. Dicha clasificación divide esta patología en tres grandes grupos: a) Salud Periodontal, Enfermedades y Condiciones De Las Encías, b) Periodontitis y c) Condiciones Que Afectan El Periodonto ⁽⁵⁾.

Anteriormente se consideraba que la periodontitis se presentaba bajo diferentes formas clínicas y podía aparecer en diferentes etapas de la vida y con diferentes rangos de progresión. Gracias a este nuevo consenso, la clasificación de la periodontitis sería más simple y estaría fundamentada en las características manifestadas clínicamente en la cavidad oral⁽⁵⁾.



Cuadro 1. Asociación Americana de Periodoncia. Clasificación de la Enfermedad Periodontal, Periimplantar y sus Condiciones. 2018⁽⁵⁾.

4.1.e.- Periodontitis de progresión lenta.

La periodontitis de progresión lenta es una patología de carácter inflamatorio causado por bacterias gram-negativas. Los microorganismos que causan esta manifestación, considerados como los más importantes, pertenecen al denominado “complejo rojo”: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que este último, es un patógeno oportunista que se encuentra normalmente en la microflora oral^(1,6).

Estos microorganismos tienen un fuerte impacto sobre la salud oral de acuerdo con la virulencia de la enfermedad, provocando respuestas inflamatorias por parte del hospedador lo cual produce a largo plazo pérdida de tejido conectivo y pérdida ósea alveolar^(2,6).

Se ha demostrado que la frecuencia con la que cada uno de estos microorganismos se presenta varía en razón del lugar geográfico, la etnia y el país^(2,6,7).

4.1.f.- Patógenos presentes en la Enfermedad Periodontal de Lento Progreso.

Es importante considerar que los patógenos anaerobios participan activamente en la destrucción del periodonto. Debido a las características específicas de cada una de ellas, el efecto que tendrán sobre los tejidos de soporte del diente será diferente⁽⁶⁾.

Como se mencionó anteriormente *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* son los principales patógenos que causan pérdida ósea alveolar y destrucción del tejido conectivo del surco gingival; esto sucede en la enfermedad periodontal de lento progreso^(6,8).

A. actinomycetemcomitans es un patógeno oportunista que no solo ha sido asociado a la enfermedad periodontal como tal, sino que también ha sido detectado en pacientes con endocarditis infecciosa, actinomicosis, osteomielitis, glomerulonefritis y neumonía, entre otras⁽⁹⁾.

Entre las características de *A. actinomycetemcomitans* tenemos que es un cocobacilo no móvil, no esporulado, encapsulado, que contiene fimbrias lo cual le permite una mayor adhesión al biofilm dentario. Se trata de un anaerobio facultativo que se desarrolla mejor en condiciones de anaerobiosis⁽⁹⁾.

Entre los factores de virulencia más importantes de *A. actinomycetemcomitans* podemos mencionar:

a.- Fimbrias: son estructuras filamentosas extracelulares, que le permiten adherirse de manera fácil a las células del hospedador y colonizarlas, permitiendo el inicio de un proceso infeccioso⁽⁹⁾.

b.- Leucotoxinas: enzimas que afectan letalmente a todos los leucocitos o células blancas, causando una inmunodepresión⁽⁹⁾.

c.- Endotoxina: es la toxina secretada por *A. actinomycetemcomitans* que causa la reabsorción ósea⁽⁹⁾.

d.- Citotoxinas: estas toxinas inhiben la proliferación de fibroblastos, afectando la capacidad del hospedador de recuperar los tejidos⁽⁹⁾.

e.- Colagenasa: es una enzima capaz de deteriorar las estructuras de soporte del diente, formadas por tejido conectivo⁽⁹⁾.

f.- Epiteliotoxinas: toxinas que destruyen los hemidesmosomas del epitelio de unión, provocando la profundización formando así las bolsas periodontales y agravando la infección⁽⁹⁾.

A. actinomycetemcomitans es una bacteria que se encuentra normalmente en el surco gingival pero que se convierte en patógeno cuando existe inmunodepresión por parte del hospedador⁽⁹⁾.

El daño que esta bacteria produce en los tejidos de soporte del diente es de rápido progreso, en ausencia o presencia de biofilm. Su agresividad determina la formación de las bolsas periodontales por parte de la epiteliotoxina, y provoca movilidad dentaria; además, puede conllevar a la pérdida de la pieza dental por producción de colagenasa⁽⁹⁾.

4.1.g.- Medios de cultivo

A. actinomycetemcomitans es una bacteria que puede ser cultivada en medios enriquecidos de Agar sangre, Agar chocolate suplementado con vitamina K, hemina, menadiona⁽⁹⁾. Las condiciones para su cultivo incluyen una atmósfera de CO₂ al 5 -10%, 37 °C y un período de incubación de aproximadamente 5 a 7 días^(7,9,10).

A. actinomycetemcomitans es un cocobacilo inmóvil, Gram negativo de la familia Pasteurellaceae. Su cultivo puede observarse en forma aislada, pares o racimos pequeños. Sin embargo, en los cultivos se los puede observar directamente formas cocoides⁽¹⁰⁾.

Las colonias en medios de cultivo se adhieren fuertemente al agar y son translúcidas, con bordes irregulares, superficie rugosa. Después de varios días de incubación se puede distinguir un centro con forma de estrella en la colonia⁽¹⁰⁾.

A. actinomycetemcomitans es un microorganismo, productor de catalasa, reductor de nitratos, productor de fosfatasa ácidas y alcalinas, fermentador, no hemolítico, que no produce oxidasa ⁽¹⁰⁾. Se trata de una especie que se comporta como un patógeno oportunista, es susceptible a cefalosporinas, tetraciclinas y fluoroquinolonas; sin embargo, es resistente a la penicilina, ampicilina, amikacina y a los macrólidos⁽¹⁰⁾.

4.1.h.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de biología molecular que permite amplificar exponencialmente cualquier secuencia de nucleótidos, mediante la acción de una ADN-polimerasa termoresistente, con muy alta sensibilidad y especificidad. La PCR se puede emplear para detectar la presencia de cualquier microorganismo (incluyendo bacterias infecciosas) a través de su material genético, a partir de una sola muestra clínica⁽¹¹⁾.

Esta técnica permite sintetizar una gran cantidad de copias de un determinado fragmento de ADN, para posteriormente analizarlas o usarlas en función de los intereses de los investigadores. Esto podría permitir, entre muchas otras cosas, relacionar un determinado microorganismo con una enfermedad en particular⁽¹¹⁾.

Los métodos moleculares utilizados para detección de periodontopatógenos son pruebas rápidas, sensibles y específicas, en comparación a los cultivos microbiológicos. Sin embargo, no permiten determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos, puesto que para ello se requiere necesariamente de su cultivo *in vitro* ⁽¹¹⁾.

4.2.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.

En un artículo denominado Association between coinfection of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Treponema denticola* and periodontal tissue destruction in chronic periodontitis, China, Chen et al. presentaron la frecuencia con la que estos tres patógenos se encontraban en los 81 pacientes evaluados, después de 162 muestras clínicas presencia positiva con un 5,9% en *P. gingivalis*, 17,6% con *A. actinomycescomitans*, y 76,5% en *T. denticola*. Se estableció una pequeña relación con el *A. Actinomycescomitans* de acuerdo a la infección y la pérdida de inserción del periodonto. Como también se encontró más relevancia en los sitios con enfermedad severa que en los de enfermedad leve.

Otro estudio realizado en China, realizado por Meng, S, et al. denominado Prevalence of *Actinobacillus actinomycescomitans* in chinese chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults estableció que *A. actinomycescomitans* está presente con mayor frecuencia en los sitios detectados con una profundidad de bolsa ≥ 7 mm y pérdida de inserción de ≥ 6 mm. También fue detectado con mayor frecuencia en aquellos lugares que sangraron (37,07%) que en aquellos lugares que no sangraron (7,41%). *A. actinomycescomitans* tiene mayor frecuencia en pacientes con sitios enfermos que en periodonto sano, así como también se presenta más en la presentación severa de la enfermedad que en la mediana o leve. Llegando a la conclusión de que *A.a* es un patógeno de gran importancia en la etiología de la enfermedad periodontal crónica.

En otro estudio denominado Asociación de *Aggregatibacter actinomycescomitans* y microorganismos del complejo rojo con parámetros clínicos de pacientes con periodontitis crónica, publicado por Medina et al, se demostró que *A. actinomycescomitans* estuvo presente en el 23,7% de los pacientes con periodontitis crónica, *P. gingivalis* en el 64,4% y *T. forsythia* en el 40,8%. Con la presencia de malos parámetros clínicos aquellos afectados por *A. actinomycescomitans* y *P. gingivalis* demostrando que cada paciente tiene una composición diferente de placa subgingival.

En otro estudio realizado en Brasil titulado Occurrence of *Aggregatibacter actinomycescomitans* in brazilian indians from umutina reservation, Mato Grosso, Brazil, se corroboró la presencia de *A. actinomycescomitans* en la saliva de 18,42% de los pacientes afectados con periodontitis crónica y en el 26,32% de la placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica.

Otro estudio realizado en Brasil, por Júnior et al. Titulado *Ocurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects and children with gingivitis in two cities of the state of Sao Paulo, Brazil*, se corrobora que el 68% de los pacientes con periodontitis crónica tienen *A. actinomycetemcomitans*, mientras que el 40,3% de los pacientes sanos y el 40,14% de los pacientes con gingivitis en un 40,14% y en pacientes con periodontitis agresiva con un 92,86%. Se encuentra mayor presencia en pacientes con periodontitis agresiva, sin embargo, se encuentra presencia en la periodontitis crónica determinando al *A.a* como a esta bacteria cómo etiológica.

En otro estudio realizado en Colombia por Mayorga et al. Se comprobó la escasa presencia, casi nula de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis crónica y que se presenta en la periodontitis agresiva, pero en menor proporción que *P. gingivalis*.

En una investigación realizada en México denominada Descripción de la microbiota subgingival de los sujetos mexicanos con periodontitis crónica, realizado por Flores et al, se demuestra que *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola*. Fueron detectados en la población de pacientes sanos como los de periodontitis crónica, aunque en mayor proporción en los de la última categoría. Los pacientes con periodontitis crónica mostraron proporciones mayores de bacterias del complejo rojo y menores de complejo amarillo, en relación a los pacientes sanos.

En *Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis*, realizado por Crotelli et al. se demostró una mayor prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis agresiva tanto en presencia como en daño del periodonto y que sirve para la detección de esta enfermedad. Sin embargo, los autores determinaron que la variabilidad de la presencia de *A. actinomycetemcomitans* dependía de la ubicación geográfica y la etnia racial.

Otro estudio realizado en Colombia por Botero et al. denominado *Ocurrence of Periodontopathic and Superinfecting Bacteria in Chronic and Aggressive Periodontitis Subjects in a Colombian Population* no se demostró presencia única de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis crónica. Sólo se encontraron diferencia de parámetros clínicos entre periodontitis crónica y agresiva; sin embargo, no se encontró una presencia importante de patógenos en ninguna de las dos presentaciones de la enfermedad.

Por último, en un estudio realizado en Brasil por Cortelli et al. Denominado Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis, que se llevó a cabo en dos localidades muy populosas de Sao Paulo (“Baixada Santista” y “Vale do Paraíba”), se demostró la presencia de esta bacteria está en pacientes con periodontitis crónica, con diferencias importantes en función de la edad y el sexo de las personas. De acuerdo a su severidad, la enfermedad periodontal crónica se presentó de la siguiente manera: 16,11% en forma leve, 17,42% en forma moderada y 23,13% en forma severa. Los autores concluyeron que existe presencia en la enfermedad periodontal crónica, pero con manifestaciones clínicas de mayor destrucción del periodonto.

5. HIPÓTESIS

La presente investigación no precisa hipótesis, ya que es un estudio de tipo descriptivo.

CAPÍTULO II
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1.- MARCO METODOLÓGICO

Enfoque: El enfoque de esta investigación es: Cuantitativo

Diseño de investigación: Epidemiológico: Descriptivo

Nivel de investigación: Exploratorio

Tipo de investigación:

- **Por el ámbito:** Campo, laboratorio y documental.
- **Por la técnica:** Observacional, comunicacional.
- **Por la temporalidad:** Transversal actual

2.- POBLACIÓN Y MUESTRA

La población del presente estudio se desconoce en proporción y exactitud; aunque se realizará a manera de conveniencia, por tanto, se escogerán a todos aquellos pacientes que ingresen a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca en el período marzo-agosto 2019. Esta población fue seleccionada a conveniencia ya que es un estudio piloto.

2.1.- Criterios de selección: Se tendría en cuenta los siguientes criterios:

2.1.a.- Criterios de inclusión: Se incluirían en el presente estudio:

Los pacientes que hayan firmado el consentimiento informado dentro de la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca.

Los pacientes que padezcan de periodontitis de progresión lenta.

Los pacientes que presenten una o varias bolsas periodontales con una profundidad mayor de 5mm.

Los pacientes que hayan recibido un destartraje previo al sondaje.

2.1.b.- Criterios de exclusión: Se excluirían del estudio:

Los pacientes que no firmaran el debido consentimiento informado.

Los pacientes que presentaran discapacidad intelectual.

Los pacientes que presentaran discapacidad física (osteoporosis, artritis, artrosis).

Los pacientes que consumieran más de 10 cigarrillos al día.

Los pacientes que presentaran diabetes mellitus no controlada.

2.2.- Tamaño de la muestra: el total de la muestra fueron 41 personas, seleccionadas de manera no probabilística por cuotas, debido a que cumplen con los parámetros clínicos de diagnóstico de Periodontitis de progresión lenta. Partimos a partir de la premisa que estos individuos constituyen un grupo representativo de la población afectada por esta enfermedad.

3.- OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	DIMENSIÓN	INDICADORES	TIPO ESTADÍSTICO	ESCALA	DATO
OCURRENCIA DE <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Número de veces que <i>A. actinomycetemcomitans</i> se presenta en bolsas periodontales en función de la totalidad de la muestra estudiada	Cociente resultante de la división del número de pacientes positivos sobre el total de pacientes evaluados	Unidimensional	Ficha de recolección de datos	Cuantitativo	Numeral	Porcentaje
SEXO	Características genotípicas y fenotípicas de una persona	Características físicas exteriores	Unidimensional	Ficha de recolección de datos	Cualitativo	Nominal	Hombre Mujer
EDAD	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha actual	Resta de la fecha actual y la fecha de nacimiento	Unidimensional	Ficha de recolección de datos	Cuantitativo	Ordinal	Cualquier edad que presenten los pacientes que fueron atendidos en la Clínica Odontológica de la UCACUE

4.- INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.

4.1.- Instrumentos documentales: Para la recolección de datos se utilizó una ficha clínica aprobada por el Departamento de Investigación de la Universidad Católica de Cuenca (ANEXO 4), bibliografía y artículos publicados en revistas especializadas.

4.2.- Instrumentos mecánicos: Para la toma de datos se utilizó una computadora portátil, con procesador Intel Core i5, microscopios, estufas de ambientación, cabinas de manejo de microorganismos.

4.3.- Materiales: Tubos tipo Eppendorf de vidrio, pipetas, cajas de Petri, medios de cultivo (agarizados), tinciones para detección de microorganismos, asas bacteriológicas, conos de papel estériles N° 15-30, reactivos, medio de cultivo caldo tioglicolato, tubos de ensayo. PCR: Tubo Eppendorf 1 ml, tubos de ensayo, pipetas: 1 - 10, 2-20, 20-200, 100 -1000, puntas de 10, 20, 100, 200,1000ul, gradillas, agitador vórtex, kit de purificación de ADN genómico, termociclador, lupa estereoscópica, cámara de electroforesis, foto documentador, centrífuga, termo-bloque, marcadores de peso molecular (DNA ladder), SYBR SAFE, gel de agarosa.

4.4.- Recursos: Para este estudio se utilizó recursos institucionales (infraestructura: Laboratorio de Genética y Biología Molecular situado en la Basílica Universitaria en el segundo piso del edificio exterior), recursos humanos (tesistas y tutores), recursos financieros (proyecto de financiación mixta: parcialmente autofinanciado y parcialmente financiado por el proyecto de: “*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en pacientes con Enfermedad Periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, período marzo-agosto 2019.”

5.- PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS.

5.1.- Ubicación espacial.

La Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca está ubicada en la ciudad de Cuenca, provincia de Azuay, entre la Avenida de las Américas y la calle Humboldt, como un único edificio situado en el extremo superior de la facultad, junto al Poliforo de la institución.

5.2.- Ubicación temporal.

La investigación se realizó entre el período lectivo de marzo – agosto 2019, recolectando las muestras clínicas, a partir de pacientes seleccionados en base a los criterios detallados anteriormente, en la Clínica Odontológica.

5.3.- Procedimiento de la toma de datos:

5.3.a Toma de muestras a partir de bolsas periodontales

La toma de datos se inició con la identificación de los pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, en base a lo establecido en la ficha de recolección de datos. Entre estos datos figura la observación (presencia) de una o varias bolsas periodontales, con una profundidad al sondaje mayor o igual a 5mm.

El sondaje se realizó con el medio aislado relativamente con torundas de algodón, empleando una sonda periodontal. La sonda se introdujo con una fuerza de 0.25N y una posición paralela al eje del diente, hasta topar el fondo de la bolsa. Se anotó la profundidad de la bolsa, medida en milímetros, desde el fondo de la misma hasta el margen gingival.

Posterior a esto el tutor especialista en el área de periodoncia que se encontraba en la Clínica Odontológica procedió a confirmar la profundidad de la bolsa realizando el mismo procedimiento de sondaje mencionado anteriormente.

Una vez confirmada la profundidad de la bolsa se procedió a tomar los conos de papel estériles con una pinza algodонера estéril para introducirlos dentro de la bolsa periodontal. Empleamos conos N° 15 en dientes anteriores y conos N° 20-30 en dientes posteriores, los cuales fueron introducidos por un lapso de 40 segundos.

Las muestras colectadas en los conos fueron introducidas dentro de un tubo tipo Eppendorf estéril de vidrio, conteniendo un medio de transporte (caldo tioglicolato). Los tubos fueron transportados al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad Católica de Cuenca para realizar el respectivo cultivo.

5.3.b Cultivo *in vitro* de microorganismos anaerobios

El cultivo de los microorganismos anaerobios presentes en las muestras se realizó en medio de cultivo Agar Sangre (AS) o Agar Chocolate (AGC), los cuales permiten el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*. Las muestras contenidas en los tubos con caldo tioglicolato, se inocularon en la superficie de estos medios de cultivo con la ayuda de un asa de platino estéril, y posteriormente se incubaron 48h a 37 °C, en jarra de anaerobiosis, dentro de una estufa microbiológica. Una vez transcurrido este período de

tiempo, las jarras se abrieron para verificar la presencia de colonias en las cajas de Petri. Para ello se tomó en cuenta el fenotipo de las colonias (morfología) que se detalla a continuación: colonias translúcidas, con bordes irregulares, de superficie rugosa. Frecuentemente se puede distinguir una estructura con forma de estrella en el centro de la colonia.

5.3.c Fenotipo de células

El fenotipo celular se determinó mediante microscopía óptica. Para ello se tomaron muestras a partir de las colonias con el fin de someterlas a tinción de Gram. En breve: se realizó un frotis sobre lámina portaobjeto, se fijó por calor y se realizó la tinción de Gram. Esta consiste en emplear dos tipos de colorantes que define si una bacteria pertenece a un grupo Gram negativo o Gram positivo. Es una prueba sencilla, eficaz y económica que ha sido utilizada desde 1884. Esta prueba se basa en las características de la pared celular de las bacterias, y permite distinguir los dos tipos celulares en base a su respuesta ante la tinción de Gram.

La tinción consiste en depositar cristal violeta en la muestra previamente fijada por calor, el cual se une al peptidoglicano de la pared celular; luego se añade yodo que fija el cristal violeta a los espacios de peptidoglicano; posteriormente se decolora con alcohol-acetona para deshidratar la membrana externa; por último, se añade fucsina que sirve de contratinción, para colorear todas aquellas bacterias que no retuvieron el violeta-yodo.

5.3.d Detección de *A. actinomycetemcomitans* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de las muestras iniciales conservadas en caldo tioglicolato

Como método alternativo para detectar la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, se empleó la técnica de PCR, la cual consiste en amplificar una secuencia específica de nucleótidos, mediante el uso de una ADN-polimerasa termoresistente. Esto permite detectar la presencia de *A. actinomycetemcomitans* a partir de muestras clínicas conservadas (“enriquecidas”) en caldo de tioglicolato, gracias a su material genético. Esta técnica, es extremadamente sensible y específica, permite detectar en forma rápida y a bajo costo, la presencia de cualquier microorganismo, siempre y cuando se disponga de los cebadores (*primers*) específicos. En nuestro caso emplearemos los cebadores *Forward AaF* y *Reverse ConR* ⁽¹²⁾.

Secuencia de 16S ADNr

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Ready y cols. 2008)

- Secuencia 5' y 3'
 - ACGTCATCCCCACCTTCCTC
 - ATTGGGGTTTAGCCCTGGTG

El procedimiento para detectar *A. actinomycetemcomitans* se inició con la extracción del ADN genómico bacteriano total a partir de las muestras clínicas, enriquecidas en caldo tioglicolato. La extracción se realizó mediante lisis bacteriana con una solución de SDS al 1%, seguida de agitación fuerte con agitador vórtex; una vez lisadas las células, se calentó a 100°C durante 10 minutos, para desnaturalizar completamente las proteínas y los ácidos nucleicos.

La amplificación por PCR del gen ADNr 16S de *A. actinomycetemcomitans* se realizó a partir del ADN genómico extraído a partir del cultivo inicial. Para ello se mezclaron los siguientes reactivos:

Primer Forward AaF	1,5µl
Primer Reverse ConR	1,5µl
Buffer Master Mix 10X	10µl
Agua	4µl
ADN genómico	3µl
Vol. Total	20µl

El perfil térmico que se empleó para la amplificación fue el siguiente:

10 min	95°C
40 ciclos	1 min 95°C
	1 min 61°C
	5min 72°C
10 min	72°C

Una vez terminada la amplificación por PCR, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 100 V, por 30 minutos. Los geles fueron teñidos con SYBR Green y visualizados en transiluminador UV. La presencia de una banda 360pb se consideró como una reacción positiva. Como control positivo de amplificación

se utilizó ADN de una cepa ATCC de *A. actinomycetemcomitans* y como control negativo agua destilada estéril.

5.3.f Criterio de registro de hallazgos

Los hallazgos realizados en las diferentes etapas de este proyecto de investigación se registraron de la siguiente en la ficha correspondiente a cada paciente de la siguiente forma (VER ANEXO 4):

a) fenotipo de colonias: en el mismo se anotaron todas las características evaluadas que se mencionaron en el apartado 5.3.b. Se incluyó además en la ficha una fotografía impresa de las colonias observadas.

b) fenotipo de células: en el mismo se anotaron todas las características evaluadas que se mencionaron en el apartado 5.3.c.

c) amplificación por PCR: además de registrar los resultados en el diagrama correspondiente, se incluyó en cada ficha una fotografía del gel de agarosa que contenga la muestra correspondiente.

En caso de verificar hallazgos inesperados, los mismos se registraron en la misma planilla en un apartado denominado “Hallazgos inesperados”.

6.- PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Con los datos obtenidos según se especifica en la sección anterior, se construyó una base de datos, siguiendo las recomendaciones de Torracchi y col.⁽¹³⁾ A partir de esta base de datos se calcularon los siguientes parámetros:

Frecuencia de aparición (“ocurrencia”) de *A. actinomycetemcomitans* en base a métodos microbiológicos (cultivo, microscopía y bioquímica). Esta frecuencia es igual al cociente del total de individuos con resultado positivo, dividido entre el total de individuos estudiados, multiplicado por cien.

Frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* (“ocurrencia”) en base a métodos moleculares (amplificación por PCR). Esta frecuencia es igual al cociente del total de individuos cuyas reacciones de PCR dieron resultado positivo, dividido entre el total de individuos estudiados, multiplicado por cien.

7.- ASPECTOS BIOÉTICOS.

El presente estudio se sometió a evaluación por parte del Comité de Bioética de la Universidad Católica de Cuenca. El mismo que fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Católica de Cuenca, bajo el código Ca25"AGOD33.

CAPÍTULO III
RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1. RESULTADOS

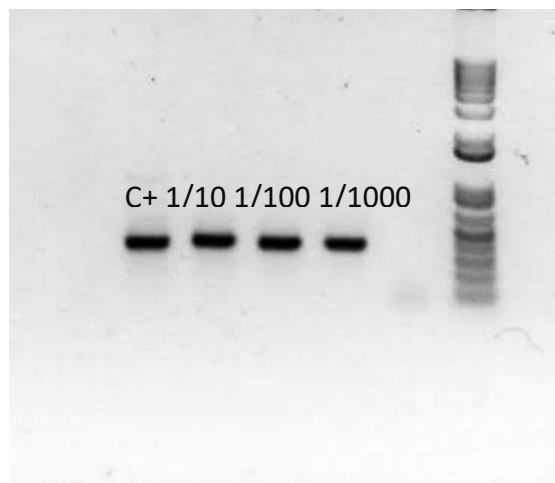
La muestra poblacional estudiada constó de 41 pacientes con Enfermedad Periodontal de progresión lenta, diagnosticada por un especialista experto, que fueron atendidos en la Clínica Odontológica de la UCACE. De estos, 25 (60.98%) eran varones y 16 (39.02%) mujeres. La edad promedio de este grupo de pacientes fue de 41 años, siendo de 42 años en el subgrupo de mujeres y 41 años en el subgrupo de varones. Estos pacientes fueron divididos a su vez en tres subgrupos con rangos de edades que variaban entre 20-67 años de edad (tabla no.1).

Tabla 1: Distribución de la muestra poblacional en función de la edad y el sexo.

Rango de edades	Mujeres	Varones
20 - 35 años de edad	5 (31.25%)	10 (40%)
36 - 51 años de edad	10 (62.50%)	9 (36%)
41 - 67 años de edad	1 (6,25%)	6 (24%)
TOTAL	16 (100%)	25 (100%)

Interpretación: De acuerdo a la tabla No. 1, de 41 pacientes que padecen enfermedad periodontal de progresión lenta, en su mayoría son varones, con un porcentaje de 60.98%; mientras que el restante pertenece al sexo femenino. También podemos observar un predominio en mujeres en el rango de edad de 36-51 años y en varones un predominio por el rango de edad de 20-35 años.

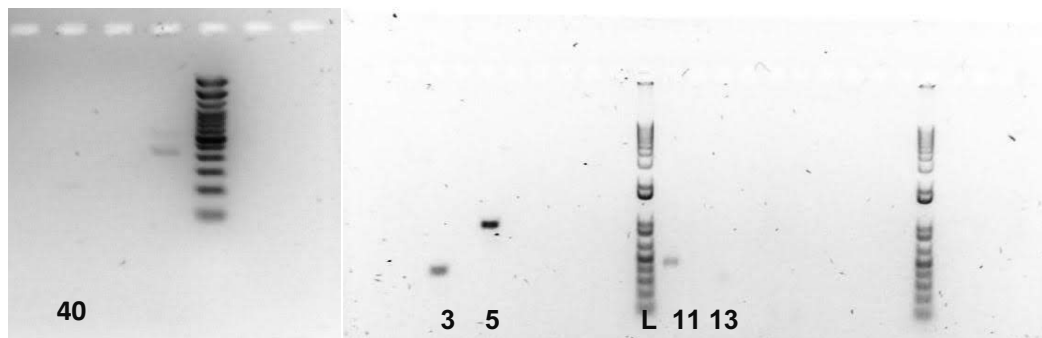
Ilustración 1: Optimización de la técnica de amplificación del gen 16S ADNr de *A. actinomycetemcomitans*, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa.



Interpretación: Con el fin de determinar empíricamente la sensibilidad del método de detección empleado, preparamos diferentes diluciones de ADN genómico de *A. actinomycetemcomitans*: 1/10, 1/100 y 1/1000. Los resultados obtenidos muestran que, aún a la mayor dilución (1/1000) se observa una banda intensa de ADN, cuyo tamaño es el esperado (aprox. 360 pb). Este resultado indica que el método es lo suficientemente sensible como para detectar cantidades muy bajas de ADN genómico de *A. actinomycetemcomitans*.

Con las muestras obtenidas a partir de los 41 pacientes, que fueron tomadas a partir de bolsas periodontales con 5mm o >5mm de profundidad, evaluamos la posible presencia de *A. actinomycetemcomitans* por métodos moleculares (PCR).

Ilustración 2: Electroforesis en geles de agarosa de productos de amplificación por PCR del gen 16s de *A. actinomycetemcomitans*



Interpretación: La presencia de bandas teñidas indica que las muestras de bolsas periodontales contenían células de *A. actinomycetemcomitans*. En total, 5 muestras resultaron positivas, de un total de 41 muestras analizadas.

Tabla 2: Presencia de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta.

A. <i>actinomycetemcomitans</i>	Presencia %	Ausencia %	Total
TOTAL	12,20% (n=5)	87,80% (n=36)	100% (n=41)

Interpretación: De un total de 41 pacientes, se encontró tan solo 5 muestras positivas. Esto indica que existe una baja frecuencia de colonización de *A. actinomycetemcomitans* en bolsas de pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta, que fueron atendidos en la Clínica Odontológica de la UCACUE.

Tabla 3: Ocurrencia de *A. actinomycetemcomitans* en función del sexo de los pacientes.

	Masculinos (n=25)	Femeninos (n=16)
Presencia	n= 1 (4%)	n= 4 (25%)
Ausencia	n= 24 (96%)	n= 12 (75%)
TOTAL	n=25 (100%)	n= 16 (100%)

Interpretación: De las 5 muestras que resultaron positivas para la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, 4 muestras pertenecían a pacientes de sexo femenino (3F, 11F, 13F, 40F) y una a un paciente de sexo masculino (5M). Esto sugiere que podría existir una relación entre la presencia de la bacteria y el sexo de los pacientes.

2. DISCUSIÓN

El presente estudio tenía como objetivo principal determinar, mediante el empleo de métodos moleculares, la ocurrencia de bacterias de la especie *A. actinomycetemcomitans* en bolsas periodontales de pacientes que presentaban enfermedad periodontal de progresión lenta, y que fueron atendidos en la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca. El resultado más relevante que hemos obtenido indica que la frecuencia de colonización es baja, afectando aproximadamente a uno de cada diez pacientes. Hasta donde hemos podido investigar, se trata del primer estudio en su tipo que se realiza en la región del Austro Ecuatoriano.

Entre las estrategias metodológicas disponibles para detectar la presencia de bacterias específicas en muestras clínicas destacan las de tipo microbiológico y las de tipo molecular. Aunque ambas son relativamente eficientes, el método de la PCR es mucho más específico, sensible y rápido de realizar, en comparación a los cultivos microbiológicos, ya que involucra la amplificación de un fragmento de ADN que es absolutamente específico para cada especie de bacteria, lo que nos permite un resultado más confiable ⁽¹¹⁾. Además, por el hecho de multiplicar exponencialmente el número de copias de dicho fragmento, su sensibilidad es extremadamente alta, permitiendo detectar la presencia de las bacterias aún a densidades de colonización muy bajas (“carga bacteriana”).

Sin embargo, como debe hacerse con todo protocolo de laboratorio, es necesario estandarizar y optimizar primero las técnicas que se van a emplear, antes de iniciar los estudios con muestras clínicas. Esto adquiere mayor relevancia en el caso de patógenos periodontales, microorganismos que no se estudian con frecuencia en los laboratorios de diagnóstico y que son difíciles de cultivar. En consecuencia, la necesidad de detección obliga a buscar la estandarización de un protocolo específico y comprobado, para detectar la presencia e incluso identificar bacterias periodontales ⁽¹¹⁾.

Estudios realizados en diferentes países Latinoamericanos sobre la ocurrencia de periodontopatógenos en tejidos de pacientes afectados por distintas periodontopatías, empleando la técnica de PCR convencional, revelan que en Brasil ⁽¹⁹⁾, Uruguay ⁽¹⁵⁾, y Chile ⁽¹⁴⁾, la ocurrencia de *A. actinomycetemcomitans* es relativamente baja, siendo de un 27.6%, 33% y 20% respectivamente. En nuestro estudio, encontramos la presencia del microorganismo en el 12,20% de los pacientes, valor que, a pesar de ser inferior a los reportados previamente en los países anteriormente mencionados, corrobora la baja

prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en enfermedad periodontal de progresión lenta.

En el estudio realizado por Papone y cols. en Uruguay ⁽¹⁵⁾, usando multiplex-PCR, el 33% de los pacientes fueron diagnosticados como portadores de *A. actinomycetemcomitans* en bolsas periodontales. Los autores determinaron una mayor frecuencia de ocurrencia en pacientes de sexo masculino (18%) que en los de sexo femenino (13%), diferencia que resultó ser estadísticamente significativa. Esto se atribuyó al contraste del microambiente hormonal que diferencia la mucosa oral de hombres y mujeres. Pese a que el número de casos positivos identificados en nuestro trabajo no permite realizar análisis estadísticos, pareciera ser que la tendencia en los pacientes evaluados es similar.

Como mencioné, la explicación de estas diferencias relacionadas con el sexo de los pacientes podría deberse a las condiciones del hospedero, particularmente en cuanto a la carga hormonal ⁽¹⁵⁾, pero esto debe ser demostrado de manera fehaciente mediante la realización de estudios más profundos.

En un estudio realizado por Medina y cols. ⁽¹⁷⁾, por método de PCR convencional, se comprobó que *A. actinomycetemcomitans* está presente en tan solo un 5% de los pacientes con periodontitis de progresión lenta, mientras que este valor se incrementa en más de cuatro veces en pacientes con periodontitis agresiva (22,5%). Otros estudios realizados en Colombia ⁽¹⁶⁾ y Uruguay ⁽¹⁸⁾ confirman esta observación, presentando *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis agresiva en porcentajes de 20% y 70% respectivamente.

Las diferencias estadísticas que reflejan los distintos trabajos pueden deberse a diferentes factores asociados al hospedador, como la etnia a la que pertenecen (aspectos genéticos), la higiene bucal, la ubicación geográfica, entre otros. Estos factores pueden o no estar relacionadas con la aparición de ciertos patógenos en la enfermedad periodontal, tal y como ha sido demostrado por Mujica y cols. ⁽¹⁴⁾, Papone y cols. ⁽¹⁵⁾, Gajardo y cols. ⁽²⁰⁾ y Medina y cols. ⁽²¹⁾.

Entre los resultados inesperados destacamos la amplificación de un fragmento de mayor tamaño al esperado a partir de la muestra número 5. Aunque desconocemos la causa de este "artefacto", sugerimos que puede asociarse a rearrreglos cromosómicos, que ocurren con bastante frecuencia en bacterias. Este tipo de rearrreglos suelen dar origen

a duplicaciones génicas; tal podría ser el caso de lo observado en esta muestra, pues el tamaño del fragmento es prácticamente el doble del esperado. La otra posibilidad que podemos mencionar es la aparición de una quimera molecular, esto es, un fragmento de amplificación que se deriva de dos secuencias génicas. Las quimeras son un artefacto bastante frecuente cuando se amplifican genes por PCR.

Entre las limitaciones que hemos podido identificar podemos mencionar el método empleado para extraer el ADN genómico a partir de muestras de bolsas periodontales. En efecto, la lisis bacteriana basada en el empleo de altas temperaturas y detergentes (SDS) ha sido ampliamente empleada en el caso de enterobacterias Gram negativas tales como *Escherichia coli*⁽²²⁾. Es factible, por lo tanto, suponer que este factor puede haber influido en los resultados obtenidos. Sin embargo, en trabajos similares al nuestro se ha empleado el mismo método para la extracción de ADN genómico de *A. actinomycetemcomitans*^(14,15,18). Además, los controles internos incluidos en nuestro estudio funcionaron como se esperaba, lo cual relativiza lo planteado más arriba.

En síntesis, en el presente estudio reportamos una baja ocurrencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en bolsas periodontales de pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta. Los resultados sugieren, además, una posible relación entre la presencia de *A. actinomycetemcomitans* y el sexo de los pacientes. Para corroborar tales resultados es necesario realizar estudios adicionales, en los que se incluya un mayor número de pacientes.

3. CONCLUSIONES

Primera: La frecuencia con la que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se encuentra en las bolsas periodontales de los pacientes con periodontitis de progresión lenta que fueron atendidos en la Clínica Odontológica de la UCACUE fue baja con el 12,20% (n=5).

Segunda: El protocolo de PCR utilizado y estandarizado en nuestro laboratorio, permite la detección de concentraciones muy bajas (dilución 1/1000) de ADN genómico de *A. actinomycetemcomitans*, en forma específica.

Tercera: La identificación se llevó a cabo con un método de Reacción de Cadena de Polimerasa, a partir de primers específicos los cuáles fueron: Primer Forward: AaF y Primer Reverse: ConR.

Cuarta: La ocurrencia de *A. actinomycetemcomitans* en bolsas periodontales pareciera estar relacionada con el sexo de los pacientes.

Quinta: La edad con la que se discriminó a los pacientes de esta investigación, fue a manera de rangos de 15 años de diferencia, para facilitar el procedimiento.

III. BIBLIOGRAFÍA:

1. Escudero. N, Perea. M.A, Bascones. A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Avances en Periodoncia* [Internet]. 2008 [citado 2019 Ene 28]; 20(1): 27-37. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852008000100003&Ing=es.
2. Joshi, VM. Bhat, KG. Kugaji, MS. Ingalgi, PS. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Indian chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults. *J Indian Soc Periodontol* [serial online] 2016 [citado 2019 Ene 28]; 20:141-4. Disponible en: <http://www.jisponline.com/text.asp?2016/20/2/141/175171>
3. Papone, V. Verolo, C. Zaffaroni, L. Batlle, A. Capó, C. Bueno, L. et al. Detección y prevalencia de patógenos periodontales de una población con periodontitis crónica en Uruguay mediante metodología convencional y metagenómica. *Odontoestomatología* [Internet]. 2015 [citado 2019 Ene 28]; 17(25): 23-32. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-93392015000100004&Ing=es.
4. Ardila, CM. Alzate, J. Guzmán, I. Asociación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y microorganismos del complejo rojo con parámetros clínicos de pacientes con periodontitis crónica. *AMC* [Internet]. 2010 [citado 2019 Ene 28]; 14(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552010000300016&Ing=es.
5. Caton, G. Armitage, G. Berglundh, T. Chapple, I. Jepsen, S. Kornman, K. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology* [Internet] 2018 [citado 2019 Ene 28] Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JPER.18-0157>
6. Farias, B. Souza, P. Ferreira, B. Melo, R. Machado, F. Gusmão, E. et al. Occurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis.

- Brazilian J of Microbiol. [Internet]* 2012 [citado 2019 Ene 28]; 43(3): 909:916
Disponibile en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768898/>
7. Díaz, J. Yáñez, J. Melgar, S. Álvarez, C. Rojas, C. Vernal, R. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral [Internet]*. 2012 [citado 2019 Ene 28]; 5(1): 40-45. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072012000100007&lng=es.
 8. Perfecto, D. Nakata, H. Martinez, E. Mendoza, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Patógeno importante en la periodontitis. *Odontología Sanmarquina [Internet]* 2010. [citado 2019 Ene 28]; 13(2): 42-45. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2010_n2/pdf/a10v13n2.pdf
 9. Suhad, H. Ghada, A. PCR Identification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from Subgingival Plaque Samples. *International Journal of Enhanced Research in Science Technology & Engineering. [Internet]*. 2014. [citado 2019 Ene 28]; 3(11): 186-189. Disponible en:
<https://pdfs.semanticscholar.org/2345/a2d3579c697ca1b9681428f56bdabe25556c.pdf>
 10. Flores, Roberto. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Rev. chil. infectol. [Internet]. 2011 [citado 2019 Mayo 27]; 28(6): 579-580. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000700011>.
 11. Medina, ML. Medina, MG. Merino, L. Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. *Enf Inf Microbiol. [Internet]*. 2010 [citado 2019 Ene 28]; 30(3): 83-90. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/264838981_Identificacion_de_bacterias_periodontopatogenas_mediante_metodos_diagnosticos_moleculares
 12. Ready, D. D'aiuto, F. Spratt, D. Suvan, J. Disease severity associated with Presence in Subgingival Plaque of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythia*, Singly or in Combination, as

- Detected by Nested Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* [Internet] 2008 [citado 2019 Sep 30]; 46(10): 3380-3383. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/46/10/3380>
13. Torracchi, E. Córdova, A. Chiriboga, G. Villavicencio, E. Estrategia de análisis de datos (parte1): creación de bases de datos para investigaciones en ciencias de la salud. *Revista OACTIVA UC Cuenca*. [Internet] 2019 [citado 2019 Sep 30]; 4(2):13-20. Disponible en: <http://oactiva.ucacue.edu.ec/index.php/oactiva/article/view/347/524>
 14. Mujica, T. Ruiz, M. Daile, LK. Fuentevilla, IA. Bittner, M. Co-detección de Patógenos Periodontales en Pacientes Chilenos con Periodontitis Crónica. *Rev. Clin. Periodoncia Impantol. Rehabil. Oral*. [Internet] 2010 [citado 2019 Oct 01]; 3(3): 118-122. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072010000300003
 15. Papone, V. Verolo, C. Zaffaroni, L. Batlle, A. Capo, C. Bueno, L. et al. Detección y prevalencia de patógenos periodontales de una población con periodontitis crónica en Uruguay mediante metodología convencional y metagenómica. *Odontoestomatología*. [Internet] 2015 [citado 2019 Oct 01]; 17(25): 23-32. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-93392015000100004
 16. Giraldo, J. Medina, C. Características clínicas y microbiológicas de pacientes con periodontitis agresiva generalizada. *Rev. Clin. Periodoncia Impantol. Rehabil. Oral*. [Internet] 2017 [citado 2019 Oct 01]; 10(3); 153-155. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072017000300153
 17. Medina, C. Botero, L. Zuluaga, I. Comparación de las características sociodemográficas, clínicas y microbiológicas de pacientes con periodontitis agresiva y crónica. *Rev. Arch Med Camagüey*. [Internet] 2014 [citado 2019 Oct 01]; 18(5) 532-534. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552014000500009

18. Badanian, A. Ponce de León, E. Rodríguez, L. Bascuas, T. Capó, C. Battle, A. Bueno, Luis. Et al. Detection of periodontal pathogens in a Uruguayan population with aggressive periodontitis using conventional and molecular methods. *Odontoestomatología*. [Internet] 2018 [citado 2019 Oct 01]; 20(32) 68-77. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-93392018000200068
19. Farias, BC. Souza, PRE. Ferreira, B. Melo, RSA. Machado, FB. Gusmão, ES. Et al. Ocurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. [Internet] 2012 [citado 2019 Oct 01]; 43(3): 909-916. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/256542589_Occurrence_of_periodontal_pathogens_among_patients_with_chronic_periodontitis
20. Gajardo, M. Silva, N. Gómez, L. León, R. Parra, B. Contreras, A. et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J periodontal*. [Internet] 2005 [citado 2019 Oct 14]; 76(2): 289-94. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15974855>
21. Medina, A. Montoya, M. Guzmán, I. Perfil microbiológico subgingival de pacientes con periodontitis crónica en una población de Colombia. *Av Periodon Implantol*. [Internet] 2012 [citado 2019 Oct 14]; 1(47):47-53. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v24n1/original4.pdf>
22. Gómez, L. Daza, S. Zarrantes, V. Estandarización de protocolos de transformación genética de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos genéticos. *Ciencia en Desarrollo*. [Internet] 2018 [citado 2019 Oct 22]; 9(2); 9-16. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cide/v9n2/0121-7488-cide-9-02-9.pdf>

ANEXOS.

Anexo 1

Solicitud del Comité – Medicina



Cuenca, 20/5/2019

El Comité Institucional de Bioética en Investigación en Seres Humanos de la Universidad Católica de Cuenca, Carrera de Medicina.

CERTIFICA

Que ha conocido, analizado y aprobado el **proyecto de investigación** titulado

“AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL DE PROGRESIÓN LENTA QUE ACUDEN A CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA PERIODO MARZO-AGOSTO 2019.”

Trabajo de titulación realizado por Kamila Rafaela Calderón Ruilova


Código: Ca25*AGOD33



DR. CARLOS FLORES MONTESINOS

RESPONSABLE COMITÉ DE BIOÉTICA

Anexo 2
Solicitud de ingreso a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca

 **UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**
 COMUNIDAD EDUCATIVA AL SERVICIO DEL PUEBLO

Cuenca, 06 de mayo de 2019

Od. Esp. Erica Quito V.


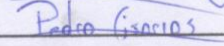
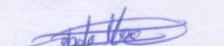
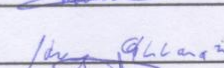

COORDINADORA DE PRÁCTICAS PREPROFESIONALES DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

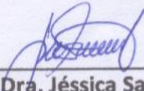
De nuestras consideraciones

Los estudiantes de décimo ciclo **Kamila Calderón, Pedro Cisneros, Fabiola Moscoso, John Orellana y Stephanie Palacios**, solicitamos de la manera más cordial nos autorice el acceso a la clínica general para la recolección de datos y toma de muestras a los pacientes de seguimiento periodontal de los estudiantes de séptimos y novenos ciclos, por motivo de la realización de nuestros trabajos de titulación, los mismos que se encuentran dentro de la investigación: **"Bacterias y Levaduras patógenas en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, período Marzo – Julio 2019."**



Por su atención a la presente, anticipamos nuestros agradecimientos.

Atentamente,

<p>Kamila Calderón</p> <p>Pedro Cisneros</p> <p>Fabiola Moscoso</p> <p>John Orellana</p> <p>Stephanie Palacios</p>	 <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>  <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>  <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>  <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>  <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>
---	---



Mgt. Dra. Jéssica Sarmiento O.
DOCENTE TUTORA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN

Anexo 3.

**Certificado de permiso de funcionamiento del laboratorio químico
microbiológico bromatológico**

 AGENCIA DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DE LOS SERVICIOS
DE SALUD Y MEDICINA PREPAGADA

 MINISTERIO
DE SALUD PÚBLICA

P.F. No. ACESS-2018-Z06-0056547

CERTIFICADO DE PERMISO DE FUNCIONAMIENTO

SERVICIOS DE SALUD

CLASE DE RIESGO : A

De conformidad con lo establecido en la Ley Orgánica de Salud, se confiere el Permiso de Funcionamiento a:

Razon social:	UNIVERSIDAD CATOLICA DE CUENCA	Nombre comercial:	LABORATORIO QUIMICO MICROBIOLOGICO Y BROMATOLOGICO
Propietario o representante legal:	POZO CABRERA ENRIQUE EUGENIO		
No. RUC:	0190032981001	No. establecimiento:	018
Entidad:	PRIVADO	Unicodigo:	28216
Tipo:	ESTABLECIMIENTOS DE SERVICIOS DE SALUD PÚBLICOS Y PRIVADOS / SERVICIOS DE APOYO / LABORATORIO DE ANALISIS CLINICO / Laboratorio de Análisis Clínico de mediana complejidad	Código:	5.2.2
Responsable técnico:	PARDO VICUÑA MARIA DE LOURDES		
Ubicación:			
Provincia:	AZUAY	Cantón:	CUENCA
Dirección:	AV. AMERICAS S/N y HUMBOLT	Parroquia:	CUENCA
Fecha de emisión:	2018-11-18	Barrio:	BELLAVISTA
Fecha de vencimiento:	2019-11-18		

Aprobado por:

ALARCON CALLE JENNIFER ALEXANDRA
DELEGADO/A PROVINCIAL DE LA ACESS

Verifique la validez del certificado



Anexo 5 Ficha Periodontal. Hoja 2.



INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS PARA EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE TITULADO: "Bacterias y Levaduras patógenas en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, período Marzo – Agosto 2019".

FICHA DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR																													
Código de la muestra:		Procedencia: Bolsas Periodontales																											
Bacteria a identificar:	<input type="checkbox"/> Porphyromona gingivalis <input type="checkbox"/> Tannerella Forsythia <input type="checkbox"/> Aggregatibacter actinomycetemcomitans <input type="checkbox"/>																												
PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS																													
Fecha:	Extracción de ADN (SDS-Lisis alcalina-Temperatura)	Cuantificación de ADN _____																											
Fecha:	PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa)	Gen a identificar _____																											
		Primers F: _____ R: _____																											
		<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th style="text-align: center;">Muestras</th> <th style="text-align: center;">Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MM</td> <td>_____ ul x _____</td> <td>=</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Primer F</td> <td>_____ ul x _____</td> <td>=</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Primer R</td> <td>_____ ul x _____</td> <td>=</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>ADN</td> <td>_____ ul x _____</td> <td>=</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Agua</td> <td>_____ ul x _____</td> <td>=</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>_____ ul x _____</td> <td>=</td> <td>_____</td> </tr> </tbody> </table>			Muestras	Total	MM	_____ ul x _____	=	_____	Primer F	_____ ul x _____	=	_____	Primer R	_____ ul x _____	=	_____	ADN	_____ ul x _____	=	_____	Agua	_____ ul x _____	=	_____	Total	_____ ul x _____	=
		Muestras	Total																										
MM	_____ ul x _____	=	_____																										
Primer F	_____ ul x _____	=	_____																										
Primer R	_____ ul x _____	=	_____																										
ADN	_____ ul x _____	=	_____																										
Agua	_____ ul x _____	=	_____																										
Total	_____ ul x _____	=	_____																										
	Protocolo Usado 1.- Desnaturalización inicial: _____ min x _____ °C 2.- _____ ciclos de: Desnaturalización _____ min x _____ °C Alineamiento _____ min x _____ °C Elongación _____ min x _____ °C 3.- Elongación final: _____ min x _____ °C																												
Fecha:	Electroforesis	Protocolo: _____ Volt _____ mA _____ waH _____ min																											

MM: Master Mix
 SDS: Sodio Dodecilsulfato
 F: Forward
 R: Reverse

Anexo 6

Ficha de trabajo en el Laboratorio de Biología Molecular



INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS PARA EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE TITULADO: "Bacterias y Levaduras patógenas en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, período Marzo – Agosto 2019".

RESULTADO DE LA ELECTROFORESIS HORIZONTAL														
Ladder	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ladder	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ladder	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ladder	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

_____ : Colocar el código de la muestra

: Colocar positivo o negativo

Anexo 7 Consentimiento informado – Hoja 1



Código

COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE SERES VIVOS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Título del proyecto de investigación: Bacterias y Levaduras patógenas en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, período Marzo – Agosto 2019.

Institución a la que pertenece el investigador: Universidad Católica de Cuenca.

Nombre del investigador responsable: Dra. Mgt. Jessica María Sarmiento Ordoñez.

Datos de localización del investigador responsable: jsarmiento@ucacue.edu.ec TELÉFONO CELULAR: 0992096954

Nombre del Co- investigador responsable: Dra. Paola Patricia Orellana Bravo

Datos de localización del co-investigador responsable: porellana@ucacue.edu.ec TELÉFONO CELULAR: 0958895616

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

INTRODUCCIÓN

Usted puede hacer todas las preguntas que quiera para entender claramente su participación y despejar sus dudas. Para participar puede tomarse el tiempo que necesite para consultar con su familia y/o amigos, o profesionales del área de conocimiento requerido que usted crea convenientes para decidir si desea participar o no.

Usted ha sido invitado a participar en una investigación sobre Bacterias y Levaduras patógenas en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta, va a ser estudiada en Microbiología Clínica debido a su alta incidencia en problemas de salud periodontal, es por esto que se presenta la necesidad de realizar este estudio, ya que se podría aportar nueva información al medio científico, y de esta manera contribuir en la generación de métodos de control y tratamiento enfocados a esta enfermedad y a esta bacteria específicamente.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Determinar la ocurrencia de Bacterias y Levaduras patógenas en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la clínica odontológica de la Universidad Católica de Cuenca período Marzo-Agosto 2019.

DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

- 1) Creación de una colección de 30 a 50 cepas clínicas de Bacterias y Levaduras patógenas, aisladas a partir de pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta en la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca.
- 2) Cultivo y aislamiento de las cepas de Bacterias y Levaduras patógenas en base al empleo de técnicas de cultivo microbiológico y molecular.
- 3) Determinación de los perfiles de susceptibilidad de las cepas aisladas frente a diferentes agentes antibacterianos.
- 4) Estos resultados, producto de la investigación científica, serán difundidos en al menos un (01) artículo científico publicado en revistas indexadas en Latindex (u otros índices) y dos (02) tesis de grado.

Anexo 8

Consentimiento informado – Hoja 2



RIESGOS Y BENEFICIOS
<ul style="list-style-type: none"> • No existen riesgos para los participantes. • El proyecto permitirá establecer estrategias terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones en pacientes del área médica y odontológica.
CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS
<p>Para nosotros es muy importante mantener su privacidad, por lo cual aplicaremos las medidas necesarias para que nadie conozca su identidad ni tenga acceso a sus datos personales:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. La información que nos proporcione se identificará con un código que reemplazará su nombre y se guardará en un lugar seguro donde solo el investigador tendrán acceso. 2. Si se toman muestras de su persona, estas muestras serán utilizadas solo para esta investigación y destruidas tan pronto termine el estudio. 3. Si usted está de acuerdo, las muestras que se tomen de su persona serán utilizadas para esta investigación y luego se las guardarán para futuras investigaciones removiendo cualquier información que pueda identificarlo (en caso de aplicar se procederá a la anonimización). 4. Su nombre no será mencionado en los reportes o publicaciones.
DERECHOS DEL PARTICIPANTE
<p>Usted puede decidir no participar y si decide no participar solo debe decirse al investigador principal o a la persona que le explica este documento. Además aunque decida participar puede retirarse del estudio cuando lo desee, sin que ello afecte los beneficios de los que goza en este momento.</p> <p>Usted no recibirá ningún pago ni tendrá que pagar absolutamente nada por participar en este estudio.</p>
INFORMACIÓN DE CONTACTO
<p>Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio por favor llame a los siguientes teléfonos 0992096954 o 0958895616 que pertenece a Dra. Mgt. Jessica Sarmiento y Dra. Paola Orellana respectivamente, o envíe un correo electrónico a jsarmiento@ucacue.edu.ec o porellana@ucacue.edu.ec</p> <p>Si usted tiene preguntas sobre este formulario puede contactar al Dr. Carlos Flores Montesinos, coordinador del Comité Institucional de Bioética en Investigación de Seres Vivos de la Universidad Católica de Cuenca, Carrera de Medicina (cflores@ucacue.edu.ec)</p>

Anexo 9
Consentimiento informado hoja 3.



CONSENTIMIENTO INFORMADO	
<p>Comprendo mi participación en este estudio. Me han explicado los riesgos y beneficios de participar en un lenguaje claro y sencillo. Todas mis preguntas fueron contestadas. Me permitieron contar con tiempo suficiente para tomar la decisión de participar y me entregaron una copia de este formulario de consentimiento informado. Acepto voluntariamente participar en esta investigación.</p>	
Firma del participante	Fecha
Firma del testigo <i>(si aplica)</i>	Fecha
Nombre del investigador que obtiene el consentimiento informado: Dra. Mgt. Jessica Sarmiento y/o Dra. Paola Orellana	
Firma del investigador	Fecha

Anexo 10**Solicitud de validación de instrumento de recolección de datos.**

**UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CUENCA**
COMUNIDAD EDUCATIVA AL SERVICIO DEL PUEBLO

Cuenca, 15 de Mayo de 2019

Mgt. Dra. Jéssica Sarmiento O.

DOCENTE TUTORA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN

De nuestra consideración

Reciba un cordial saludo y comunicarle que en respuesta a su petición a la validación del instrumento de recolección de datos, para el proyecto de investigación: **BACTERIAS Y LEVADURAS PATÓGENAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL DE PROGRESIÓN LENTA QUE ACUDEN A LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA, PERIODO MARZO-AGOSTO 2019**; se aprueba el instrumento para el proyecto antes mencionado, ya que fue avalada por los docentes pertinentes en el Área de Periodoncia.

Sin otro particular nos suscribimos de Usted.

Od. Esp. María del Cisne Centeno
DOCENTE TITULAR

Od. Esp. Andrea Paola Pérez Mora
DOCENTE TITULAR

Od. Andrea Paola Pérez Mora
ESP. EN PERIODONCIA
Od. 1007-11-109191
Esp. CL-14-9814