



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

PORPHYROMONAS GINGIVALIS 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 ODONTÓLOGO

AUTOR: Cisneros Cordero Pedro Javier

DIRECTORA: Dra. Orellana Paola MSc.

CUENCA

2019

DECLARACIÓN:

Yo, **Cisneros Cordero Pedro Javier**, 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 intelectual, por su reglamento y normatividad institucional vigente.

Autor: Cisneros Cordero Pedro Javier

C.I.: 0105830855

CERTIFICACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN

Sra. Dra. Liliana Encalada Verdugo

COORDINADORA DEL DPTO. DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado “**PORPHYROMONAS GINGIVALIS 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 **CISNEROS CORDERO PEDRO JAVIER**, 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

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Sra. Dra. Liliana Encalada Verdugo

COORDINADORA DEL DPTO. DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado “**PORPHYROMONAS GINGIVALIS 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 **CISNEROS CORDERO PEDRO JAVIER**, 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

Tutora: Dra. Orellana Bravo Paola

DEDICATORIA.

Dedico el presente trabajo de tesis a Dios, a mi familia y amigos porque gracias a su apoyo incondicional, consejos, experiencias y amistad contribuyeron de forma indispensable a la culminación de mi carrera universitaria y al desarrollo de mí como persona, cuyo objetivo es triunfar y hacer el bien dentro de la sociedad.

EPIGRAFE.

“Todo gran esfuerzo tiene una gran recompensa”, no importa que pierdas o cuántos momentos de la vida tengas que cambiar por estudiar, siempre al final la satisfacción más grande es la superación personal.

Pedro Cisneros

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a Dios, a mis padres, amigos, tutora de tesis, docentes y todas aquellas personas especiales para mí, por hacer que este logro haya sido posible, ya que gracias a su afecto y apoyo he podido convertirme en un profesional, una persona con grandes valores y principios.

LISTA DE ABREVIATURAS

Pg: *Porhyromonas gingivalis*

V: Voltio

Tf: *Tannerella forsythia*

mA: Miliamperio

Td: *Treponema denticola*

Aa: *Agregatibacter actynomycetemcomitans*

Pi: *Prevotella intermedia*

PI: pérdida de inserción

NIC: Nivel de Inserción Clínica

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

LPS: Lipopolisacáridos

Ig: Inmunoglobulina

TAE: Tris Acetato EDTA

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's: Deoxinucleósido trifosfato

SDS: Dodecilsulfato Sódico

NaOH: Hidróxido de sodio

°C: Grados Centígrados

Pb: Pares de bases

µl: microlitros

ml: mililitros

um: micras

N: Normal

W: Watt

ÍNDICE

RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO I.....	15
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	15
1. - PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
2.- JUSTIFICACIÓN	16
3.-OBJETIVOS	18
3.1.- Objetivo general	18
3.2.- Objetivos específicos.....	18
4.- MARCO TEÓRICO.....	18
4.1.- Enfermedad periodontal	18
4.1.a.- Etiología.....	18
4.1.b.- Nueva Clasificación Periodontal 2018 - Periodontitis.....	19
4.1.b.1.- Periodontitis de progresión lenta	20
4.1.b.1.1.- Factores de riesgo de la periodontitis de progresión lenta	20
4.1.b.1.2.- Manifestaciones Clínicas de la periodontitis de progresión lenta	21
4.1.b.1.3.- Microorganismos presentes en la periodontitis de progresión lenta	21
4.1.c. Porphyromonas gingivalis.....	22
4.1.d.- Métodos moleculares de detección de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	25
4.2.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN:.....	27
5.- HIPÓTESIS	30
CAPÍTULO II.....	31
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL.....	31
1.- MARCO METODOLÓGICO	32
2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	32
2.1.- Criterios de selección	32
2.1.a.- Criterios de inclusión:.....	32
2.1.b.- Criterios de exclusión:.....	32
2.2.- Tamaño de la muestra	33
3.- OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	34
4.- INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.....	35

4.1.- Instrumentos documentales	35
4.2.- Instrumentos mecánicos	35
4.3.- Materiales	35
4.4.- Recursos:.....	35
5.- PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS	35
5.1.-Ubicación espacial.....	35
5.2.-Ubicación temporal.....	36
5.3.-Procedimientos de la toma de datos.....	36
6.- PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS DE DATOS.....	38
7.- ASPECTOS BIOÉTICOS.....	38
CAPÍTULO III.....	40
RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	40
1. RESULTADOS	41
2. DISCUSIÓN.....	44
3. CONCLUSIONES.....	46
III.- BIBLIOGRAFÍA:	47
ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Distribución de la muestra, según edad y sexo.....	41
Tabla N°2. Presencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> por PCR	42
Tabla N°3. Presencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> por PCR, según el sexo.....	43

RESUMEN

OBJETIVO: Detectar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* mediante una técnica de Biología Molecular en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, período marzo – agosto 2019. **MATERIALES Y MÉTODOS:** La presente investigación es transversal actual, descriptivo. La población incluida fue de 41 pacientes con periodontitis de progresión lenta. Las muestras fueron tomadas mediante la colocación de conos estériles en bolsas periodontales mayores o iguales a 5mm durante 20 segundos y transportados en un medio de Tioglicolato para posteriormente ser analizadas a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. **RESULTADOS:** Se detectó la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en bolsas periodontales de pacientes que padecían periodontitis de progresión lenta a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Además, la presencia de *Pg* en estos individuos fue de 12,2% y su mayor incidencia se produjo en el sexo femenino.

PALABRAS CLAVE: *Porphyromonas gingivalis*, periodontitis, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ABSTRACT

AIM: Detect the presence of *Porphyromonas gingivalis* using a Molecular Biology technique in patients with slow progression periodontal disease who attend the Dental Clinic of the Catholic University of Cuenca, period March - August 2019. **MATERIALS AND METHODS:** The present investigation is current, descriptive, cross-sectional, the population included was 41 patients with slow progression periodontitis. The samples were taken by placing sterile cones in periodontal pockets greater than or equal to 5mm for 20 seconds and transported in a thioglycolate medium to later be analyzed through the Polymerase Chain Reaction technique. **RESULTS:** The presence of *Porphyromonas gingivalis* was detected in periodontal pockets of patients suffering from slow progression periodontitis through the Polymerase Chain Reaction technique. In addition, the presence of *Pg* in these individuals was 12.2% and its highest incidence occurred in the female sex.

KEYWORDS: *Porphyromonas gingivalis*, slow progression periodontitis, Polymerase Chain Reaction.

INTRODUCCIÓN.

La periodontitis se define como el proceso inflamatorio crónico que afecta el periodonto de inserción (ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular) ⁽¹⁾, su forma crónica o de progresión lenta, es la más común de las formas de periodontitis y se considera una causa significativa de pérdida dental ⁽²⁾.

La periodontitis de progresión lenta se determina por el sangrado al sondaje, bolsas periodontales, pérdida de la inserción epitelial y ósea, movilidad dental y migraciones patológicas ⁽¹⁾. Tiene una etiología bacteriana producida principalmente por las bacterias pertenecientes al complejo rojo, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, y *Treponema denticola* ⁽³⁾.

Una investigación en la Universidad de Córdoba, Argentina nos indica una mayor presencia de *Porphyromonas gingivalis* mediante el método molecular de Reacción en cadena de la Polimerasa con un 66% ⁽⁴⁾ lo cual coincide con un estudio realizado en la Universidad de Antioquia en Colombia, con una prevalencia del 62,5% ⁽⁵⁾.

La presente investigación, no presenta estudios realizados en nuestro país, por lo que se va a desarrollar con la finalidad de comparar si la presencia de este patógeno en las bolsas periodontales tiene similitud con la encontrada en otros proyectos a nivel internacional.

La presente investigación se realiza con el objetivo de detectar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en bolsas periodontales de pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. - PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

La enfermedad periodontal es una de las patologías más comunes en el mundo. Es producida principalmente por tres bacterias Gram negativas anaerobias estrictas, pertenecientes al complejo rojo, una de ellas es *Porphyromonas gingivalis*. Estas bacterias se ubican a nivel de las bolsas periodontales, lugar donde a través de sus factores de virulencia, intervienen en la destrucción de tejidos periodontales.

Las bacterias anaerobias estrictas son microorganismos de difícil cultivo, por ello para su detección se utiliza un método más rápido, sensible y específico como es la “Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)”. Múltiples estudios han utilizado la PCR como una técnica de identificación de las bacterias principalmente asociadas a la enfermedad periodontal, sin embargo, a nivel local y nacional no existen investigaciones acerca de este tema, lo cual abre la posibilidad de ser pioneros en la realización de este estudio, además de brindar la información necesaria para la elaboración de futuras investigaciones.

Por lo tanto, esto nos lleva a plantearnos la siguiente pregunta:

¿Se puede desarrollar una técnica de PCR para la detección de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, período marzo – agosto 2019?

2.- JUSTIFICACIÓN

La presente investigación está enfocada en detectar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca en el período marzo – agosto 2019.

Este estudio es el primero que se realiza a nivel nacional para identificar a este periodontopatógeno mediante una técnica sensible, específica y reproducible como es la PCR. Esto contribuye a la actualización y presentación de nueva información a la comunidad científica, puesto que permitiría conocer si *Porphyromonas gingivalis* está presente en bolsas periodontales de pacientes con este tipo de enfermedad periodontal en nuestra población y si el protocolo utilizado hace posible corroborar esta presencia.

En cuanto a la relevancia humana, este estudio permite a la persona conocer una de las causas de su enfermedad. A nivel personal la realización de la presente investigación me ayudará a obtener el título en Odontología.

Este estudio se establece acorde a las líneas de investigación y tópicos pertinentes dentro de la Carrera de Odontología, por lo que tienen concordancia con las políticas institucionales de investigación.

3.-OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Detectar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* mediante una técnica de Biología Molecular en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta que acuden a la Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, período marzo – agosto 2019.

3.2.- Objetivos específicos

- ✓ Identificar *Porphyromonas gingivalis* en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- ✓ Determinar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta por PCR, según el sexo.

4.- MARCO TEÓRICO

4.1.- Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal constituye un conjunto de enfermedades infecciosas que son el resultado de la inflamación de los tejidos gingivales y periodontales conjuntamente con la pérdida ósea progresiva, producidas en el transcurso del tiempo. Puede tener periodos de actividad e inactividad ⁽⁶⁾.

Este término se emplea para referirse a las diversas enfermedades que afectan a los tejidos de soporte, y entre las más comunes tenemos a la gingivitis y a la periodontitis ⁽⁷⁾.

4.1.a.- Etiología

Su etiología es multifactorial y están involucrados los factores del huésped, ambiente y factores de carácter infeccioso asociados a la presencia de la placa dental o biofilm ⁽⁸⁾.

Las bacterias periodontopatógenas son la causa principal de las periodontitis, sin embargo, los microorganismos pertenecientes al complejo rojo, tales como la *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y el *Treponema denticola*, son los principalmente asociados al inicio, progresión y severidad de esta patología ^(5,9).

Estas bacterias generalmente no se encuentran solas, sino en combinación con otros periodontopatógenos en las bolsas periodontales, por lo que pueden causar destrucción periodontal de forma cooperativa ⁽¹⁰⁾.

4.1.b.- Nueva Clasificación Periodontal 2018 - Periodontitis

A. Etapas o estadios: se considera la severidad, complejidad, extensión y distribución. Mediante estas etapas es posible clasificar la gravedad y alcance de esta enfermedad en cada paciente a través de la cantidad medible de los tejidos de soporte afectados, inclusive la pérdida dental provocada por la periodontitis ⁽¹¹⁾.

- ✓ **Estadio I:** Pérdida de inserción (PI) interproximal 1 – 2 mm o pérdida de tejido óseo en el tercio coronal, profundidad de sondaje (PS) hasta 4 mm, sin pérdida dental provocada por periodontitis y patrón de pérdida ósea horizontal ⁽⁷⁾.
- ✓ **Estadio II:** PI interproximal de 3 – 4mm o pérdida de tejido óseo en el tercio coronal. PS hasta 5 mm sin pérdida dental provocada por periodontitis y patrón de pérdida ósea horizontal ⁽⁷⁾.
- ✓ **Estadio III:** PI interproximal de 5mm o más o pérdida de tejido óseo radiográfico que se extiende al tercio medio o apical. PS \geq 6 con pérdida de hasta 4 dientes producido por periodontitis ⁽⁷⁾.
- ✓ **Estadio IV:** PI interproximal \geq 5mm, pérdida ósea radiográfica hasta el tercio medio o apical. Pérdida dental de 5 dientes o más por periodontitis, disfunción masticatoria, movilidad tipo II o III, defectos severos del reborde alveolar, menos de 20 dientes restantes ⁽⁷⁾.

La etapa inicial se determina mediante el sondaje con el objetivo de evaluar la pérdida de inserción clínica. En caso de no presentar esta pérdida, se evaluará la pérdida ósea radiográfica ⁽¹¹⁾.

B. Grado: Indica el grado de progresión de la enfermedad, su capacidad de respuesta frente al tratamiento convencional y el impacto en la salud sistémica. Se determina en 3 grados:

- ✓ **Grado A (progresión lenta):** no hay progresión de PI durante los últimos 5 años, pérdida ósea de hasta 0,25 mm, pacientes con gran cantidad de biofilm acumulado, leve destrucción periodontal ⁽⁷⁾.
- ✓ **Grado B (progresión moderada):** progresión de menos de 2 mm durante los últimos 5 años, pérdida ósea de 0,25 hasta 1 mm, destrucción periodontal compatible con los depósitos de biopelícula. ⁽⁷⁾.

- ✓ **Grado C (alto riesgo de progresión rápida):** progresión ≥ 2 mm durante los últimos 5 años, pérdida ósea mayor a 1 mm, la destrucción periodontal supera las expectativas por acúmulo de biofilm. ⁽⁷⁾.

C. Extensión y distribución: es de forma localizada (menos del 30% de dientes afectados) y generalizada (más del 30%), con la adición de patrones incisivo - molar ⁽¹¹⁾.

4.1.b.1.- Periodontitis de progresión lenta

Es una enfermedad crónica, infecciosa, inflamatoria y multifactorial de lento progreso, asociada a la formación de biopelícula (biofilm) y caracterizada por presencia de bolsas periodontales (profundización patológica del surco gingival), inflamación de los tejidos de soporte, pérdida ósea y progresiva de inserción dental ^(7, 12).

El progreso de esta patología puede producir movilidad, pérdida dental, alteración en las funciones de la masticación y estética, provocando efectos negativos en el bienestar y la calidad de vida de en las personas ⁽¹²⁾.

Es una de las enfermedades más comunes y frecuentes a nivel mundial, sobre todo en la población adulta, aunque también puede presentarse en niños y adolescentes producto de la acumulación de placa bacteriana y cálculos ^(9,12).

La composición bacteriana de la biopelícula puede variar entre poblaciones e incluso en individuos con similares características clínicas y demográficas ⁽⁴⁾.

4.1.b.1.1.- Factores de riesgo de la periodontitis de progresión lenta

En la periodontitis de progresión lenta, los factores de riesgo pueden ser una parte causal de la enfermedad o pueden predisponer al huésped a su desarrollo ⁽¹³⁾.

Un individuo que presente un factor de riesgo o más tiene mayor probabilidad de contraer la enfermedad o al progreso de la misma ⁽¹³⁾.

Entre estos encontramos: factores locales como la acumulación de placa bacteriana en superficies dentales y gingivales, existencia previa de la enfermedad, restauraciones defectuosas y la formación de cálculo dental ^(14,15); factores sistémicos (Diabetes Mellitus); factores genéticos; edad; estrés; tabaquismo; sexo y nivel socioeconómico ⁽¹⁵⁾.

4.1.b.1.2.- Manifestaciones Clínicas de la periodontitis de progresión lenta

La periodontitis de progresión lenta generalmente es indolora y puede presentar las siguientes manifestaciones clínicas: pérdida del nivel de inserción (NIC) en dos o más sitios interproximales no adyacentes o PI de 3 mm o más en las caras vestibular o palatina /lingual, presencia de placa y cálculo supra y subgingival, inflamación gingival, supuración ocasional, márgenes gingivales enrollados o romos, papilas aplanadas en forma de cráter, alteraciones del color, textura y volumen de la encía marginal, sangrado al sondaje en la zona con bolsa periodontal, pérdida de hueso alveolar, exposición de furca radicular, exfoliación de los dientes, movilidad dentaria y migración dental ^(13, 15).

En todas estas situaciones pueden afectarse a un número variable de piezas dentales en función de cada persona, con tasas variables de progresión ⁽¹⁶⁾.

4.1.b.1.3.- Microorganismos presentes en la periodontitis de progresión lenta

Diversas son las bacterias presentes en la periodontitis, estas presentan factores de virulencia potenciales e inducen factores inflamatorios del huésped, lo cual favorece la descomposición del tejido conectivo y resorción alveolar, es por ello que intervienen en la severidad, rapidez y progresión de la enfermedad ^(17,18).

Las bacterias periodontales están presentes en el biofilm, y el huésped es el que puede o no desencadenar la enfermedad debido a que los factores asociados con la periodontitis deben participar de manera conjunta con la infección bacteriana ⁽¹⁷⁾.

Pese a que existe gran variedad de especies presentes activamente en la enfermedad periodontal, son las bacterias anaerobias estrictas del complejo rojo, las que más se identifican con esta patología al ser las más patógenas y de mayor proporción, entre ellas encontramos *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*. Otras bacterias también consideradas como principales agentes infecciosos y que contribuyen con la destrucción tisular periodontal son *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum* ⁽¹⁷⁾.

4.1.c. *Porphyromonas gingivalis*

A. Generalidades

Es un bacilo corto o cocobacilo, Gram negativo, anaerobio estricto, no móvil, que mide de 0.5 – 0.8 µm de ancho x 1 – 35 µm de largo, es miembro fundamental de la microbiota patógena en varias enfermedades periodontales caracterizadas por la pérdida de hueso alveolar ^(3, 13, 19).

Pertenece al complejo rojo, está relacionado con el inicio y progresión de la periodontitis, la saliva contribuye a su colonización a través de las fimbrias ya que permiten la adhesión a las superficies sólidas de la cavidad oral ⁽²⁰⁾.

Los factores de virulencia le proporcionan la capacidad de invadir los tejidos periodontales, modular la respuesta inmune del huésped, desencadenar una respuesta inflamatoria crónica e intervenir en la destrucción periodontal. Es indispensable en la disbiosis dentro de la microbiota oral ⁽²¹⁾. Por estas características se considera a esta bacteria como el principal patógeno de la enfermedad periodontal ⁽²¹⁾.

B. Estructura bacteriana

Estas bacterias presentan pared celular, una membrana externa (endotoxinas -LPS) e interna, tienen cápsula, no producen esporas, no poseen flagelos y contienen fimbrias en gran cantidad ^(3, 22).

A nivel superficial presentan vesículas con enzimas de 30 a 100 nm de diámetro en su interior que participan en la coagregación y colonización en células de la cavidad oral, además tiene capacidad de degradar compuestos proteicos ^(3, 22).

C. Factores de Virulencia

Capacidad de un organismo para producir una enfermedad o interferir en los procesos metabólicos o fisiológicos del hospedero ⁽⁹⁾.

Este periodontopatógeno induce respuesta humoral y celular del hospedador. Esta respuesta inmune frente a *Porphyromonas gingivalis* perpetua el estado inflamatorio al intervenir con los mecanismos productores de citoquinas y muerte celular del huésped, lo que resulta en la destrucción tisular ⁽²²⁾.

Para que los factores de virulencia ejerzan su acción, es necesario que las bacterias encuentren un nicho ecológico adecuado para establecerse, crecer y multiplicarse ⁽²⁰⁾.

Factores de virulencia involucrados en la colonización en invasión

a) Fimbrias

Son estructuras filamentosas localizadas en la superficie de *Porphyromonas gingivalis*, que intervienen en la invasión de los tejidos periodontales, adhesión a las células epiteliales, coagregación con otras bacterias ⁽²³⁾ y la colonización de la cavidad bucal, por lo que están consideradas como el principal y más importante factor de virulencia de este microorganismo ⁽²²⁾.

Además, interviene en la respuesta inflamatoria ya que induce la secreción de citoquinas, que activa la destrucción ósea y de tejidos periodontales ⁽⁹⁾.

Están compuestas por una subunidad proteica denominada fimbrilina ⁽⁹⁾.

b) Membranas

Es aquella que separa las bacterias del ambiente externo, está constituida por proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros elementos de su entorno ⁽²³⁾.

Las bacterias Gram-negativas poseen dos tipos de membranas citoplasmáticas, una externa y otra interna; la región comprendida entre estas dos membranas se denomina periplasma o espacio periplasmático, que contiene la estructura de la pared celular, lípidos y proteínas ⁽²³⁾.

Funciones: contienen maquinaria para la respiración, detección de señales ambientales, transporte de compuestos y macromoléculas hacia dentro y fuera de la célula y contienen proteínas que sirven de mediadores de la adhesión de los tejidos del huésped ⁽²³⁾.

Factores de virulencia involucrados en la modulación del sistema inmune:

a) Lipopolisacárido

Es un componente de la membrana externa de los Gram negativos ⁽⁹⁾.

Posee tres componentes:

- ✓ Polisacáridos en el exterior
- ✓ Oligosacárido en el centro
- ✓ Lípido A en el interior – es la más activa ⁽⁹⁾.

Funciones

- ✓ Estimulación de la inflamación
- ✓ Activación de leucocitos polimorfonucleares
- ✓ Activación de macrófagos
- ✓ Estimulación de la resorción ósea
- ✓ Estimulación de la síntesis de prostaglandinas ⁽²³⁾.

b) Cápsula

- ✓ Es un factor de virulencia antifagocitario, compuesto en su mayoría por polisacáridos ⁽²⁴⁾.
- ✓ Pueden ser encapsuladas o no encapsuladas, las primeras son las de mayor virulencia, las más invasivas y generadoras de infecciones más severas, las no encapsuladas son menos invasivas y generan abscesos localizados ⁽²²⁾.

Funciones: protección contra lesiones físicas, fuente de alimento en períodos de inanición y resistencia considerable a la fagocitosis ⁽²³⁾.

c) Proteasas de Cisteína:

Gingipainas

- ✓ Implicadas en la patogénesis de la periodontitis ya que degradan las proteínas del huésped para ser utilizadas en el crecimiento y metabolismo de la bacteria, lo cual altera la función celular ocasionando la destrucción tisular.
- ✓ Inhiben los mecanismos de defensa del huésped y de resistir los ataques del mismo.
- ✓ Inducen la quimiotaxis en los leucocitos polimorfonucleares, por lo que en sitios de destrucción de tejido óseo y blando aumenta su concentración.
- ✓ Modifican la función del neutrófilo, por lo que al no cumplir el objetivo de eliminar al patógeno generan daño colateral a los tejidos periodontales.
- ✓ Están involucradas en el desarrollo de la biopelícula ⁽⁹⁾.

Lisina y Arginina

Ayudan a la adhesión de la bacteria, por lo que son indispensables en etapas iniciales de colonización bacteriana ⁽⁹⁾.

d) Proteasas de inmunoglobulinas (IgA1, IgA2, Ig)

A través de estas proteasas *Porphyromonas gingivalis* reduce la concentración del anticuerpo IgG en fluido gingival del surco, lo que facilita su crecimiento en la microbiota periodontopática ⁽²²⁾.

Factores de virulencia involucrados en la degradación de tejidos del huésped

a) Colagenasa

Se encuentran en la pared celular y son las encargadas de hidrolizar el colágeno ⁽²²⁾.

4.1.d.- Métodos moleculares de detección de *Porphyromonas gingivalis*

Reacción en cadena de Polimerasa (PCR)

Es una reacción enzimática in vitro simple, rápida, con alta sensibilidad, especificidad y eficacia, que consiste en la síntesis de grandes cantidades de ADN con una secuencia específica, cuyo producto final es una copia fiel de esta secuencia inicial, es decir, un ácido nucleico de doble cadena complementaria a la original ⁽²⁴⁾.

Este método tiene una estrecha relación con el diagnóstico de la enfermedad periodontal, ya que por su capacidad de detectar con precisión especies con poblaciones mixtas permite la identificación directa de patógenos periodontales en la biopelícula supra y subgingival, y por lo tanto esclarecer el papel de las bacterias específicas como agentes causales de alguna enfermedad periodontal. ^(24, 25, 26, 27).

Esta reacción incluye para su realización, reactivos como: la molécula de ADN de doble cadena (muestra); dos primers (oligonucleótidos iniciadores); GoTaq Master Mix que contiene: Go Taq Green polimerasa, dNTP's; buffer de reacción, magnesio, agua y tampón de depósito ^(24, 28).

Este proceso se realiza en un equipo denominado termociclador que permite el cambio de temperatura en diferentes gradientes ⁽²⁴⁾.

Elementos Químicos

El elemento más importante en esta reacción es el ADN, ya que ofrece diversas ventajas de manipulación ⁽²⁸⁾.

- a) **ADN polimerasa:** Interviene en la catálisis de la reacción, formando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia original. La enzima más utilizada es la Taq polimerasa ⁽²⁸⁾.
- b) **Primers:** Son secuencias de oligonucleótidos que protegen y delimitan la secuencia inicial que se desea amplificar y son complementarios a este ⁽²⁸⁾.
- c) **dNTP's:** Son bases nitrogenadas que conjuntamente con la Taq polimerasa construyen nuevas cadenas de ADN ⁽²⁸⁾.
- d) **Magnesio:** Influye en la especificidad de la reacción, debe presentar una concentración adecuada para no afectar el rendimiento del Taq Polimerasa ⁽²⁸⁾.
- e) **Agua:** Es el disolvente de la reacción, se utiliza en su forma destilada libre de nucleasas (degradan los ácidos nucleicos) ⁽²⁸⁾.
- f) **Tampón de depósito/ buffer de carga:** Este buffer de carga confiere alta densidad, lo cual permite a la muestra introducirse en el fondo del pocillo de gel, además posee colorantes que nos indican cuando debe detenerse la electroforesis ⁽²⁹⁾.

Etapas

a) Extracción de ADN:

Para extraer ADN de la muestra se usa la solución de lisis formada por SDS (dodecilsulfato sódico) al 1% en NaOH 0.25 N y ebullición ⁽³⁰⁾.

b) Amplificación:

- ✓ **Desnaturalización:** es la separación de las cadenas de ADN de doble hélice, por calentamiento a una temperatura de 90 - 95 ° C, durante 20 – 30 s.
- ✓ **Hibridación:** se produce el enfriamiento de la mezcla, con lo que la temperatura se reduce a 40 – 60 ° C. Las cadenas previamente separadas o complementarias se hibridan con los primers. Se forma el complejo templado – primers.
- ✓ **Extensión:** La temperatura aumenta nuevamente de 70 a 75 ° C, pero la óptima es de 72 ° C ^(24, 28).

c) Electroforesis

Finalmente se realiza la electroforesis en gel de Agarosa al 1,5% con los amplicones obtenidos en la PCR antes mencionada ⁽³⁰⁾.

4.2.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN:

En el artículo: **Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica**. Rojo N et al, presentaron este estudio con el propósito de determinar la prevalencia, severidad y extensión de la periodontitis crónica asociadas con la edad, sexo, estado civil, escolaridad y economía mensual, donde se observó que la prevalencia de esta enfermedad fue de 67,2%, la severidad de 2.29 mm y la extensión de sitios afectados fue del 55.70%, los varones mostraron una mayor severidad, a mayor educación se encontró menor severidad y extensión de la enfermedad, y finalmente presentaron menor severidad los individuos que percibían por lo menos un salario mensual. Con respecto a la ocupación y estado civil no mostraron diferencias significativas.

En el artículo: ***Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica**, Ramos D, presentó una revisión de este microorganismo y sus características más importantes, de esta forma da a conocer que los factores de virulencia de estas bacterias las tornan muy agresivas, además que en el surco gingival encuentran un ambiente adecuado para su crecimiento y producen una destrucción lenta de los tejidos de soporte dental. Por su gran predominio es que ha sido considerada como factor de riesgo en enfermedades sistémicas inflamatorias. Son por estas razones que *Porphyromonas gingivalis* tiene gran relevancia en la periodontitis crónica como en otras enfermedades periodontales.

En el artículo: **Detección de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes adultos con periodontitis crónica**. Paniagua A et al, realizaron este estudio con el objetivo de detectar la presencia de este microorganismo en pacientes que padecen periodontitis crónica en la clínica de Periodoncia en Antopofagasta, Chile, mediante técnicas microbiológicas y moleculares, en la cual a través del cultivo microbiológico se encontró *P. gingivalis* en un 75,7%, y mediante la técnica de PCR se confirmó la presencia de este periodontopatógeno en un 84,2%, concluyendo que existe alta prevalencia de este microorganismo en pacientes con este tipo de enfermedad periodontal a través de estos dos métodos.

En el artículo: **Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Agregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación con la periodontitis**. Díaz et al, desarrollaron este estudio con el objeto de describir los factores de virulencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* de forma que permita discutir su variable de patogenicidad a través de sus serotipos y genotipos.

El resultado de esta investigación permitió conocer que los genotipos y serotipos de estos periodontopatógenos inducen una respuesta inmuno – inflamatoria diferente en el huésped, por lo cual es posible asociarlos a una variable de patogenicidad y proporcionar una pauta que determine las características clínicas de la enfermedad.

En el artículo: **Diseño y estandarización de la técnica PCR para *Porphyromonas gingivalis***. Britos M et al, realizaron el presente estudio con el objetivo de diseñar y estandarizar la técnica PCR de este microorganismo en líquido gingival de pacientes con periodontitis crónica. Se utilizaron cebadores para gen que codifica para el ARNr 16 s, se extrajo material genético de la cepa ATCC 33277 de *P.gingivalis*, se amplificó y concentró la mezcla de reacción. Esta técnica se aplicó en 10 muestras de las cuales seis mostraron una banda compatible con *Porphyromonas gingivalis* además de obtener una sensibilidad de 15 ug / ml de ADN purificado, esto permitió estandarizar la técnica de PCR para la detección de este periodontopatógeno.

En el artículo: **Detección y prevalencia de patógenos periodontales en una población con periodontitis crónica en Uruguay mediante metodología convencional y metagenómica**, Papone et al, realizaron esta investigación con el objetivo de conocer cuál de las siguientes especies de bacterias: *Porphyromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans (Aa)*, *Tannerella forsythia (Tf)*, *Fusobacterium nucleatum (Fn)* y *Prevotella intermedia (Pi)*, están presentes en bolsas periodontales de 51 pacientes con periodontitis crónica mediante la utilización de la técnica convencional microbiológica y multiplex-PCR. Los resultados demostraron la presencia de *Aa* y bacterias anaerobias en un 33% y 100% de los cultivos microbiológicos respectivamente. A través de la aplicación del método multiplex-PCR obtuvieron que las bacterias más prevalentes fueron *Fn* (100%) *Tf* (92%) y *Pg* (88%) y las de menor prevalencia *Pi* (39%) y *Aa* (33%).

En el artículo: **Evaluación de la terapia mecánica periodontal en bolsas profundas: Respuesta clínica y bacteriológica**, Bazzano G, Parodi R, Tabares S, Sembaj A desarrollaron este estudio con el propósito de identificar a través de la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa, la presencia bacteriana en pacientes con periodontitis crónica con bolsas periodontales \geq a 5mm al inicio, durante y después del tratamiento periodontal. Los resultados previos al inicio del tratamiento evidenciaron una mayor prevalencia de *Pg* (66%), *Tf* (55%) y *Td* (41%), lo cual se redujo significativamente postratamiento, esto demuestra que el raspado y alisado radicular produce una mejoría en

los parámetros clínicos y reducción en la prevalencia de las bacterias periodontopatógenas en bolsas periodontales profundas.

En el artículo: **Ocurrencia de patógenos periodontales entre pacientes con periodontitis crónica**, Farias B et al, realizaron este estudio para evaluar la presencia de los patógenos periodontales que forman el complejo rojo: *Tannerella forsythia* (Tf), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) y *Treponema denticola* (Td) y *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) en 29 pacientes diagnosticados con periodontitis crónica, cuyas muestras fueron tomadas de 4 sitios (116 en total) con mayor profundidad de sondaje. Las muestras fueron procesadas mediante la técnica PCR, lo cual evidenció una presencia del 46,6 %, 41,1%, 33,6% y 27,6% para Pg, Tf, Td y Aa respectivamente, esto demuestra que las bacterias pertenecientes al complejo rojo tienen relación con la periodontitis crónica al existir una alta ocurrencia de los mismos en bolsas periodontales profundas.

En el artículo: **Comparación de las características sociodemográficas, clínicas y microbiológicas con periodontitis agresiva y crónica**, Ardila C et al, desarrollaron el estudio con el objetivo de comparar estas características entre pacientes con periodontitis crónica y agresiva. En esta investigación incluyeron a 94 pacientes de los cuales 40 padecían periodontitis crónica, 40 periodontitis agresiva y 14 sin controles de periodontitis. Las muestras fueron tomadas en sitios con profundidad de sondaje ≥ 5 mm y procesadas mediante la técnica PCR. Los resultados evidenciaron una mayor presencia de *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (62,5% para ambos casos) en el grupo de periodontitis crónica y una mayor prevalencia de *Agregatibacter actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis agresiva con 22.5%.

En el artículo: **Detección de los organismos del complejo rojo en periodontitis crónica por multiplex - Reacción de cadena de la polimerasa**, Nayak A et al, desarrollaron este estudio a 170 pacientes con periodontitis crónica con bolsas periodontales ≥ 5 mm con el fin de detectar a las bacterias pertenecientes al complejo rojo, a través de la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los resultados evidenciaron un total de 106 muestras positivas de 170, con una mayor prevalencia de *Porphyromonas gingivalis* (43,48%), *Treponema denticola* (66,09%) y *Tannerella forsythia* (67.84%).

En el artículo: **Co-detección de Patógenos Periodontales en Pacientes Chilenos con Periodontitis Crónica**, Mujica T et al, realizaron este estudio con el objetivo de determinar mediante la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa cuales son las principales bacterias asociadas con esta patología con bolsas periodontales \geq a 6mm. Se incluyeron a 67 pacientes con periodontitis crónica de los cuales 39 muestras resultaron positivas para *Treponema denticola* (Td), 20 para *Tannerella forsythia* (Tf), 21 para *Porphyromonas gingivalis* (Pg), 60 para *Fusobacterium nucleatum* (Fn) y 11 para *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). En 3 muestras no hubo detección de ninguna de las bacterias analizadas. Según el género hubo mayor incidencia de Tf, Fn y Aa en mujeres.

5.- HIPÓTESIS

La presente investigación no requiere de hipótesis al ser un estudio de tipo descriptivo.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1.- MARCO METODOLÓGICO

- **Enfoque:** Cuantitativo
- **Diseño de investigación:** Descriptivo ⁽³¹⁾
- **Nivel de investigación:** Exploratorio

Tipo de Investigación:

- **Por el ámbito:** De campo y laboratorio
- **Por la técnica:** Observacional
- **Por la temporalidad:** Transversal actual

2.- POBLACIÓN Y MUESTRA

La población de estudio fue no probabilística, no es representativa de todo el universo de dicha población. A pesar de que se tuvo acceso a los pacientes que asisten a la clínica odontológica, no se seleccionaron por criterio estadístico debido a que no se dispone de una lista completa de personas que conforman dicha población; la cifra actual es el total de pacientes con periodontitis de progresión lenta atendidos por estudiantes de la Carrera de Odontología de la Universidad Católica de Cuenca en el período marzo – agosto 2019. Esta población fue seleccionada según criterios previamente establecidos por el investigador (la presencia de la patología).

2.1.- Criterios de selección: Para la formalización de la población se tuvo en cuenta los siguientes criterios de selección:

- **2.1.a.- Criterios de inclusión:** Se incluyeron en el presente estudio, las personas que acudieron a las Clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca en el período marzo – agosto 2019 y que presentaban enfermedad periodontal de progresión lenta con profundidad de sondaje $\geq 5\text{mm}$ y a los pacientes que firmaron su consentimiento informado y aceptaron participar en el estudio.
- **2.1.b.- Criterios de exclusión:** Se excluyeron a personas, que hayan recibido tratamiento antibiótico en los últimos seis meses, que no presenten periodontitis progresión lenta o que padezcan otro tipo de enfermedad periodontal, a personas con enfermedades sistémicas, aquellos que no aceptaron participar en el estudio, fumadores de más de 10 cigarrillos al día y discapacitados.

2.2.- Tamaño de la muestra: la muestra total fue de 41 personas, que cumplieron con los criterios de presencia de la patología (Periodontitis de progresión lenta), seleccionadas en base a lo expuesto en el muestreo no probabilístico por cuotas, pues se realiza sobre la base de un buen conocimiento de los estratos de la población y selecciona a los elementos o individuos más representativos.³²

3.- OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES ⁽³³⁾

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO ESTADISTICO	ESCALA	DATO
Presencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> por Biología Molecular	Presencia del periodontopatógeno (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) en pacientes con periodontitis de progresión lenta de una población determinada.	Se determina mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	Cualitativa	Nominal	- Presencia - Ausencia
Sexo	Características genotípicas y fenotípicas de la persona.	Características externas que diferencian al varón de la mujer.	Cualitativa	Nominal	Masculino Femenino

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

4.1.- Instrumentos documentales: Se utilizó una ficha de recolección de datos periodontal, para registrar los datos de las personas que acudieron a la clínica odontológica de la Universidad Católica de Cuenca, esta consta de datos generales del paciente, código de la muestra, periodontograma y observaciones adicionales. Además, se utilizó una ficha de trabajo y resultados para Biología Molecular. Luego, se registraron los datos en el programa Microsoft Excel.

4.2.- Instrumentos mecánicos: Se utilizó el laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad Católica de Cuenca para la realización del proceso de PCR de las muestras obtenidas, y para el registro de datos se utilizó una computadora.

4.3.- Materiales

Los materiales utilizados durante el estudio fueron: lápices, hojas, esferográficos, copias de las fichas: periodontal y molecular, set de diagnóstico odontológico, guantes, mascarillas, gorro, uniforme completo, sonda periodontal (Carolina del Norte), curetas estériles, conos de papel esterilizados, torundas de algodón, gasas estériles, tubos de ensayo, tubo eppendorf 2 ml, pipetas automáticas de varios volúmenes, puntas con filtro para pipetas automáticas, gradillas, agitador vórtex – mixer, Genomic DNA Purification Kit, Termociclador Agilent, cámara de electroforesis, transiluminador UV, microcentrífuga Hettich, termobloque.

Reactivos utilizados: Caldo Tioglicolato, SDS al 1%, Go Taq Master Mix Polimerasa, TAE, agua libre de nucleasas, agua destilada, Ladder, Sybr Safe y gel de agarosa.

4.4.- Recursos:

Para llevar a cabo la realización del proyecto se necesitaron recursos institucionales, recursos humanos (tesistas y tutores) y recursos financieros (autofinanciados).

5.- PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS

5.1.-Ubicación espacial: La carrera de Odontología de la Universidad Católica de Cuenca, es una entidad administrativa de educación superior de la ciudad de Cuenca - Ecuador, ubicada entre la Av. de la Américas y Humbolt; cuyas clínicas se localizan dentro de esta área en sus exteriores.

5.2.-Ubicación temporal: La investigación se realizó entre los meses de marzo – agosto 2019, con la recolección de la información a partir de las muestras obtenidas para su posterior detección de *Porphyromonas gingivalis* por la técnica PCR.

5.3.-Procedimientos de la toma de datos

Para el registro de datos, se consideraron las fichas de recolección periodontal y Biología Molecular e ingresadas en una base de datos en el programa Excel.

El estudio de detección de *Porphyromonas gingivalis* buscó describir cualitativamente su presencia en pacientes con periodontitis de progresión lenta.

Método de toma de muestra microbiológica

Para la toma de muestras de las bolsas periodontales en pacientes con periodontitis de progresión lenta, previamente se realizó una calibración a los tesisistas. Para ello dos especialistas periodoncistas, docentes de la Carrera de Odontología, organizaron un taller de capacitación de una semana de duración. Los pasos que se siguieron una vez realizada la capacitación fueron los siguientes:

1. Realizar un examen periodontal y diagnóstico, determinando la profundidad de sondaje (mediante una sonda periodontal Carolina del Norte), utilizando los parámetros de acuerdo a la nueva clasificación periodontal 2018.
2. Seguir las normas de Bioseguridad.
3. Emplear materiales previamente esterilizados (incluidos conos de papel).
4. Tomar la muestra en forma correcta evitando su contaminación (ver más abajo).
5. Seguir adecuadamente el protocolo de conservación de muestras.

Para la recolección de las muestras, primero se realizó un aislamiento relativo mediante la colocación de torundas de algodón estériles y un posterior secado minucioso en la zona con presencia de bolsas periodontales. Para la toma propiamente se utilizaron conos de papel estériles número 15 y 20, los cuales fueron colocados al interior del surco gingival por un tiempo de 20 segundos e introducidos posteriormente en tubos de ensayo conteniendo un medio de transporte adecuado (3ml de caldo Tioglicolato).

Estas muestras fueron llevadas inmediatamente al laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Unidad de Salud y Bienestar (CIITT) de la Universidad Católica de Cuenca, para su posterior procesamiento.

Extracción de ADN Total a partir de muestras

A partir de las muestras en caldo Tioglicolato, previamente incubadas durante 15 días a 37 °C, se transfirió 1 ml en forma aséptica a un tubo eppendorf, luego se centrifugó durante 3 minutos a 8000 rpm en una microcentrifuga digital Hettich y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 50 µl de solución de lisis (SDS al 1% y NaOH al 0,25 N) y se calentó a 100 °C por 10 minutos. Finalmente se agregaron 450 µl de agua ultrapura, se centrifugó 15 segundos a 8000 rpm y se conservó a una temperatura de -20 °C hasta su utilización.

Detección de ADN de *Porphyromonas gingivalis* mediante PCR

Con el fin de detectar la presencia del gen ADNr 16S de *P. gingivalis* mediante la reacción de PCR, empleamos los siguientes cebadores o primers:

Bacteria	Secuencia (5'- 3')	Tamaño	Referencia
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>Pg</i>)	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG	404 pb	Ashimoto 1996
	ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT		

Cuadro N° 1. *Primers de Porphyromonas gingivalis* y su amplificación.

La reacción de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera:

En un tubo de PCR de 0,2 ml de volumen se preparó la siguiente mezcla de reacción:

- 10 µL de solución con master mix (Go Taq Green Master Mix Promega)
- 1,5 µL de *primer forward*
- 1,5 µL de *primer reverse*
- 5 µL agua ultrapura y
- 2 µL de ADN Total.

La reacción de PCR se lleva a un volumen final de 20 µL. Una vez homogenizada la mezcla mediante agitación por vortex, los tubos fueron colocados en un termociclador Agilent.

El programa PCR a utilizar es:

- a. Desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min
- b. 36 ciclos de:
 - I. 95 °C por 30 s
 - II. 60 °C por 1 min
 - III. 72 °C por 1 min
- c. Extensión fina a 72 °C durante 2 min.

Los productos finales fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % con 3 µl de Sybr safe, con el programa 60 V, 90 mA, 60 W durante 1 hora. Luego se observó en un transiluminador UV.

6.- PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS DE DATOS ⁽³⁴⁾

Se aplicó la estadística descriptiva para la adecuada presentación de los datos observados y obtenidos de las unidades de estudio sobre la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes con enfermedad periodontal de progresión lenta y su distribución según el sexo, ambas asociadas a la variable cualitativa; en la cual consiste en presentar los datos mediante tablas estadísticas.

Finalmente, se elaboró una tabla descriptiva con las variables respectivas, esta contiene los datos de presencia – ausencia de *Porphyromonas gingivalis* y su distribución de acuerdo al sexo. De esta forma se podrá mostrar con claridad la presencia de la bacteria.

7.- ASPECTOS BIOÉTICOS

Aunque la presente investigación no implicó conflictos bioéticos, debido a que se ejecutó previa firma del consentimiento informado por parte de todos los pacientes, la misma fue aprobada por el Comité de Bioética de la Universidad Católica de Cuenca, bajo el código Ci55POROD30.

A los pacientes se les realizó un examen periodontal y posterior toma de muestras, se les indicó los objetivos, metodología del estudio y se les informó acerca del compromiso de confidencialidad en relación con el manejo de sus datos por parte del investigador.

Además, se les manifestó los diferentes beneficios que este estudio podría traer a la comunidad en lo que respecta a los tratamientos específicos con la determinación de las bacterias como agentes causales de la periodontitis.

CAPÍTULO III

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1. RESULTADOS

Tabla N°1. Distribución de la muestra, según edad y sexo.

EDAD	SEXO		TOTAL
	Masculino n(%)	Femenino n(%)	n(%)
20-29	1(2,4%)	0%	1(2,4)
30-39	12(29,3%)	9(22%)	21(51,3%)
40-49	5(12,2%)	6(14,6%)	11(26,8)
50-59	4(9,8%)	1(2,4%)	5(12,2%)
≥60	3(7,3)	0%	3(7,3)
TOTAL	25 (61%)	16(39%)	41(100%)

Interpretación: De acuerdo a la tabla No 1, de 41 personas que padecen periodontitis de progresión lenta, el 61% son hombres y el sobrante pertenece al sexo femenino, además que el rango que presenta mayor predominio en estos pacientes son los de 30 a 39 años con un 51,3%.

Tabla N°2. Presencia de *Porphyromonas gingivalis* por PCR

	n	%
Presencia	5	12.2
Ausencia	36	87.8
TOTAL	41	100

Interpretación: De acuerdo a la tabla No 2, se pudo detectar *Porphyromonas gingivalis* en pacientes con periodontitis de progresión lenta mediante la técnica PCR, lo cual permite evidenciar 5 muestras positivas de un total de 41.

Tabla N°3. Presencia de *Porphyromonas gingivalis* por PCR, según el sexo

	Masculino		Femenino	
	n	%	n	%
Presencia	3	12	2	12.5
Ausencia	22	88	14	87.5
TOTAL	25	100	16	100

Interpretación: De acuerdo a la tabla No 3, en cuanto al sexo no hay diferencia significativa entre hombres y mujeres.

2. DISCUSIÓN

En la presente investigación nuestro objetivo general era detectar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en bolsas periodontales mediante métodos moleculares (PCR). La población incluida fue de 41 pacientes con periodontitis de progresión lenta que acudieron a la clínica Odontológica de la Universidad Católica de Cuenca en el período marzo – agosto 2019. El resultado del estudio permitió identificar a este periodontopatógeno mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, lo cual establece a su vez un protocolo exitoso de detección de la bacteria. Además se encontró una baja presencia de *Porphyromonas gingivalis* con respecto a otros estudios realizados a nivel internacional y una incidencia mayor en el sexo femenino. Este es el primer estudio realizado a nivel nacional.

Varios estudios tienen como objetivo la detección de bacterias periodontopatógenas en pacientes con periodontitis de progresión lenta mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa debido a que se presenta como un método con alta sensibilidad, reproducibilidad y especificidad. Estos fueron realizados en países de Latinoamérica como Brasil ⁽¹⁸⁾, Argentina ⁽⁴⁾, Chile ⁽¹⁹⁾, Uruguay ⁽¹⁶⁾, Colombia ⁽⁵⁾ y otros en el mundo como la India ⁽¹⁰⁾, los cuales obtuvieron como resultado una detección de *Porphyromonas gingivalis* en un 47,7%, 66%, 84,2%, 92%, 62,5% y 43,48% respectivamente. Estos estudios coinciden con el nuestro en cuanto a la detección por el mismo método de Biología Molecular (PCR) pero difiere en cuanto a la presencia de *Pg*, puesto que se obtuvo un menor porcentaje (12,2 %). Estos resultados reflejan diferencias en los países donde se realizaron estas investigaciones, por lo que la baja significativa de la presencia obtenida en nuestro podría deberse a las variaciones de la composición de la microflora subgingival entre individuos de distintas regiones geográficas, así como aspectos genéticos, raciales o étnicos.

Papone et al ⁽¹⁶⁾, en su estudio sobre la detección de las bacterias periodontopatógenas por multiplex - PCR obtuvo como resultado conforme a la distribución del sexo, un mayor porcentaje de *Porphyromonas gingivalis* en el sexo masculino. Otro estudio desarrollado por Mujica C et al ⁽⁸⁾, indica una igualdad en la presencia de *Pg* con un 30% en ambos casos. En nuestro estudio se obtuvo una incidencia mayor de esta bacteria en el sexo femenino, lo cual demuestra que ningún estudio en general coincide con la predilección de la bacteria según el sexo.

A pesar de que nuestros resultados sugieren una presencia mayor de *Porphyromonas gingivalis* en el sexo femenino, la cantidad limitada de pacientes no es suficiente como para comprobar ese resultado, por lo que se recomienda realizar futuras investigaciones.

Pese a que empleamos un método muy sensible y previamente utilizado en otros estudios, pensamos que varios factores pueden influir en el resultado del mismo, tales como la carga bacteriana presente en el caldo Tioglicolato y la extracción de ADN.

En la presente investigación fue posible desarrollar un protocolo que permite identificar *Porphyromonas gingivalis* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, además, se encontró una baja presencia de *esta bacteria* en bolsas periodontales de pacientes con periodontitis de progresión lenta y en cuanto al sexo no hubo diferencia significativa entre hombres y mujeres.

3. CONCLUSIONES

1. Se detectó la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en un 12,2% en bolsas periodontales de pacientes que padecían periodontitis de progresión lenta a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.
3. No existe diferencia significativa de la presencia de *Porphyromonas gingivalis* entre los sexos masculino y femenino con 12 % y 12,5% respectivamente.

III.- BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Hernández J, Silva S, Ortiz C, Clavería R, Font M. Evolución de la periodontitis del adulto tratada con Apafill-G. Medisan [Internet]. 2017 [citado 26 Ene 2019]; 17 (6): 971 – 980. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/vol17_6_13/san12176.pdf
- 2.- Rojo N, Espinosa A, Arcos m. Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. Revista Odontológica Mexicana [Internet]. 2011 [citado 26 Ene 2019]; 15 (1): 31-39. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2011/uo111f.pdf>
- 3.- Ramos D, et al. Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. Odontol. Sanmarquina [Internet]. 2011 [citado 27 Ene 2019]; 14(1): 34-38. Disponible en:
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/2907/2475>
- 4.- Bazzano G, Parodi R, Tabares S, Sembaj A. Evaluación de la terapia mecánica periodontal en bolsas profundas: Respuesta clínica y bacteriológica. Revista Clínica Periodoncia Implantología Rehabilitación Oral [Internet]. 2012 [citado 26 Sep 2019]; 5(3): 23-127. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v5n3/art04.pdf>
- 5.- Ardila C, Botero L, Guzmán C. Comparación de las características sociodemográfica, clínicas y microbiológicas de pacientes con periodontitis agresiva y crónica. Rev. Ach Med Camaguey [Internet]. 2014 [citado 26 Sep 2019]; 18(5): 532 – 534. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552014000500009
- 6.- Pretel C, Chávez B. Enfermedad periodontal como factor de riesgo de condiciones sistémicas. Revista Estomatológica Herediana [Internet]. 2013 [citado 26 Ene 2019]; 23(4):223-9. Disponible en:
<http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/viewFile/18/11>
- 7.- Sánchez J, Carcía de Carvalho G, Spin J. Nueva clasificación sobre las enfermedades y condiciones periodontales y peri-implantarias: una breve reseña. Odontología [Internet]. 2018 [citado 26 Ene 2019]; 20 (2), 68 – 89. Disponible en: <http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/odontologia/article/view/1475/1430>

- 8.-** Mujica C, Castillo m, Daille L, Fuentevilla I, Bittner M. Co – detección de patógenos Periodontales en Pacientes chilenos con Periodontitis Crónica. Revista Clínica Implantología Rehabilitación Oral. [Internet]. 2010 [citado 26 Sep 2019]; 3(3): 118-122. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v3n3/art03.pdf>
- 9.-** 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. Revista Clínica Periodoncia Implantología Rehabilitación Oral [Internet]. 2012 [citado 28 Ene 2019]; 5(1): 40-45. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072012000100007
- 10.-** Nayak A, Bhat K, Shivanaikar S, Pushpa P, Kugaji M, Kumbar V. Detection of red complex organisms in chronic periodontitis by multiplex polymerase chain reaction. Journal of advanced Clinical Research Insights [Internet]. 2018 [citado 26 Sep 2019]; 5: 139-144. Disponible en: http://jcri.net/eJournals/ eJournals/232_ORIGINAL%20ARTICLE.pdf
- 11.-** Zerón A. La nueva clasificación de enfermedades periodontales. Revista ADM [Internet]. 2018 [citado 27 Ene 2019]; 75 (3): 122-124. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2018/od183a.pdf>
- 12.-** Ardila C., Arbeláez M., Guzmán I. Perfil microbiológico subgingival de pacientes con periodontitis crónica en una población de Colombia. Avances en Periodoncia [Internet]. 2012 [citado 26 Ene 2019]; 24(1): 47-53. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169965852012000100005&lng=es
- 13.-** Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Periodontología Clínica de Carranza. 11va ed. Amolca; 2014
- 14.-** Rioboo M., Bascones A. Factores de riesgo de la enfermedad periodontal: factores genéticos. Avances en Periodoncia [Internet]. 2005 [citado 27 Ene 2019]; 17(2): 69-77. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169965852005000200003&lng=es

- 15.-** Eley B, Soory M, Manson J. Periodoncia. 6ta ed. España: Elsevier; 2010
- 16.-** Papone V y cols. Detección y prevalencia de patógenos periodontales de una población con periodontitis crónica en Uruguay mediante metodología convencional y metagenómica. Odontoestomatología [Internet]. 2015 [citado 26 Sep 2019]; 17(25): 23 - 32. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/ode/v17n25/v17n25a04.pdf>
- 17.-** Hurtado Camarena A y cols. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. Oral [Internet]. 2016 [citado 27 Ene 2019]; 17(54): 1374-1378. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf>
- 18.-** Farias B, Souza P, Ferreira B, Melo R, Machado F, Gusmao E, Cimoies R. Occurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis. Braz J Microbiol [Internet]. 2012 [citado 26 Sep 2019]; 43(3): 909-916. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768898/>
- 19.-** Paniagua A, Ulloa M, Pozo P, Bravo J. Detección de Porphyromonas gingivalis en Pacientes Adultos con Periodontitis Crónica. Int. J. Odontostomat. [Internet]. 2017 [citado 26 Ene 2019]; 11(1): 13-18. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijodontos/v11n1/art02.pdf>
- 20.-** Moreno S, Contrera A. Factores de Virulencia de Porphyromonas gingivalis. Fundación Juan José Carraro [Internet]. 2013 [citado 26 Ene 2019]; 37: 16-27. Disponible en: http://www.fundacioncarraro.org/descarga/revista37_art2.pdf
- 21.** Britos M, Cynthia S, Ortega S, Vasek O. Diseño y estandarización de la técnica de PCR para Porphyromonas gingivalis. Revista facultad de Odontología [Internet]. 2017 [citado 26 Ene 2019]; 10(1): 25 – 30. Disponible en: <http://revistas.unne.edu.ar/index.php/rfo/article/view/2931/2605>
- 22.-** Britos M, Cynthia S, Ortega S. Porphyromonas gingivalis, patógeno de relevancia en la enfermedad periodontal. Fundación Juan José Carraro [Internet]. 2017 [citado 27 Ene 2019]; 42: 46-49. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/63401/CONICET_Digital_Nro.7f700a96-7794-4284-9431-598e65f2a743_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

23.- Lamont R, Hajshengallis & Jenkinson. Microbiología en inmunología oral. 1era Ed. México: El Manual Moderno; 2015.

24.- Medina MI, Medina MG, Merino L. Identificación de bacterias peridontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. *Enf Inf Microbiol* [Internet]. 2010 [citado 26 Ene 2019]; 30 (3): 83-90. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2010/ei103c.pdf>

25.- López F, Cruz M; Ovando V; Carasol M. Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal. *Cient Dent* [Internet]. 2009 [citado 26 Ene 2019]; 6(2):93-101. Disponible en: <https://www.coem.org.es/sites/default/files/revista/cientifica/vol6-n2/17-25.pdf>

26.- Avila M. PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples. *Braz J. Microbiol* [Internet]. 2003 [citado 26 Sep 2019]; 34(1): 81-84. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000100017

27.- Klein M, Goncalves R. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by Polymerase Chain Reaction in Subjects with Different Periodontal Status. *J Periodontol*. 2003 [citado 26 Sep 2019]; 74(6): 798 – 802. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/10639440_Detection_of_Tannerella_forsythensis_Bacteroides_forsythus_and_Porphyromonas_gingivalis_by_Polymerase_Chain_Reaction_in_Subjects_with_Different_Periodontal_Status

28.- Tamay de Dios L y cols. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic* [Internet]. 2013 [citado 26 Ene 2019]; 2 (2): 70-78. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

29.- Fierro F. Electroforesis de ADN. vol 27. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos; 2014.

30.- Andrade C. Identificación de *Staphylococcus Aureus* resistente A-B- Lactámicos en quirófanos y salas de cuidados intensivos del Hospital Universitario Católico de Cuenca mediante PCR [Internet]. Ecuador: Unidad de posgrado investigación y desarrollo maestría en biotecnología molecular, Universidad de Guayaquil; 2016.

31.- Villavicencio E, et. al., Diseños de estudios clínicos en odontología. Revista OACTIVA UC Cuenca [Internet]. 2016 [citado 10 Abril 2019]; 1(2): 81-84. Disponible en: <http://oactiva.ucacue.edu.ec/index.php/oactiva/article/view/163/284>

32.- Torres M, Paz K, Salazar F. Tamaño de una muestra para una investigación de mercado. Universidad Rafael Landívar [Internet]. [Citado 11 Oct 2019]; 2: 1-13. Disponible en: http://www.fgsalazar.net/LANDIVAR/ING-PRIMERO/boletin02/URL_02_BAS02.pdf

33.- Villavicencio E, Torracchi E, Pariona M & Alvear M. ¿Cómo plantear las variables de una investigación? Operalización de las variables, Revista OACTIVA UC Cuenca [Internet]. 2019 [citado 10 Abril 2019]; 4 (1): 9-14. Disponible en:

<http://oactiva.ucacue.edu.ec/index.php/oactiva/article/view/289/500>

34.- Torracchi E, Córdova A, Chiriboga G & Villavicencio E. Estrategia de análisis de datos (Parte 1): Creación de bases de datos para investigaciones ciencias de la salud, Revista OACTIVA UC Cuenca [Internet]. 2019 [citado 10 Abril 2019]; 4(2): 13-20. Disponible en: <http://oactiva.ucacue.edu.ec/index.php/oactiva/article/view/347/524>

ANEXOS.

Anexo 1**Solicitud del Comité – Medicina**

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

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

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

Trabajo de titulación realizado por Pedro Javier Cisneros Cordero

Código: Ci55POROD30




A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carlos Flores Montesinos'.

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,

Kamila Calderón _____
Pedro Cisneros _____
Fabiola Moscoso _____
John Orellana _____
Stephanie Palacios _____

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. ACCESS-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	Parroquia: CUENCA
Dirección: AV. AMERICAS S/N y HUMBOLT		Barrio: BELLAVISTA
Fecha de emisión: 2018-11-18	Fecha de vencimiento: 2019-11-18	

Aprobado por:

**ALARCON CALLE JENNIFER ALEXANDRA
DELEGADO/A PROVINCIAL DE LA ACCESS**

Verifique la validez del certificado



Anexo 5

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".

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 border="0"> <thead> <tr> <th colspan="2">Cálculos</th> <th>Muestras</th> <th>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>	Cálculos		Muestras	Total	MM	_____ ul x _____	=	_____	Primer F	_____ ul x _____	=	_____	Primer R	_____ ul x _____	=	_____	ADN	_____ ul x _____	=	_____	Agua	_____ ul x _____	=	_____	Total	_____ ul x _____	=
Cálculos		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 - Hoja 2



UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CUENCA
CONSEJO REGULADOR AL SERVICIO DEL PAÍS

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



UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CUENCA
COMUNIDAD EDUCATIVA AL SERVICIO DEL PUEBLO

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 periodo 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 decírselo 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



UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CUENCA
COMUNIDAD EDUCATIVA AL SERVICIO DEL PUEBLO

CONSENTIMIENTO INFORMADO	
---------------------------------	--

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.

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

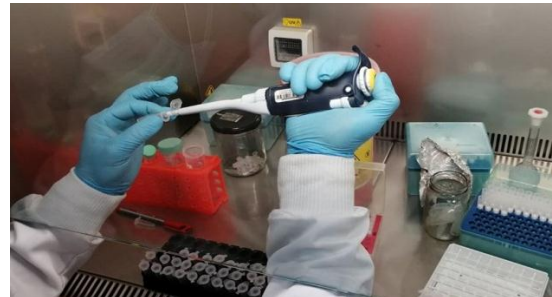
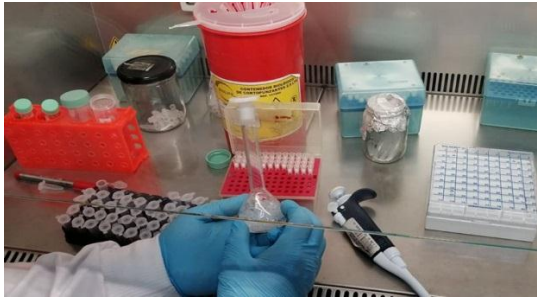
Anexo 10

Procedimiento para obtención de resultados

Toma de muestras



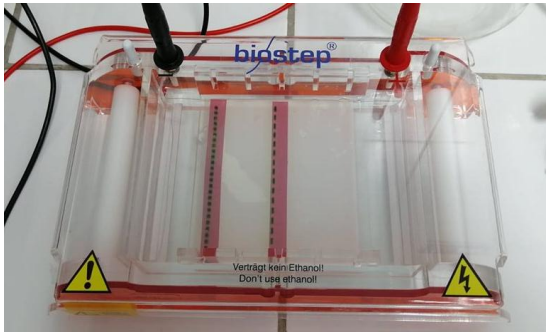
Extracción de ADN

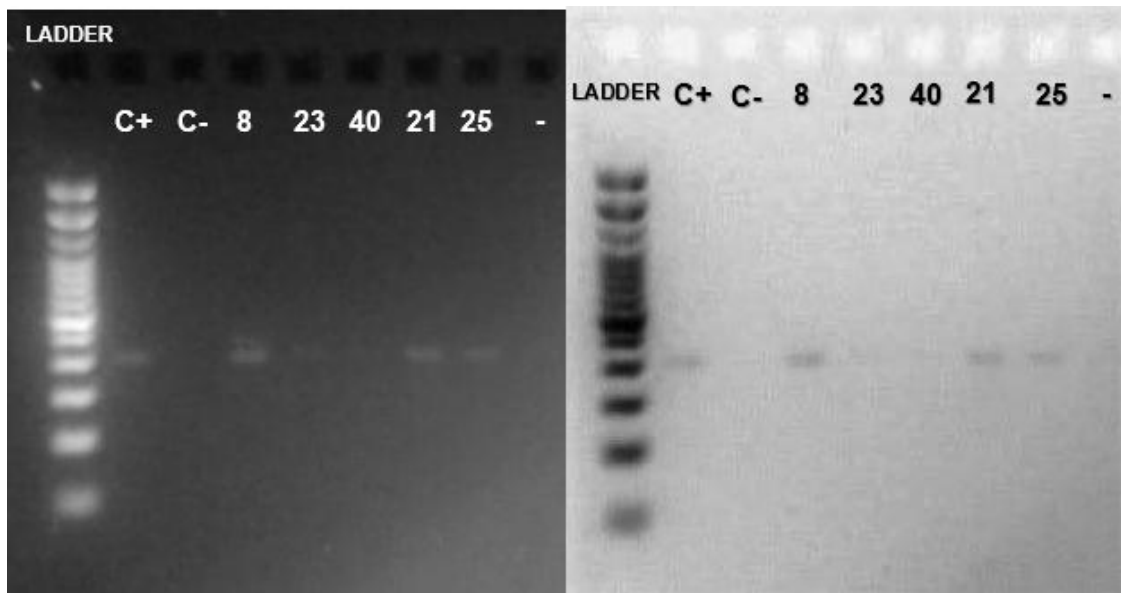


Amplificación de ADN



Electroforesis



Resultados de la Detección por PCR de *Porphyromonas gingivalis*

Anexo 11.

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 M.
ESP. EN PERIODONCIA
Od. 1007-11-109191
Esp. CL-14-9814

Anexo 12

Antiplagio - hoja 1

Porphyromonas gingivalis

por Pedro Javier Cisneros Cordero

Paola Orellana Bravo MSc.
Ingeniera en Biotecnología
2019-10-03 19:28



Fecha de entrega: 03-oct-2019 01:55p.m. (UTC-0500)

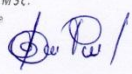
Identificador de la entrega: 1185481151

Nombre del archivo: INTRODUCCL_N.docx (28.1K)

Total de palabras: 3250

Total de caracteres: 18121

Anexo 13
Antiplagio - hoja 2

Dra. Paola Orellana Bravo MSc. Magister en Biotecnología Folio 24 39 187 			
Porphyromonas gingivalis			
INFORME DE ORIGINALIDAD			
9%	5%	1%	8%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE
FUENTES PRIMARIAS			
1	www.bvs.sld.cu Fuente de Internet		1%
2	Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante		1%
3	Submitted to Universidad San Francisco de Quito Trabajo del estudiante		1%
4	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante		1%
5	Submitted to Universidad Andina Nestor Caceres Velasquez Trabajo del estudiante		1%
6	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante		1%
7	Submitted to Universidad Andina del Cusco Trabajo del estudiante		1%
8	Submitted to Pontificia Universidad Católica		

Anexo 14

Permiso del autor de tesis

PERMISO DEL AUTOR DE TESIS PARA SUBIR AL REPOSITORIO
INSTITUCIONAL

Yo, Pedro Javier Cisneros Cordero..... En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación "PORPHYROMANAS GINGIVALES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL DE PROGRESIÓN LENTA QUE ACUDEN A LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA,..... PERÍODO MARZO-AGOSTO 2019....." de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de Los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, Así mismo; autorizo a la Universidad para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 15 de Octubre de 2019

F: Pedro Cisneros
de cédula 0105830855