



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**PREVALENCIA Y CONCENTRACIÓN DE *Porphyromonas gingivalis* EN FLUIDO  
CREVICULAR Y SALIVA DE PACIENTES DIABÉTICOS**

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la  
Universidad de Talca como parte de los requisitos exigidos  
para la obtención del título de Cirujano Dentista.

**ESTUDIANTES: GUSTAVO ALEJANDRO JAQUES FUENTES  
JAVIER IGNACIO MALDONADO SÁNCHEZ**

**PROFESOR GUÍA: DR. SERGIO MATUS FUENZALIDA**

**PROFESOR CO-GUIA: PROF. OLGA LOBOS GILABERT**

**PROFESOR INFORMANTE: DRA. NICOLE ÁVILA AZOCAR**

**TALCA - CHILE**

**2019**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

## ÍNDICE

1.	RESUMEN .....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	MÉTODOS.....	5
3.1.	Diseño general .....	5
3.2.	Calibración de operadores.....	6
3.3.	Preparación de medios de cultivo.....	7
3.4.	Evaluación clínica y toma de muestras microbiológicas.....	8
3.5.	Procesamiento de muestras .....	9
3.6.	Análisis de muestras microbiológicas .....	10
3.6.1	Recuento de colonias bacterianas pigmentadas de negro .....	10
3.6.2	Extracción de ADN.....	11
3.6.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	11
3.6.4	Electroforesis en gel de agarosa .....	11
3.7.	Análisis de resultados .....	13
4.	RESULTADOS .....	15
4.1.	Descripción de la población en estudio .....	15
4.2.	Características clínicas de los pacientes estudiados.....	17
4.3.	Relación de <i>P. gingivalis</i> con estado metabólico .....	18
5.	DISCUSIÓN .....	21
6.	REFERENCIAS.....	24
7.	ANEXOS .....	26

## 1. RESUMEN

El estado periodontal de un paciente puede verse afectado por factores como la microbiota supra y subgingival, factores ambientales y las respuestas inmunes e inflamatorias del huésped. Pudiendo pasar de un estado de salud periodontal a un estado de enfermedad periodontal.

Dentro de los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad periodontal podemos encontrar la Diabetes Mellitus, la cual forma parte de las enfermedades crónicas más comunes en la población, teniendo ésta una relación bidireccional con la enfermedad periodontal, pudiendo ayudar a su progresión.

Cuando nos referimos a los factores microbianos, cobra importancia la formación del biofilm subgingival, dentro del cual destaca la *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), la cual se presenta en alta frecuencia en pacientes con enfermedad periodontal, provocando un aumento en la inflamación y destrucción del epitelio y tejido conectivo.

Este estudio tiene por objetivo establecer si existen diferencias en la prevalencia y concentración de *P. gingivalis* presente en los pacientes diabéticos compensados y no compensados en base a los índices periodontales, usuarios del Centro de Salud Familiar (CESFAM) Villa Magisterio de Talca. Esto mediante la toma de muestras de fluido crevicular, de surco o saco periodontal, y saliva, con el fin de determinar una relación entre *P. gingivalis* y el control glicémico.

Sobre la *P. gingivalis* existe una alta prevalencia y diferencias de concentración en pacientes diabéticos compensados y no compensados, no significativas.

**Palabras clave:** Enfermedad periodontal, *Porphyromonas gingivalis*, Diabetes mellitus tipo II, Hemoglobina glicosilada.

## 2. INTRODUCCIÓN

El examen del estado periodontal de un paciente incluye la evaluación clínica de la inflamación en los tejidos periodontales, el registro de profundidad de sondaje y del nivel clínico de inserción y evaluación radiográfica del hueso alveolar. Según estos índices se clasifica el estado del paciente, y podemos referirnos al proceso de Enfermedad Periodontal (EP) como un estado que puede pasar desde tejidos sanos a una inflamación o gingivitis y luego a una destrucción o periodontitis. (1)

La EP es una enfermedad de naturaleza multifactorial que implica una interacción íntima entre la microbiota compleja subgingival, las respuestas inmunes e inflamatorias del huésped y los factores de modificación ambiental. (2)

Sabemos que la EP tiene un origen multifactorial, y dentro de sus factores cobra importancia las condiciones propias del paciente, como son los factores de riesgo, dentro de los cuales encontramos la Diabetes Mellitus (DM) tipo II, la cual ha tenido un progresivo aumento en su prevalencia a nivel mundial (3).

La OMS define a la DM como una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce, aumentando los niveles de azúcar en la sangre (3). Los pacientes diagnosticados con DM requieren un constante control de su situación metabólica, de forma rutinaria mediante el nivel de glucosa en sangre o cada 3 meses mediante el examen de hemoglobina glicosilada (HbA1c), el cual entrega información sobre el nivel de glicosilación de los glóbulos rojos de los últimos 120 días. (4)

De acuerdo con la investigación, existe una relación bidireccional entre DM y EP, básicamente se genera una mayor respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria podría perjudicar el control glicémico, por lo tanto, habría una descompensación, y al mismo tiempo podría favorecer la progresión de la EP. (5) (6).

Desde el siglo XX, estudios referidos a la etiología de la EP han determinado la existencia de patógenos periodontales que se relacionan con la iniciación y progresión de la enfermedad. Más de 300 especies son aisladas desde los sacos periodontales y 50 de ellas se

destacan por ser relevantes en la etiología. Las mencionadas especies pertenecen al grupo de los bacilos anaerobios gramnegativos, dentro de los que se destacan los géneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides* y *Fusobacterium*. (7)

Las especies del género *Porphyromonas* se caracterizan por ser bacilos pleomórficos o cocobacilos, inmóviles, no esporulados. El género *Porphyromonas* comprende doce especies, pero solo tres se han aislado de la cavidad bucal del hombre, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *P. asaccharolytica*. Estas especies son capaces de producir un pigmento negro en sus colonias, el que puede observarse en medios de cultivo que contienen sangre, hemina y vitamina K. Dicha pigmentación se debe a la presencia de hemina y protoporfirina. La hemina, producto de la descomposición de la hemoglobina es un factor relevante para el crecimiento de estas bacterias tanto in vivo como in vitro. (7)

*P. gingivalis*, se considera una especie importante entre los periodontopatógenos, principalmente se aísla del surco gingival, especialmente, cuando existe un diagnóstico periodontal desfavorable, y se ha asociado con la progresión de la periodontitis crónica en el adulto. El poder patógeno de esta bacteria en la colonización, destrucción del tejido periodontal y evasión de las defensas del hospedero tiene relación con la gran cantidad de factores de virulencia portados por este microorganismo. (7) La presencia y concentración de estos microorganismos pigmentados de negro se asocia principalmente a sitios con profundidad al sondaje aumentadas y pérdida del nivel de inserción, ambas características describen el saco periodontal, signo patognomónico de la Periodontitis. Un mayor recuento de colonias bacterianas pigmentadas de negro está asociado principalmente a una mayor destrucción del periodonto, concordante al diagnóstico de periodontitis.

Field y cols. (8) y Casarin y cols. (9), en sus estudios midieron la concentración de *P. gingivalis* en pacientes diabéticos y no diabéticos y los resultados demostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Mientras que Aoyama y cols. (10) encontró diferencias estadísticamente significativas, en donde la concentración de *P. gingivalis* era mayor en el grupo de diabéticos no compensados en comparación con los diabéticos compensados. En estos estudios el diseño fue distinto, tanto en la selección de participantes, el tamaño muestral, y el método de procesamiento de la muestra biológica.

Esto hace que los estudios no sean comparables, pero nos dan una orientación respecto del tema. Cada una de las variables pudo influir en el resultado final de cada estudio.

Actualmente, se ha demostrado que en los países de Latinoamérica se presentan variaciones en la microbiota de la EP (11). Al revisar la literatura, existen resultados contradictorios respecto de la relación entre la *P. gingivalis* y el estado de compensación de DM tipo II, por esta razón, el objetivo de esta investigación fue establecer la prevalencia de la *P. gingivalis* en los pacientes que son usuarios del Centro de Salud Familiar Magisterio de Talca que sufren Diabetes y observar si existe alguna asociación entre su presencia y la condición metabólica del paciente, mediante la toma y análisis de muestras de fluido crevicular y saliva.

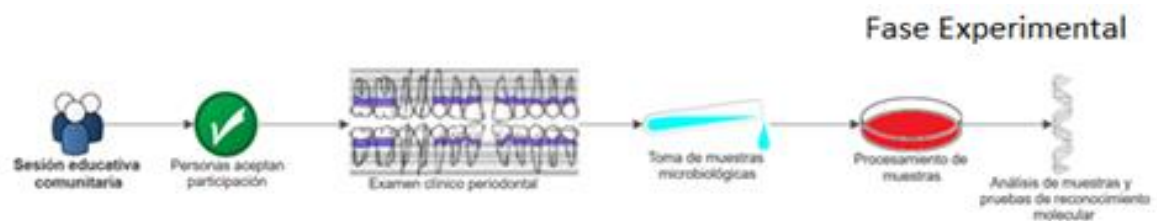
### 3. MÉTODOS

Estudio de corte transversal (12), describe la prevalencia y concentración de *Porphyromona gingivalis* en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II que reciben atención en el CESFAM Villa Magisterio de Talca, en agosto del año 2019. Prevalencia es la proporción de personas en una población determinada y en un momento dado que tienen la presencia de *Porphyromona gingivalis* en sus muestras, mientras que concentración es el cálculo de unidades formadoras de colonias por cada ml de muestra del recuento de colonias pigmentadas de negro.

#### 3.1. Diseño general

El proyecto de memoria fue aprobado por el Comité de Ética Científica (CEC) de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca, y posteriormente, visado para su aplicación por la dirección del CESFAM Villa Magisterio de Talca.

El estudio se divide dos etapas, la clínica, en donde a los pacientes, se les realizó anamnesis, examen clínico, recolección de datos de ficha y toma de muestras biológicas (saliva y fluido crevicular), y la etapa experimental en la que las muestras fueron procesadas y analizadas (Figura 1).



**Figura 1. Diseño general.** Luego de que cada persona aceptó participar en el estudio, mediante consentimiento informado, pasó por una primera etapa de tipo clínica: recolección de datos mediante anamnesis y ficha clínica del centro de salud para obtener datos de estado sistémico, además del examen clínico periodontal, en esa misma sesión se recolectaron las muestras microbiológicas (fluido crevicular y saliva), que fueron usados para la etapa experimental.

Los pacientes que querían participar voluntariamente, debían ser usuarios del CESFAM Villa Magisterio, pertenecientes al programa de salud cardiovascular (PSCV), en el subgrupo de diabéticos y pasar por los criterios de inclusión y exclusión para confirmar su participación.



### **Criterios de inclusión**

- Diagnóstico Diabetes Mellitus tipo II
- Mayor a 4 dientes en boca

### **Criterios de exclusión**

- Fumadores
- Ex-fumadores, de acuerdo a riesgo periodontal (menor a 12 meses) (13)
- Tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses
- Tratamiento periodontal en los últimos 3 meses

El tipo de muestra es por conveniencia, esto por el hecho de lograr contacto con los pacientes que regularmente se controlan en el CESFAM y que son parte del grupo del Programa de Salud Cardiovascular (PSCV) del centro de salud mencionado anteriormente.

Para el cálculo de muestra necesaria, nos basamos en la prevalencia de *P. gingivalis* en la publicación de Aoyama (11), con prevalencia en diabéticos controlados de 65,2% y un 34,8% en los no controlados, por lo que la diferencia en estos grupos (P=30,4%), nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 5% ( $z_{(\alpha/2)} = 1,96$ ), una potencia de prueba ( $\beta$ ) de 80% ( $z_{\beta} = 0,84$ ), con una d: precisión: cuando aceptamos que difiera el “p” muestral del “p” poblacional = 20%

$$n = \frac{(z_{(\alpha/2)} + z_{\beta})^2 \times P \times (100 - P)}{d^2} = \frac{(1,96 + 0,84)^2 \times 30,4 \times (100 - 30,4)}{20^2} = 41,47$$

Asumiendo una pérdida del 20% se tiene:

$$41,47 + 0,2 \times 41,47 = 49 \text{ pacientes}$$

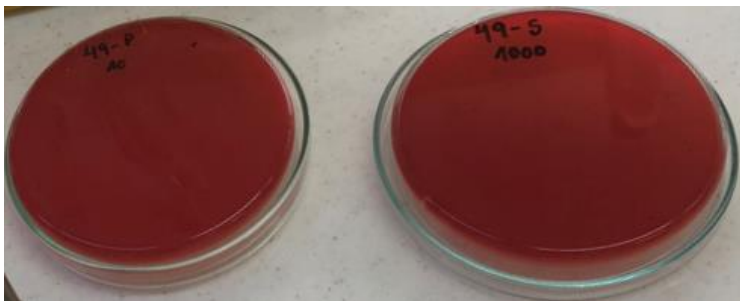
### **3.2. Calibración de operadores**

La calibración de operadores es mediante el índice de Kappa, el cual representa el acuerdo o concordancia máxima posible no debida al azar. Si este valor es igual a 1, estaríamos frente a una situación en que la concordancia es perfecta; cuando el valor es 0, hay total desacuerdo. (14)

La correlación inicial entre los operadores fue hecha en 6 pacientes del Centro de Clínicas de la Universidad de Talca, y posteriormente la correlación entre operadores y un especialista se realizó en 6 pacientes del mismo lugar. Ocupando el índice Kappa los resultados fueron estadísticamente significativos, alcanzando un valor de 0,84 en el operador 1 y 0,74 en el operador 2, clasificándose como una fuerza de concordancia buena. (14)

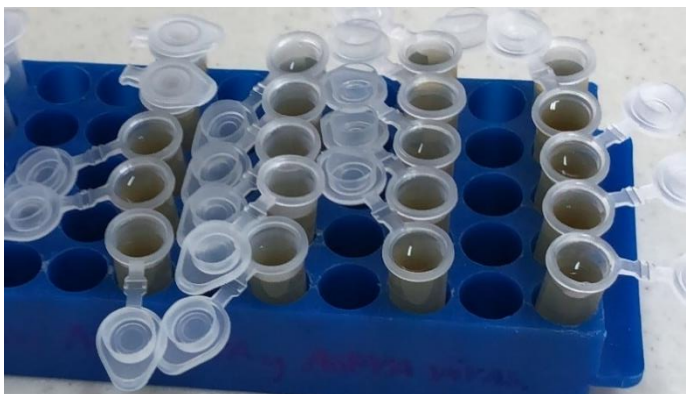
### 3.3. Preparación de medios de cultivo

Para el transporte y procesamiento de la *P. gingivalis*, se utilizaron medios microbiológicos comerciales. Para su preparación, se siguió el protocolo del fabricante: tioglicolato (MERCK) como medio de transporte de muestras periodontales, cloruro de sodio 0.85% (Mallinckrodt) utilizado para diluir muestras, previo a la siembra de las muestras en placas, agar base sangre (OXOID), que además contiene vitamina K (0,01 gr/L) (MERCK), hemina (0,005 gr/L) (Fluka), y 5% de sangre. Este medio fue utilizado como medio de cultivo mejorado para el crecimiento de bacilos pigmentados de negro, entre ellos *P. gingivalis*.



**Figura 2. Placas de agar base sangre hemina vitamina K.** Foto de las placas de petri debidamente rotuladas con agar base sangre hemina vitamina K, previas a sembrado de muestras para cultivo bacteriano.

---




**Figura 3. Tubos eppendorf con caldo de tioglicolato.** Foto, previo a autoclavado, utilizado como medio de transporte para las muestras de fluido crevicular.

---

### 3.4. Evaluación clínica y toma de muestras microbiológicas

A cada paciente se le explicó el estudio de manera detallada, luego firmó consentimiento informado para participar y la autorización para acceder a los datos de su ficha clínica, esta última fue necesaria para obtener los datos sobre su control glicémico. Luego se realizó el examen clínico periodontal mediante el registro de periodontograma, donde se registraron dientes presentes, y si alguno de ellos presentaba movilidad patológica, además a cada diente, en seis sitios (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiopalatino/lingual, palatino/lingual y distopalatino/lingual) se registró posición de encía, profundidad al sondaje y nivel de inserción clínico, además de sangrado al sondaje para calcular posteriormente el índice de sangrado, según Ainamo y Bay.

 GÉNERO: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_ ÍNDICE SANGRADO: \_\_\_\_\_% DIENTES PERDIDOS POR PERIODONTITIS: \_\_\_\_\_ N° FOLIO: \_\_\_\_\_

Superior	Vest.	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	2,1	2,2	2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	
	MOV.																	
	SANG.																	
	P.S.																	
	P.E.																	
N.I.																		
Superior	Pal.	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	2,1	2,2	2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	
	SANG.																	
	P.S.																	
	P.E.																	
	N.I.																	
Inferior	Vest.	4,8	4,7	4,6	4,5	4,4	4,3	4,2	4,1	3,1	3,2	3,3	3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	
	MOV.																	
	SANG.																	
	P.S.																	
	P.E.																	
N.I.																		
Inferior	Ling.	4,8	4,7	4,6	4,5	4,4	4,3	4,2	4,1	3,1	3,2	3,3	3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	
	SANG.																	
	P.S.																	
	P.E.																	
	N.I.																	

GLICEMIA: \_\_\_\_\_ mg/dL y HbA1c: \_\_\_\_\_% ( \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ ) PROF. CONO MUESTRA SACO: \_\_\_\_\_ mm

**Figura 4. Periodontograma.** Documento oficial utilizado para el registro de variables medidas en el examen clínico.

La muestra de fluido crevicular se tomó en el sitio más profundo, pesquisado en el examen periodontal realizado previamente, se aisló el área con torulas de algodón y secó cuidadosamente con aire, en caso de ser necesario, se elimina el biofilm supragingival con cureta estéril y se tomó una muestra de fluido gingival crevicular, utilizando 2 conos de papel estériles (N°35) por 20 segundos, en el sitio previamente elegido, los conos fueron depositados en un tubo eppendorf con caldo de Tioglicolato. Se tomó además una muestra de saliva en un tubo eppendorf estéril, el cual fue llenado completamente, las muestras tomadas y almacenadas fueron transportados inmediatamente al Laboratorio de Investigación

Microbiología de la Universidad de Talca, a una temperatura de 4°C (en hielo), para su posterior siembra antes de las 2 horas posteriores a la toma de muestra.



**Figura 5. Muestras de saliva y fluido crevicular en caldo de tioglicolato.** Tubos con muestras recolectadas, a la izquierda se encuentra el tubo eppendorf con muestra de saliva, y a la derecha el tubo eppendorf con las muestras de fluido crevicular tomadas con conos de papel y almacenadas en caldo de tioglicolato.

---

### 3.5. Procesamiento de muestras

El procedimiento se realizó alrededor del mechero para evitar contaminación. Todas las muestras se encontraban rotuladas.

Cada tubo se homogenizó en Vortex-Mixer para después, diluir en cloruro de sodio 0,85%. Las muestras de saliva fueron diluidas 1/10, 1/100, 1/1000 y de fluido crevicular 1/10, 1/100, de las últimas dos diluciones de cada muestra, se tomaron 50 µL que fueron sembrados en césped en las placas con agar sangre 5%, hemina y vitamina K, por técnica en rastrillo, para obtener un crecimiento bacteriano homogéneo en toda la placa. Las placas fueron incubadas a 37°C por 15 días en anaerobiosis.



**Figura 6. Jarra y generador de anaerobiosis.** Posterior al sembrado de las muestras en las placas de petri, estas fueron almacenadas en jarras con óptimo sellado y un generador de anaerobiosis, siendo incubadas por 15 días a 37°C.

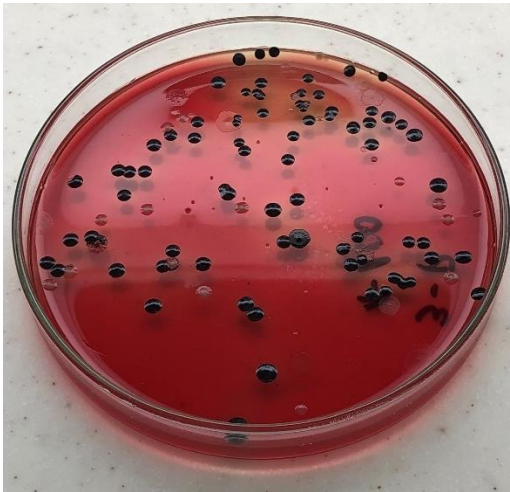
---

### 3.6. Análisis de muestras microbiológicas

Se dividió en etapas que permitieron el recuento de colonias pigmentadas de negro de cada muestra y el reconocimiento molecular de ADN de *P. gingivalis* por medio de PCR.

#### 3.6.1 Recuento de colonias bacterianas pigmentadas de negro

Luego del tiempo de incubación se realizó recuento de todas las colonias pigmentadas de negro que estaban en la placa, con el conteo obtenido se realizó la siguiente ecuación matemática para poder calcular la concentración de UFC en un ml de muestra (unidades formadoras de colonias/ml, UFC/ml).



**Figura 7. Placa de petri con crecimiento de colonias pigmentadas de negro.** Placa posterior a la incubación de 15 días, en donde se cuentan la cantidad de colonias en placa para calcular la concentración de la muestra.

Fórmula para cálculo de concentración de colonias bacterianas en saliva:

UFC PIGMENTADAS DE NEGRO x FACTOR DE DILUCIÓN x 20 (PROPORCIÓN DE MUESTRA A 1 mL)

Fórmula para cálculo de concentración de colonias bacterianas en fluido crevicular:

UFC PIGMENTADAS DE NEGRO x FACTOR DE DILUCIÓN x 20 (PROPORCIÓN DE MUESTRA A 1 mL) x 37,5 (FACTOR DE DILUCIÓN DE LA MUESTRA EN TUBO EPPENDORF)

### 3.6.2 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN bacteriano desde los cultivos de las colonias pigmentadas de negro, de acuerdo con el protocolo propio de un kit comercial (Promega Wizard Genomic ADN Purification Kit), con la cual se pudo realizar extracción de ADN genómico para bacterias gramnegativas.

### 3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de *P. gingivalis* se utilizó el gen 16S rARN, con un tamaño de 197 pares de bases. El procedimiento de PCR permite amplificar algún segmento de ADN específico, por medio de primers o partidores. Las secuencias amplificadas permiten la identificación molecular de la especie o de un grupo de microorganismos con un segmento genético común. Para lograr esto cada muestra (2 µl) fue diluida en 1/10 en agua grado biología molecular, de allí se tomó 1 µl y fueron agregados los siguientes componentes de reacción: Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, buffer PCR, partidor forward, partidor reverse, agua destilada grado biología molecular.

**Tabla 1.** Secuencia de primers del gen 16S rARN de *P. gingivalis*. (15)

PRIMERS <i>P. gingivalis</i>			
NOMBRE	DIRECCIÓN	SECUENCIA	TAMAÑO MOLECULAR
Primer Forward	5' A 3'	(ADN) - TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC	197 pb
Primer Reverse	5' A 3'	(ADN) - ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC	

Secuencias de nucleótidos usados como primers para la amplificación del gen 16S rARN para identificar *P. gingivalis* por medio de PCR convencional.

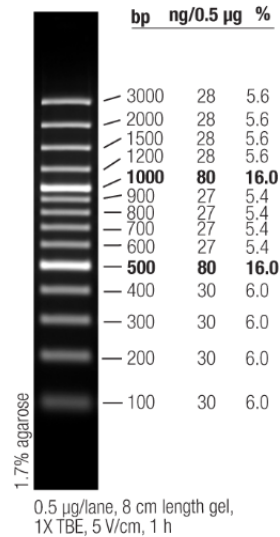
Las condiciones de amplificación de las muestras fueron las siguientes: ciclo inicial de 3 minutos a 95°C, luego 30 ciclos de: 30 segundos a 95°C de desnaturalización, 1 minuto a 60°C para la etapa de anillamiento, 1,5 minutos a 75°C para la elongación y 10 minutos a 72°C para la extensión final. Fueron almacenadas a 4°C para la posterior realización de la electroforesis.

### 3.6.4 Electroforesis en gel de agarosa

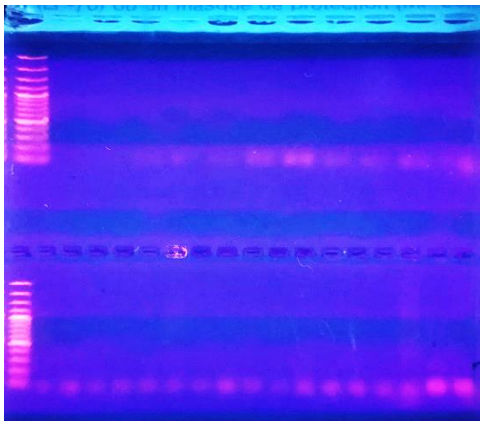
Para analizar la calidad del ADN genómico obtenido de cada muestra, se realizó electroforesis, en gel de agarosa al 1%. Para visualizar los resultados de la PCR

(amplificación de gen específico), se utilizó un gel de agarosa al 1.5%. Para evidenciar el tamaño molecular de los amplicones obtenidos se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Cada muestra amplificada fue mezclada con ADN loading 6x, más 2 µl de redgel 30x. Una vez realizada la electroforesis, el gel fue observado bajo luz UV. La banda amplificada de cada muestra, migrará a la altura de la banda de tamaño comparable del marcador de peso molecular.

**GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder**



**Figura 8. Marcador de peso molecular.** Usado como referencia para verificar que el gen amplificado, presente el mismo tamaño molecular que el primer utilizado de 197 pares de bases (pb).



**Figura 9. Gel de agarosa con resultados de revelado de ADN de muestras.** Revelado visto en luz UV, donde en el carril del extremo izquierdo se puede ver el marcador de peso molecular. En carriles superiores de izquierda a derecha: marcador de peso molecular, control negativo, muestra negativa y muestras con resultado positivo. En fila inferior todos los carriles tienen muestras con resultado positivo.

### 3.7. Análisis de resultados

En la Tabla 2 se presentan las variables utilizadas para el análisis estadístico del estudio, este fue realizado en el programa SPSS 15, donde se analizó frecuencias para la descripción de la muestra, y para relación de variables: pruebas T para variables cuantitativas y chi-cuadrado para variables cualitativas (Figura 10).

**Tabla 2.** Variables utilizadas para el análisis de resultados.

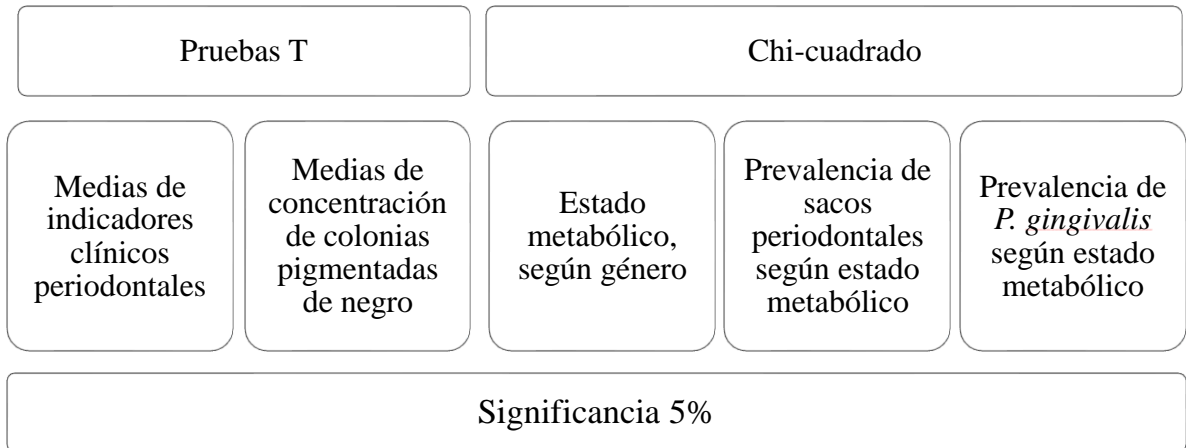
<b>Variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Método de medición</b>
Género	Nominal	Anamnesis
Edad	Escalar discreta	Anamnesis
Cantidad de dientes en boca	Escalar discreta	Examen clínico
Cantidad de sitios en boca	Escalar discreta	Examen clínico
Pérdida de nivel de inserción promedio (mm)	Escalar discreta	Periodontograma
Máxima pérdida de inserción (mm)	Escalar discreta	Periodontograma
Presencia de sacos periodontales	Nominal	Periodontograma
Cantidad de sacos periodontales	Escalar discreta	Periodontograma
Profundidad al sondaje promedio	Escalar discreta	Periodontograma
Máxima profundidad al sondaje	Escalar discreta	Periodontograma
Cantidad de dientes con movilidad dentaria patológica	Escalar discreta	Periodontograma
Movilidad dentaria patológica máxima	Escalar discreta	Periodontograma
Dientes perdidos por periodontitis	Escalar discreta	Anamnesis
Índice de sangrado al sondaje (Ainamo y Bay)	Escalar continua	Periodontograma
Nivel hemoglobina glicosilada	Escalar continua	HbA1c
Compensación Diabetes Mellitus tipo II	Ordinal	HbA1c
Concentración de colonias bacterianas pigmentadas de negro en saliva	Escalar discreta	Cultivo bacteriano
Presencia <i>P. gingivalis</i> en saliva	Nominal	PCR
Concentración colonias bacterianas pigmentadas de negro en fluido crevicular	Escalar discreta	Cultivo bacteriano
Presencia <i>P. gingivalis</i> en fluido crevicular	Nominal	PCR

En cuanto a las variables utilizadas para el análisis de resultados tenemos de tres tipos, el primer grupo corresponde a variables para la descripción del estudio como género, edad y estado metabólico, donde todos estaban diagnosticados con diabetes mellitus tipo II, y fueron catalogados como compensados si el examen de hemoglobina glicosilada (HbA1c) era menor o igual a 6,9% y no compensados si el examen era mayor o igual a 7% (3), en el segundo grupo corresponde a los indicadores periodontales como los que están relacionados a



perdida de inserción, profundidad al sondaje, movilidad dentaria patológica, índice de sangrado, según Ainamo y Bay, y sacos periodontales, este último definido como clínicamente como profundidades al sondaje mayores o iguales a cuatro milímetros (4 mm) asociados a pérdidas de inserción de cuatro milímetros (4 mm) y para el análisis microbiológico tenemos concentración de colonias bacterianas pigmentadas de negro, expresado en unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), y la presencia de *P. gingivalis*.

---



**Figura 10. Esquema de análisis de datos en SPSS 15.** Para estudiar la relación entre dos variables cuantitativas, se utilizó la prueba T de Student para muestras independientes y para la relación entre dos variables cualitativas se usó la prueba chi-cuadrado, en todas las pruebas se hizo con 5% de significancia.

---

## 4. RESULTADOS

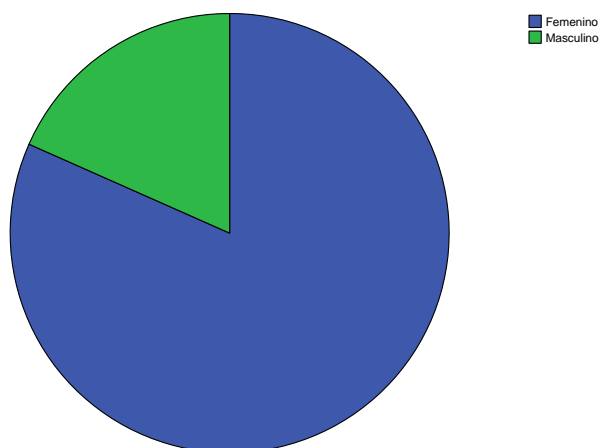
### 4.1. Descripción de la población en estudio

Los pacientes que formaron parte del estudio son usuarios del Centro de Salud Familiar (CESFAM) de la Villa Magisterio en Talca, que cuenta con una población aproximada de 11.000 personas, los cuales son beneficiarios del Fondo Nacional de Salud (FONASA). Dentro de esta población, existe un grupo de 1.972 pacientes controlados en el programa de salud cardiovascular (PSCV), en el subgrupo de diabéticos, a fecha junio de 2019 (16). De este grupo se obtuvo una muestra de 49 pacientes (n=49) que presentaban el diagnóstico de Diabetes mellitus tipo II con las siguientes características.

En la distribución de los pacientes, un 81,6% de la muestra corresponde al género femenino por sobre un 18,4% del género masculino, (Tabla 3 y Figura 11), y sobre el estado metabólico existe un 49% de pacientes con diabetes mellitus tipo II compensada (HbA1c <7%) y un 51% de no compensados (HbA1c >6,9%) (Tabla 4 y Figura 12).

**Tabla 3.** Distribución de la muestra por género.

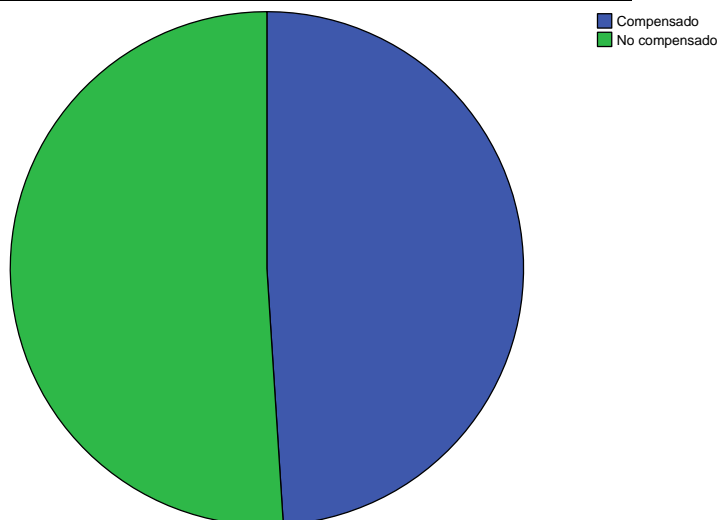
	Frecuencia	Porcentaje
Femenino	40	81,6
Masculino	9	18,4
Total	49	100,0



**Figura 11. Distribución por género de la muestra.** Tabla y figura muestran la distribución de la muestra según género, teniendo una tendencia marcada hacia el género femenino.

**Tabla 4.** Distribución de la muestra por estado metabólico.

	Frecuencia	Porcentaje
Compensado	24	49,0
No compensado	25	51,0
Total	49	100,0

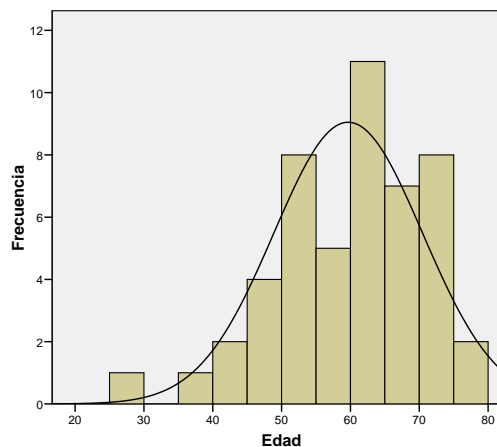


**Figura 12.** Distribución de acuerdo al estado metabólico de los pacientes. Tabla y figura muestran distribución de la muestra según estado metabólico, cercano al 50% tanto para compensados como para no compensados en su diabetes mellitus tipo II.

Sobre la edad de los pacientes, la curva de frecuencias está sesgada hacia la izquierda, presentándose una alta prevalencia del grupo sobre los cincuenta años de edad, la mediana del conjunto es de 62 años (Tabla 5 y Figura 13).

**Tabla 5.** Estadística de la edad de la muestra.

Media	59,67
Mediana	62,00
Desv. típ.	10,802
Asimetría	-,652
Mínimo	29
Máximo	77



**Figura 13.** Histograma de distribución de frecuencias de edad de la muestra. Gráfico que muestra un sesgo hacia la izquierda, y que las mayores frecuencias se presentan entre los 50 y 75 años de edad.

En la distribución del estado metabólico de los pacientes según el género de estos, en la población femenina estudiada existe un 57% con diabetes mellitus tipo II compensada, y en el género masculino tenemos mayoría (88,9%) que presentan descompensación de su patología sistémica (Tabla 6).

**Tabla 6.** Proporción de la muestra de estado metabólico según género.

			Género		Total
			Femenino	Masculino	
Estado metabólico del paciente	Compensado	Recuento	23	1	24
		% de Género	57,5%	11,1%	49,0%
	No compensado	Recuento	17	8	25
		% de Género	42,5%	88,9%	51,0%
Total		Recuento	40	9	49
		% de Género	100,0%	100,0%	100,0%

De la muestra, separados por género, un 57,5% de las pacientes del género femenino se encontraban con su patología sistémica compensada, a diferencia de la tendencia en el subgrupo del género masculino que tenían una mayoría con su diabetes mellitus no compensada (88,9%).

#### 4.2. Características clínicas de los pacientes estudiados

Comparando los indicadores clínicos periodontales de pacientes diabéticos compensados y no compensados, en cuanto a la prevalencia de los sacos periodontales, son mayoría en el grupo de los no compensados, mientras que en el grupo de los compensados es más prevalente la ausencia de éstos (Tabla 7).

Al comparar las medias de indicadores periodontales, tenemos diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de dientes en boca, la cantidad de dientes con movilidad patológica y en la movilidad dentaria patológica máxima, todas estas siendo mayores en el grupo de los no compensados. En las medias de cantidad de sacos periodontales, tenemos diferencias sin significancia estadística, pero destaca que el grupo de no compensados tenga el doble en cantidad de sacos periodontales a los que están compensados (Tabla 8).

**Tabla 7.** Prevalencia de sacos periodontales según estado metabólico.

		Estado metabólico del paciente		Total	
		Compensado	No compensado		
Presencia de sacos periodontales	No	Recuento	14	11	25
		% de Estado metabólico del paciente	58,3%	44,0%	51,0%
	Si	Recuento	10	14	24
		% de Estado metabólico del paciente	41,7%	56,0%	49,0%
Total		Recuento	24	25	49
		% de Estado metabólico del paciente	100,0%	100,0%	100,0%

Del total de la muestra, la mitad presenta sacos periodontales, pero según estado metabólico, existe una mayoría que proviene de las pacientes que no tenía compensada la diabetes mellitus tipo II.

**Tabla 8.** Comparativa de indicadores clínicos periodontales según estado metabólico.

	Estado metabólico	
	Compensado	No compensado
Cantidad de dientes en boca*	15,75	20,36
Pérdida de nivel de inserción (mm)	2,62	3,14
Máxima pérdida de inserción (mm)	6,17	7,08
Porcentaje de sitios con pérdida de inserción	96,78%	96,32%
Cantidad de sacos periodontales	2,29	4,64
Profundidad al sondaje (mm)	1,95	2,33
Máxima profundidad al sondaje (mm)	3,83	4,72
Cantidad de dientes con movilidad patológica*	3	5,4
Movilidad dentaria patológica máxima*	0,88	1,52
Cantidad de dientes perdidos por periodontitis	2,29	1,24
Porcentaje de sangrado al sondaje	27,02%	25,39%

Marcados con asterisco (\*) las diferencias estadísticamente significativas, de estos indicadores periodontales con diferencias son: cantidad de dientes en boca, cantidad de dientes con movilidad patológica, y máxima movilidad dentaria patológica.

#### 4.3. Relación de *P. gingivalis* con estado metabólico

En cuanto al recuento de las colonias pigmentadas de negro, las concentraciones (UFC/ml) en saliva no tienen grandes diferencias en los grupos estudiados, y las concentraciones en fluido crevicular, se obtuvo una diferencia de casi  $10 \times 10^6$  UFC/ml de

colonias pigmentadas de negro, siendo mayor en el grupo de los no compensados, lo que no es significativo estadísticamente (Tabla 9).

**Tabla 9.** Recuento de colonias pigmentadas de negro en saliva y fluido crevicular, según estado metabólico.

	Estado metabólico	
	Compensado	No compensado
Recuento de colonias pigmentadas de negro en saliva (UFC/ml)	7.031.083,33	6.840.800
Recuento de colonias pigmentadas de negro en fluido crevicular (UFC/ml)	12.968.125	22.164.300

Similitud en los recuentos de colonias pigmentadas de negro en las muestras de saliva de ambos grupos, pero existe una diferencia de  $10 \times 10^6$  UFC/ml, en las muestras de fluido crevicular, siendo las con mayor concentración, la del grupo no compensado, diferencia que no tiene significancia estadística.

Se categorizó a los pacientes en cuatro grupos, de acuerdo con la prevalencia de sacos periodontales y el estado metabólico:

1. Pacientes con sacos periodontales, con diabetes mellitus compensada
2. Pacientes con sacos periodontales, con diabetes mellitus no compensada
3. Pacientes sin sacos periodontales, con diabetes mellitus compensada
4. Pacientes sin sacos periodontales, con diabetes mellitus no compensada

El recuento de colonias pigmentadas de negro en saliva era similar en todos los grupos, por lo que en las comparaciones que se mencionarán, solo se tendrán en cuenta las muestras de fluido crevicular (Tabla 10).

Sobre los grupos que tenían sacos periodontales (Tabla 10), el grupo que no está compensado tiene  $5 \times 10^6$  UFC/ml en fluido crevicular, más que el grupo que tiene su diabetes mellitus compensada, diferencia que no es significativa estadísticamente.

En los grupos que no tenían prevalencia de sacos periodontales (Tabla 10), las medias de recuento de los pacientes no compensados tienen  $11 \times 10^6$  UFC/ml de concentración más que el grupo que tiene compensada su diabetes, diferencia que no tiene significancia estadística.

En los grupos que no estaban compensados en su condición sistémica, existe una diferencia de  $3 \times 10^6$  UFC/ml, mayor en el grupo con presencia de sacos periodontales, siendo

la menor diferencia de medias de concentración de los grupos comparados, diferencia que no es estadísticamente significativa (Tabla 10).

**Tabla 10.** Recuento de colonias pigmentadas de negro de pacientes clasificados según prevalencia de sacos y estado periodontal.

	Estado metabólico			
	Con saco periodontal, compensado	Con saco periodontal, no compensado	Sin saco periodontal, compensado	Sin saco periodontal, no compensado
Recuento de colonias bacterianas pigmentadas de negro en saliva (UFC/ml)	7228000	7622857,1	6890428,6	5845454,6
Recuento de colonias bacterianas pigmentadas de negro en fluido crevicular (UFC/ml)	18225750	23383928,6	9212678,6	20612045,5

Las concentraciones de colonias pigmentadas de negro en muestras de saliva son similares, mientras que en las muestras de fluido crevicular existen diferencias (no significativas) de, al menos,  $9 \times 10^6$  UFC/ml entre el grupo que no presentan sacos periodontales y diabetes compensada, con los otros grupos, siempre teniendo menores concentraciones el primer grupo.

Sobre los resultados obtenidos en el método de reconocimiento molecular usado en este estudio (PCR convencional), en las muestras procesadas se detectó una alta prevalencia de *P. gingivalis*, donde solo una muestra de las cuarenta y nueve no se amplificó el gen 16S rRNA de *P. gingivalis*, donde la muestra con resultado negativo es del grupo de los no compensados. El resultado fue el mismo tanto para las muestras de saliva como las de fluido crevicular, no existiendo diferencias entre los individuos diabéticos compensados como no compensados (Tabla 11).

**Tabla 11.** Prevalencia de la *P. gingivalis* según el estado metabólico de los pacientes.

			Estado metabólico del paciente		Total
			Compensado	No compensado	
Presencia <i>P. gingivalis</i>	Negativo	Recuento	0	1	1
		% de Estado metabólico del paciente	0,0%	4,0%	2,0%
	Positivo	Recuento	24	24	48
		% de Estado metabólico del paciente	100,0%	96,0%	98,0%
Total		Recuento	24	25	49
		% de Estado metabólico del paciente	100,0%	100,0%	100,0%

Existe una alta prevalencia de *P. gingivalis* (98%), sin diferencias según el estado metabólico del paciente.

## 5. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han pretendido buscar elementos que expliquen las alteraciones metabólicas con el objetivo de controlarlas, y en nuestro caso, queremos reflejar la realidad local a través del estudio de prevalencia y concentración de *P. gingivalis* y una posible relación con el control glicémico. Relación que no ha sido posible establecer porque existe una alta prevalencia de *P. gingivalis* independiente del estado metabólico del paciente y en cuanto a la concentración existen diferencias entre ambos grupos que no son estadísticamente significativas.

La investigación realizada detectó una alta prevalencia de *P. gingivalis* mediante métodos de cultivo e identificación molecular, encontrando un 98 % de prevalencia del total de la muestra estudiada. Esto concuerda con resultados obtenidos en diferentes estudios realizados en Chile y en el mundo. Gajardo et al. (16) estudiaron 17 pacientes con periodontitis crónica en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile en Santiago, obteniendo un 76,47 % de *P. gingivalis* en cultivo microbiológico de muestras de placa subgingival. Herrera et al. (17) estudiaron 37 pacientes con periodontitis crónica, que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile en Santiago, y obtuvo un 83,8 % de prevalencia en la detección microbiológica de *P. gingivalis*. Herrera et al. comparó además la prevalencia de Chile con la obtenida en Colombia y España, donde se obtuvo un 65,9 % y 77,8 % de prevalencia respectivamente.

Adicionalmente se encontró diferencias de concentración de *P. gingivalis* entre compensados y no compensados, observando una diferencia en saliva de 190.283,33 UFC/ml y en fluido crevicular de 9.196.175 UFC/ml, y ambas no significativas, y en el análisis de los subgrupos participantes del estudio se observó diferencias de concentración de *P. gingivalis* entre pacientes compensados con sacos periodontales y pacientes no compensados con sacos periodontales. Esta diferencia podría estar asociada a las condiciones de anaerobiosis que se presentan en los pacientes, acompañado además de un estado inflamatorio, aumento de la temperatura, aumento del pH, aumento del fluido crevicular y disminución de las reacciones REDOX (18).



Es bien sabido que las infecciones pueden influir negativamente en el control de DM y HbA1c (19). En este contexto, se ha investigado un vínculo biológico entre el control de DM y la EP, y se han realizado revisiones para evaluar la evidencia de que el tratamiento periodontal influye en el control de la DM, encontrándose una factibilidad biológica y una relación bidireccional entre EP y DM, asociado a una inmunodeficiencia en el huésped. (20) (21)

Los resultados mostraron diferencias entre los grupos de estudio, pero no estadísticamente significativas, a diferencia de Aoyama et al. (10), los cuales fueron estadísticamente significativas. Esto podría deberse a la cantidad de la muestra en este último estudio, la cual fue de 112 pacientes, logrado una distribución homogénea de datos en relación con las variables estudiadas. Además, el diseño del estudio fue diferente en cuanto a los criterios de inclusión y exclusión, como fumadores, hipertensión arterial y dislipidemia, factores asociados a EP y consecuente concentración de *P. gingivalis*. También está descrito en la literatura una variabilidad de proporciones en cuanto a esta bacteria, por lo cual la EP se puede presentar de manera diferente en la población. (11)

Además, se puede observar que ha aumentado con el tiempo la prevalencia de *P. gingivalis* en la población y a pesar de la asociación de esta bacteria con la periodontitis, también se ha encontrado presente en sitios periodontalmente sanos, y surge la pregunta, ¿*P. gingivalis* se ha transformado en parte de la microbiota normal del ser humano?

Mediante la identificación molecular se logró verificar que en las colonias pigmentadas de negro que fueron estudiadas existe presencia de *P. gingivalis*. Existen pequeñas variaciones que hacen que el tamaño molecular varíe levemente, lo cual responde a la variabilidad genética en la *P. gingivalis*. Esta especie se encuentra sufriendo cambios constantemente, con nuevas variantes emergiendo y otras desapareciendo. (22)

En cuanto a la *P. gingivalis* en la población, la importancia radica en analizar en futuros estudios la presencia de los factores de virulencia, dado que en individuos se pueden presentar los factores de virulencia en un momento dado y en otro momento pueden estar ausentes, esto podría ser un factor que explique una respuesta más o menos agresiva entre los distintos pacientes.

Dado que existe una diferencia importante entre nuestro trabajo y los descritos en la literatura, podríamos pensar que el cálculo de nuestra muestra no fue adecuado para lograr los resultados esperados. Nuestra sugerencia es hacer el cálculo de la muestra en función de la prevalencia nacional de *P. gingivalis* y realizar un diseño con criterios de inclusión y exclusión adecuados para la obtención de una muestra homogénea, para lograr resultados significativos o para confirmar los resultados obtenidos en este estudio, en cuanto a la diferencia de concentración de *P. gingivalis* entre compensados y no compensados, la relación de la concentración de *P. gingivalis* del grupo descompensado sin sacos periodontales y el grupo compensado con sacos periodontales, y diferencia de la prevalencia de sacos periodontales y la cantidad de ellos entre compensados y no compensados.

Nuestro trabajo refleja la alta prevalencia de *P. gingivalis* en Chile descrita en la literatura y la posibilidad de encontrar un periodonto enfermo en aquellos pacientes que tienen altos valores de HbA1c.

Concluimos que existe una alta prevalencia de *P. gingivalis* independiente del estado metabólico del paciente, existen diferencias en cuanto a la concentración de *P. gingivalis* entre los pacientes compensados y no compensados, y ambos resultados no son estadísticamente significativas.

## 6. REFERENCIAS

1. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol.* 2018;45 Suppl 20:S149-s61. doi: 10.1111/jcpe.12945.
2. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Clin Periodontol.* 2018;45 Suppl 20:S9-s16. doi: 10.1111/jcpe.12936.
3. OMS. Informe Mundial sobre la Diabetes. In: OMS, editor. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud; 2016. p. 21.
4. MINSAL. Guía Clínica Diabetes Mellitus Tipo 2. In: Salud Md, editor. Santiago, Chile2010. p. 4-6.
5. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica.* 4º Edición ed. Madrid2005. 1096 p.
6. Makiura N, Ojima M, Kou Y, Furuta N, Okahashi N, Shizukuishi S, et al. Relationship of Porphyromonas gingivalis with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(4):348-51. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00426.x.
7. Camarena AH, Anaya YB, Pérez MdLM, Mendoza JAL. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *Oral.* 2016;17(54): 1374-8.
8. Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontal Res.* 2012;47(4):470-8. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01455.x.
9. Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013;48(1):30-6. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x.
10. Aoyama N, Suzuki JI, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, et al. Increased Oral Porphyromonas gingivalis Prevalence in Cardiovascular Patients with Uncontrolled Diabetes Mellitus. *Int Heart J.* 2018;59(4):802-7. doi: 10.1536/ihj.17-480.
11. Contreras A, Moreno SM, Jaramillo A, Pelaez M, Duque A, Botero JE, et al. Periodontal microbiology in Latin America. *Periodontol 2000.* 2015;67(1):58-86. doi: 10.1111/prd.12074.

12. Araujo M. Categorías generales de estudios clínicos. Medwave. 2011.
13. OMS. La cesación del consumo de Tabaco. In: Salud Md, editor. Santiago, Chile2003. p. 10.
14. Carrasco J, Jover L. Métodos estadísticos para evaluar la concordancia. Medicina Clinica - MED CLIN. 2004;122:28-34. doi: 10.1157/13057543.
15. Tran SD, Rudney JD. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbiol. 1999;37(11):3504-8.
16. Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras A, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. J Periodontol. 2005;76(2):289-94. doi: 10.1902/jop.2005.76.2.289.
17. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. J Clin Periodontol. 2008;35(2):106-13. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01170.x.
18. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005;38:135-87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x.
19. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest. 2006;116(7):1793-801. doi: 10.1172/jci29069.
20. Simpson TC, Weldon JC, Worthington HV, Needleman I, Wild SH, Moles DR, et al. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev. 2015(11):Cd004714. doi: 10.1002/14651858.CD004714.pub3.
21. Teeuw WJ, Gerdes VE, Loos BG. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Care. 2010;33(2):421-7. doi: 10.2337/dc09-1378.
22. Abusleme L, Pozo P, Silva N. Genotipificación de *Porphyromonas gingivalis* en Pacientes con Periodontitis. Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral. 2009;2(2):54-8. doi: 10.1016/S0718-5391(09)70145-4.

## 7. ANEXOS



### ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. UNIVERSIDAD DE TALCA

Talca, 08 de julio de 2019

REGISTRO: 2019050

A juicio de este Comité la presente investigación cumple con los estándares ético-científicos necesarios para su ejecución.

Título del Proyecto: "Prevalencia y concentración de *porphyromonas gingivalis*, en saliva y saco periodontal, en pacientes diabéticos con enfermedad periodontal".

Investigador Responsable: Sergio Matus Fuenzalida. Departamento de Estomatología. Escuela de Odontología. Facultad de Ciencias de la Salud.

NOTA: la obtención de cartas de autorización del o la directivo/a de los establecimientos en los cuales realizará la investigación es de exclusiva responsabilidad de los/as investigadores/as.

UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
COMITE DE ETICA CIENTIFICA



**ACTA DE APROBACIÓN. CEC Facultad de Ciencias de la Salud**  
Titulo: "Prevalencia y concentración de *porphyromonas gingivalis*, en saliva y saco periodontal, en pacientes diabéticos con enfermedad periodontal".  
Investigador Responsable: Sergio Matus F.

  
Prof. Wendy Donoso T.

  
Prof. Karla Garbetta T.

  
Prof. Sergio Plana Z.

  
Prof. Guillermo Ramirez T.

  
Prof. María Ramirez

UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
COMITE DE ETICA CIENTIFICA

Talca, 08 de julio de 2019

- 2 -

**Anexo 1.** Acta de aprobación de proyecto otorgado por comité ético científico de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca.

Documento que certifica que el proyecto de memoria cumple con los estándares ético-científicos para poder ser ejecutado.