



**finis**  
Universidad Finis Terrae  
Facultad de Odontología

UNIVERSIDAD FINIS TERRAE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DETECCIÓN DEL GEN CODIFICANTE PARA LA ENZIMA METIONINA-  
GAMMA-LIASA ASOCIADA A BACTERIAS PRODUCTORAS DE  
COMPUESTOS VOLÁTILES SULFURADOS EN PACIENTES  
DIAGNOSTICADOS CON ENFERMEDAD PERIODONTAL ATENDIDOS  
EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD FINIS TERRAE  
DURANTE EL AÑO 2023

FELIPE CÁCERES CERDA  
VICENTE CONSTANZO CHACÓN

Tesis presentada a la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae, para  
optar al título de Cirujano Dentista

Profesores guías: Dr. Daniel Hevia Magaña y Dr. Matías Jofré Bartholin

Santiago, Chile  
2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecerle a todo el equipo involucrado en la realización de esta investigación.

A nuestros doctores tutores, Dr. Daniel Hevia y Dr. Matías Jofré, por confiar en nosotros, por la buena disposición en ayudarnos y guiarnos y por las ganas de llevar a cabo este estudio.

A la Dra. Liliana Berrocal, quien nos acogió de la mejor manera y nos acompañó durante todo el proceso, sugiriendo ideas claves y siendo parte fundamental en todo esto.

A Víctor Ahumada, el que más paciencia tuvo con nosotros.

Y finalmente a nuestra familia y amigos quienes nos acompañaron durante este proceso.

Gracias totales.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
2.2. Halitosis .....	12
2.2. Clasificación y etiología de Halitosis .....	13
2.3. Halitosis genuina patológica intraoral.....	16
2.4. Diagnóstico de Halitosis.....	17
2.4.1. <i>Evaluación organoléptica</i> .....	17
2.4.2. <i>Cromatografía de gases</i> .....	18
2.4.3. <i>Monitor de sulfuro</i> .....	18
2.5. Bacterias asociadas a halitosis .....	19
2.6. Compuestos olorosos .....	21
2.7. Enzimas productoras de compuestos volátiles sulfurados y compuestos olorosos .....	22
2.8. Halitosis y Enfermedad Periodontal .....	23
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>26</b>

5.1. Diseño del estudio.....	26
5.2. Universo y muestra .....	26
5.3. Criterios de inclusión y exclusión .....	26
5.4. Variables .....	28
5.5. Procedimientos para la medición de variables.....	29
5.5.1. <i>Recolección de bacterias anaerobias fastidiosas</i> .....	29
5.5.2. <i>Cultivo de bacterias anaerobias fastidiosas con jarra de cultivo</i> .....	29
5.5.3. <i>Extracción de DNA genómico (gDNA)</i> .....	30
5.5.4. <i>PCR convencional para detección de los genes pg y mgl</i> .....	30
5.5.5. <i>Electroforesis en gel de agarosa al 1,2%</i> .....	32
5.5.6. <i>Análisis e interpretación de los datos</i> .....	33
<b>CONSIDERACIONES ÉTICAS .....</b>	<b>33</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Términos relacionados con halitosis.....	13
Tabla 2: Causas orales de halitosis.....	15
Tabla 3: Causas no orales de halitosis y otras causas.....	16
Tabla 4: Principales bacterias relacionadas a halitosis .....	19
Tabla 5: Compuestos olorosos que causan mal olor bucal.....	21
Tabla 6: Variables .....	28
Tabla 7: Especificación de secuencias de partidores para los genes 16S rRNA pg y mgl .....	31
Tabla 8: Clasificación organoléptica.....	34
Tabla 9: Frecuencia obtenida para la presencia del gen mgl y 16s.....	40
Tabla 10: Análisis de variables medidas en los 8 pacientes con presencia del gen mgl	40
Tabla 11: Análisis de variables medidas según grupo de estudio.....	41

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Clasificación de halitosis según Miyazaki .....	14
Ilustración 2: Patogénesis de la halitosis.....	22
Ilustración 3: Cultivos bacterianos en agar-sangre suplementado con hemina- manadiona.....	35
Ilustración 4: Presencia de mgl en colonias de P. gingivalis provenientes de la atcc.....	36
Ilustración 5: Presencia de mgl en cultivos provenientes de pacientes sanos .....	37
Ilustración 6: Presencia de mgl en cultivos provenientes de pacientes con gingivitis ....	38
Ilustración 7: Presencia de mgl en cultivos provenientes de pacientes con periodontitis .....	39

## RESUMEN

**Introducción:** La halitosis afecta al 25% de la población global, se presenta a través de compuestos volátiles sulfurados los que pueden desencadenar procesos inflamatorios pudiendo contribuir al desarrollo de la enfermedad periodontal, la cual afecta a más del 50% de la población mundial.

**Objetivos:** Asociar la presencia de los genes *mgl* para metionina-gamma-liasa y *16S rRNA pg* para *P. gingivalis* en pacientes con diagnóstico de enfermedad periodontal y comparar la frecuencia de detección de estos genes entre los grupos de estudio.

**Metodología:** Se recolectaron muestras salivales de pacientes con distintos diagnósticos periodontales. Las muestras fueron cultivadas, se les realizó extracción del DNA genómico, las cuales se amplificaron para finalmente analizar en una electroforesis la presencia o ausencia de los genes *mgl* y *pg* en cada uno de los grupos.

**Resultados:** Se observó presencia del gen *mgl* en 8 muestras de pacientes periodontales (13%), no así en pacientes sanos y con gingivitis, que tuvieron ausencia de este gen en todas sus muestras. El gen *16S rRNA pg* estuvo ausente en todas las muestras de estudio.

**Discusión y conclusión:** Este estudio confirma la presencia del gen *mgl* en pacientes con periodontitis, sugiriendo una relación de esta en el desarrollo y severidad de la enfermedad periodontal.

**Palabras clave:** Bacterias anaerobias, compuestos volátiles sulfurados, halitosis oral patológica, metionina-gamma-liasa.

## ABSTRACT

**Introduction:** Halitosis affects 25% of the global population and it manifests through volatile sulfur compounds that can trigger inflammatory processes, contributing to the progress of periodontal disease, which affects over 50% of the world's population.

**Objectives:** Relate the presence of the *mgl* gene for methionine-gamma-lyase and *16S rRNA pg* gene for *Porphyromonas gingivalis* in patients diagnosed with periodontal disease and compare the detection frequency of these genes among the study groups.

**Methodology:** Salivary samples were collected from patients with different periodontal diagnoses. The samples were grown, genomic DNA was extracted, amplified, and then analyzed on agarose gel electrophoresis to determine the presence or absence of the *mgl* and *pg* genes in each group.

**Results:** The *mgl* gene was present in 8 samples from periodontal patients (13%), but was absent in healthy and gingivitis patients, who showed no presence of this gene in any of their samples. The *16S rRNA pg* gene was absent in all study samples.

**Discussion and conclusion:** This study confirmed the presence of the gene *mgl* in patients with periodontitis, suggesting a relationship between its presence and the progress and severity of periodontal disease.

**Keywords:** Anaerobic bacteria, volatile sulfur compounds, pathological oral halitosis, methionine-gamma-lyase.

## INTRODUCCIÓN

La halitosis o mal aliento, es una situación común que afecta a muchas personas, se estima que a un 25% de la población mundial, afectando a uno de cada tres adultos mayores de 60 años, lo que constituye un problema de ámbito social, ya que el ser humano establece relaciones interpersonales, que podrían verse obstaculizadas generando ansiedad e inclusive aislamiento (1, 2, 6, 7), por lo que se ha vuelto un tema relevante dentro de la sociedad y la salud pública. La función del odontólogo u odontóloga es crucial en el tratamiento, ya que corresponde a la tercera causa más común de consulta, por lo que somos un factor clave para mejorar la calidad de vida del paciente (3, 25). La halitosis tiene origen multifactorial y está relacionado con diversas enfermedades bucales y sistémicas, como la enfermedad periodontal (EP) (4). Tras su establecimiento, la EP es una patología inflamatoria crónica que comienza como una inflamación gingival inducida por biofilm bacteriano subgingival (gingivitis), esta inflamación corresponde a la primera respuesta del sistema inmune de la persona, y como este proceso no está acompañado de pérdida de inserción, si el biofilm se remueve, el cuadro clínico puede revertirse. Sin embargo, si no es eliminado, esta condición puede convertirse en un cuadro crónico llamado periodontitis. Esta última se caracteriza por una destrucción del tejido periodontal de soporte, así como el hueso subyacente del diente, manifestándose clínicamente con inflamación gingival, recesiones gingivales, movilidad dentaria y en casos avanzados en pérdida dentaria (5, 14, 15). La halitosis, puede ser un signo temprano de la EP y su carga bacteriana podría variar según la etapa de esta última.

Estudios realizados en Perú el año 2022 se enfocaron sobre la prevalencia de halitosis en adolescentes entre 13 y 17 años encontrando que de 167 participantes el 54,5% padecía de esta condición (16). Por otro lado, en Barcelona en el año 2014 un estudio buscó estimar una prevalencia de halitosis oral en una población juvenil y el efecto de masticar chicle sobre la halitosis obteniendo que de una muestra de 121 jóvenes hubo una prevalencia del 36% de halitosis y el uso de chicle como coadyuvante para la halitosis disminuye los CVS y mejora la percepción del paciente y terceros (17). De este modo, la

relevancia de estudiar casos de halitosis no solo se enmarca dentro de las poblaciones de adultos mayores que, además, presentan EP, sino que al parecer el problema comienza desde edades tempranas. La cavidad oral alberga una microbiota variada y dinámica, con una estimación de alrededor de 700 especies. La prevalencia relativa de ciertas especies por sobre otras está influenciada por la salud general del individuo, como la presencia de caries, enfermedad periodontal o estomatitis (59). Dicho esto, en casos de presentarse condiciones que comprometen el estado de salud oral del paciente, proliferan especies, como: *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides*, *Centipeda*, *Selenomonas*, *Klebsiella pneumoniae* y *Peptostreptococcus* que metabolizan alimentos y tejidos del paciente generando Compuestos Volátiles Sulfurados (CVS) como metil mercaptano, dimetil sulfuro e hidrógeno sulfurado, entre otros, que son los responsables del mal olor (18). Cabe destacar que las bacterias responsables de la generación de mal olor principalmente son gram negativas, mientras que la participación de bacterias gram positivas es menor, ya que se asocian principalmente a otro procesos patológicos como la carcinogénesis, ej: *Streptococcus del grupo viridans* (18). Además, los CVS pueden actuar como sustancias tóxicas para las células epiteliales, desencadenando un proceso inflamatorio que contribuye al desarrollo de gingivitis y la consecuente periodontitis, condición que afecta a más del 50% de la población mundial (8, 9), en Chile hay pocos estudios reportados hasta fecha con muestras representativas que valoren la condición periodontal, pero un estudio del 2010 reveló que un 69% de adultos mayores entre 65 a 74 años tenían una pérdida de inserción clínica severa de al menos 6 mm y un 97% de estos mismos presentaban una pérdida de inserción clínica de al menos 3 mm en 1 o más dientes (58).

Respecto de lo anterior, se ha comprobado que la saliva de pacientes que presentan periodontitis se descompone más rápido y genera olor más desagradable que la saliva de pacientes sanos (10). Hace más de 15 años, en un estudio realizado en Estados Unidos, se reporta que *Streptococcus parasanguinis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus oralis*, *sanguinis*, *salivarius* y *Veillonella atypica* se encontraron principalmente en individuos diagnosticados con

halitosis y que, además, producían altos niveles de CVS y tienen un rol en la patogénesis de enfermedades inflamatorias (11). Por otro lado, un estudio realizado en el año 2012 en Japón, reveló que las mediciones de la cantidad de CVS producido están directamente relacionadas con la progresión de periodontitis en adultos mayores de 70 años no fumadores (12).

En vista que la halitosis es una condición y no una patología, se vuelve difícil para el campo odontológico llevar a cabo una estandarización de su diagnóstico y tratamiento (3). Sin embargo, como se ha mencionado, estudios recientes han demostrado que un aumento en la población de bacterias productoras de CVS en la saliva puede ser un indicador útil de la presencia y gravedad de la enfermedad periodontal (13). Aun con estos avances, la población de bacterias productoras de CVS en las distintas etapas de la enfermedad periodontal no ha sido del todo estudiada, desconociéndose si la carga bacteriana productora de CVS o la cuantificación de estos compuestos, guarda relación con el desarrollo y la gravedad de la EP. Sin embargo estas bacterias productoras de CVS suelen concentrarse en zonas como dorso lingual (2/3 posteriores en su mayoría), sacos periodontales y saliva (24,60).

Finalmente, en nuestro país, no se registran datos sobre la incidencia y/o prevalencia sobre halitosis, además, son escasos los estudios que relacionen halitosis y EP a nivel molecular. De este modo, nuestro estudio resultaría de todas formas “pionero” en generar información al respecto.

Desde el punto de vista metodológico, se identificará y evaluará la presencia o ausencia del gen *mgI* que codifica para una enzima asociada a la producción de CVS en pacientes diagnosticados con periodontitis de la clínica odontológica de la Universidad Finis Terrae. Con el propósito de conocer si es posible detectar con mayor frecuencia este gen en una población de pacientes con diagnóstico de periodontitis a diferencia de un grupo de pacientes con diagnóstico de gingivitis. que al ser un estadio previo se

esperaría menor frecuencia del gen y en una población de pacientes sanos donde se esperaría ausencia de este gen.

Es importante señalar que no existen datos disponibles sobre la prevalencia de la halitosis en la población chilena. Por lo tanto, los resultados de este estudio resultan útiles para recopilar datos epidemiológicos en el futuro y ampliar nuestro conocimiento al respecto, además de proyectar nuevas investigaciones donde se busque una asociación con el grado de EP y la halitosis, o bien, asociar el desarrollo y progresión de enfermedades sistémicas que se han abordado desde el grado de EP, pero que no se han estudiado desde el punto de la halitosis previa a la EP.

## MARCO TEÓRICO

### 2.2. Halitosis

Halitosis es el término utilizado para referirse a un aliento desagradable que es producto de factores fisiológicos y/o patológicos, ya sea de origen bucal o sistémico (1). Corresponde a una condición que afecta a casi un tercio de la población mundial (20), tanto a hombres como mujeres de todas las edades (19). En 2017 una revisión sistemática que consideró 584 artículos dio como resultado una prevalencia combinada de 31,8% con una tendencia al aumento en el tiempo (26). Aun con este tipo de estudios, la prevalencia de esta condición aun no es del todo exacta debido a discrepancias en cuanto al método de diagnóstico se refiere, ya que muchos estudios se basan en una evaluación subjetiva para diagnosticar halitosis (24).

La Halitosis corresponde a la tercera causa común de visita al dentista, detrás de caries y enfermedad periodontal (25). Tiene un origen multifactorial y actualmente se describen dos grandes orígenes: Halitosis Oral, y Halitosis Extraoral; siendo la primera la principal causa de consulta odontológica.

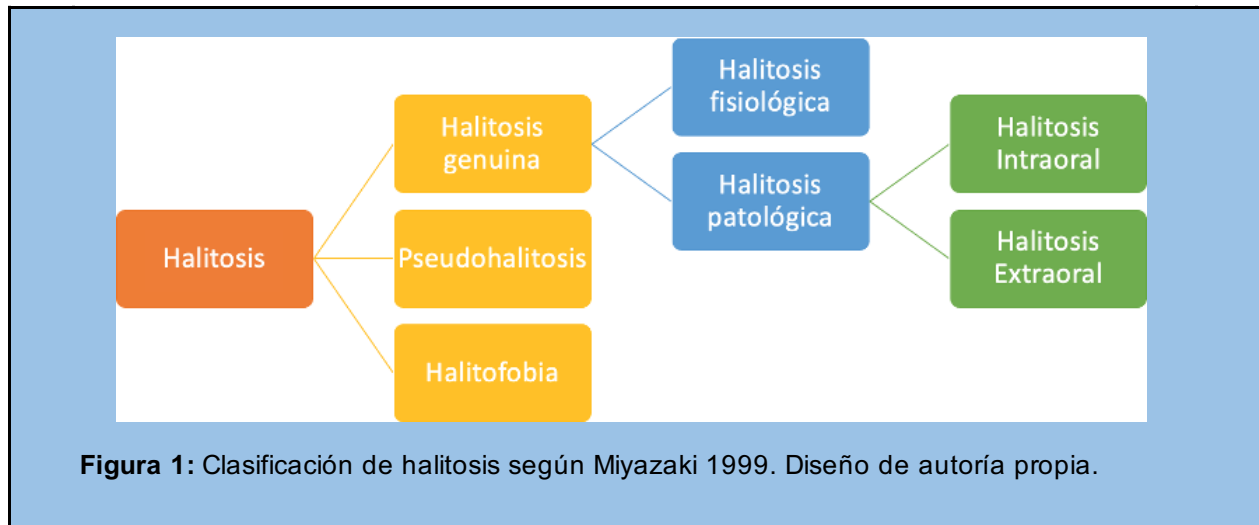
Como problema, la halitosis también afecta el ámbito socio-cultural de la persona, resultando en un aumento de estrés social, emocional y psicológico. Además, el estrés puede exacerbar la condición de halitosis ya establecida (21, 22). El paciente que padece halitosis puede no estar consciente de su condición debido a que genera tolerancia y/o puede acostumbrarse al olor, y son terceras personas (cercaños, amigos, familiares, parejas, etc) quienes dan cuenta de la situación (23).

## 2.2. Clasificación y etiología de Halitosis

**Tabla 1:** Términos relacionados con halitosis. Adaptación de Goncalves J. 2010 (27).

<b>Término</b>	<b>Significado</b>
Halitosis genuina	Existe halitosis percibida, es decir, un mal olor obvio superior al socialmente aceptable y suele ser apreciada por exámenes organolépticos u otros exámenes físico-químicos
Pseudohalitosis	No hay halitosis percibida, pero el paciente insistentemente se queja de su existencia por autopercepción
Halitofobia	El paciente aún cree que padece halitosis incluso después de tratar con éxito la halitosis genuina o como derivación de pseudohalitosis
Halitosis fisiológica	Halitosis genuina que es originada en el dorso de la lengua, es auto-limitada, no necesita terapia. Es más un problema cosmético que una condición relacionada con salud
Halitosis patológica	Halitosis genuina permanente que no soluciona por los métodos usuales de higiene y que dificulta al paciente llevar una vida "normal"
Halitosis oral	Halitosis genuina y patológica cuyo origen es la boca o el dorso posterior de la lengua
Halitosis extraoral	Halitosis patológica cuyo origen es exterior a la boca (tracto respiratorio, sistema digestivo, desordenes sistémicos, etc.)

Hoy en día hay distintos términos que se usan para describir la condición de halitosis que presenta un paciente dependiendo de su etiología (tabla 1). Si bien existen al menos 6 tipos de clasificaciones hasta la fecha, para fines prácticos de este estudio se utilizará la clasificación de Miyazaki de 1999 (28) debido a su simplicidad y sencillez, lo cual facilita la comprensión para el lector (figura 1).



Dentro de las clasificaciones de halitosis según Miyazaki, tenemos algunas con un componente más psicológico del paciente como lo son la halitofobia y la pseudohalitosis, otras con un componente fisiológico y otras con un origen patológico (figura 1). Para fines de este estudio hablaremos más en profundidad de la halitosis genuina patológica intraoral.

De las diversas causas que pueden originar una halitosis, según Ugur B y Colak H del 85 a 90% de los casos el origen proviene de la cavidad oral (Halitosis Oral) específicamente del metabolismo bacteriano y la producción de CVS, restos de alimentos, materia orgánica propia de la saliva (mucinas salivales) y descamación de células epiteliales y enfermedades que afecten a la cavidad oral (tabla 2).

**Tabla 2:** Causas orales de halitosis. Realizada por Ugur B, Colak H. 2013 (13)

<b>Causas orales de halitosis</b>
Mala higiene oral
Saburra lingual
Sacos periodontales
Gingivitis
Periodontitis
Pericoronaritis
Alveolitis seca
Xerostomía
Úlceras orales
Cáncer bucal
Pulpa dental expuesta
Fístula en dientes necróticos
Uso de prótesis

Por otro lado, solo un 9% es de origen extraoral como resultado de problemas respiratorios, presencia de cuerpos extraños en pulmones o nariz, enfermedad renal, menstruación, problemas gastrointestinales y el 1% restante se asocia a la dieta propiamente tal y al consumo de drogas (tabla 3) (24,13).

**Tabla 3:** Causas no orales de halitosis y otras causas. Realizada por Ugur B, Colak H, año 2013 (13).

<b>Causas no orales de halitosis</b>	<b>Otras causas de halitosis</b>
Enfermedades respiratorias	Alimentos volátiles
Obstrucción nasal/pulmonar	Ajo
Sinusitis	Cebolla
Tonsilolitis	Especias
Tonsilolitos	Drogas
Cáncer (como estomacal)	Alcohol
Bronquiectasia	Tabaco
Absceso subfrénico	Abuso de inhaladores
Enfermedades gastrointestinales o hepáticas	Hidrato de cloral
Reflujo gastrointestinal	Nitritos y nitratos
Obstrucción del duodeno	Sulfuro dimetilo
Leucemia	Disulfiram
Enfermedad renal	Fenotiazinas
Cetoacidosis diabética	Anfetaminas
Menstruación	Paraldehído

### **2.3. Halitosis genuina patológica intraoral**

La halitosis genuina patológica intraoral es un tipo de halitosis que tiene su origen en la cavidad bucal, es persistente en el tiempo y el paciente no presenta alguna enfermedad sistémica a la que se le pueda atribuir esta afección (30). Cerca del 90% de los casos corresponde a este tipo de halitosis (31). Esta puede ser causada por diversas condiciones, como afecciones en el dorso de la lengua, enfermedades dentales o enfermedad periodontal. Estas condiciones favorecen la acumulación de depósitos blandos y placa bacteriana generando un ambiente propicio para bacterias anaeróbicas productoras de CVS, que son las principales responsables del mal aliento. El principal factor predisponente a padecer este tipo de halitosis es una higiene bucal deficiente, pero existen otros factores tales como lengua saburral, lengua geográfica o fisurada, candidiasis, presencia de caries, restauraciones en mal estado, periimplantitis, xerostomía, uso de prótesis fija y/o removible y enfermedad periodontal (32, 33).

## **2.4. Diagnóstico de Halitosis**

Para obtener un correcto diagnóstico de halitosis es necesario considerar antecedentes médicos, odontológicos y psicosociales del paciente, y por otra parte el examen clínico intraoral junto con la percepción olfativa del equipo de salud que reciba al paciente (45). Existen tres métodos principales de diagnóstico y medición de halitosis, que son: evaluación organoléptica, cromatografía de gases y monitores de sulfuro. Se ha propuesto al test organoléptico como el *gold standard* diagnóstico mientras que cromatografía de gases y monitores de sulfuro se prefieren en caso de requerir a mediciones objetivas de gases, sin embargo, su alto costo y la necesidad de personal calificado para emplearlas hacen de estos métodos complejos de implementar (24). Se han estudiado nuevos métodos y alternativas para diagnosticar, tales como: Test de Benzoil - Arginina - Naftil - Amida (BANA), sensores químicos, incubación de muestras salivales, cuantificación de actividad de Beta-galactosidasa, método de ninhidrina, entre otros. Estos métodos no han sido del todo establecidos como medidas *gold standard*, debido al alto costo de implementación, tiempo que requiere la realización del examen y a que sus resultados muestran una significativa correlación con las puntuaciones del test organoléptico (25).

### **2.4.1. Evaluación organoléptica**

Corresponde al método más antiguo y más simple de implementar, para aplicarlo, un operador previamente capacitado y validado debe inhalar el aire expirado por el paciente desde la cavidad oral y nariz. Para la evaluación es necesario que el paciente no haya comido, fumado, utilizado chicles ni colutorios por al menos 2 horas ni utilizar lociones o perfumes para no enmascarar el diagnóstico. De esta manera nos posicionamos a 10 centímetros del paciente (13, 46) y se valoriza el resultado utilizando la escala de Rosenberg (27) que va de 0 a 5 , donde:

- 0 = no se percibe olor
- 1 = percepción muy leve de olor
- 2 = olor leve pero percibido

- 3 = olor moderado
- 4 = olor fuerte
- 5 = olor extremadamente desagradable

Como se mencionó anteriormente, este método es considerado el *gold standard* debido a su bajo costo, práctica y simplicidad a la hora de diagnosticar halitosis. Su desventaja es que el método de detección es dependiente de la disponibilidad de un profesional validado, que además, tiene un componente subjetivo que es inherente a la percepción de los operadores, aun cuando estén correctamente validados/calibrados lo que impacta negativamente sobre la reproducibilidad de los resultados.(13)

#### **2.4.2. Cromatografía de gases**

Considerada altamente objetiva, reproducible y confiable. Este método detecta específicamente sulfuro de hidrógeno, metil mercaptano y dimetil sulfuro, que corresponden a componentes del mal olor. La prueba consiste en que el paciente debe cerrar la boca y mantener la respiración por 30 segundos, luego este aire en boca es aspirado por una jeringa. Recolectada la muestra, es depositada en las columnas de la cromatografía de gases, se procesan a 70°C y tiene un margen de espera de resultado de 2 a 40 minutos (13). Las desventajas de este método son que requiere mucho tiempo en comparación a la prueba organoléptica, es de alto costo y demanda personal altamente calibrado (47).

#### **2.4.3. Monitor de sulfuro**

Este método puede ser similar en algunos aspectos a la cromatografía de gases, salvo que no requiere un personal altamente calibrado, no distingue entre componentes captados, tiende a ser más sensible a sulfuro de hidrógeno que a metil mercaptano y descarta casi totalmente a dimetilsulfuro. El paciente no debe hablar 5 minutos previo a la medición, luego un tubo desechable del monitor se inserta en la boca para recoger el

aire presente en la cavidad, mientras tanto el paciente se mantiene respirando por la nariz y el otro extremo del tubo está conectado al aparato (monitor de sulfuro). Los compuestos que contienen azufre pueden generar una reacción electroquímica y esta reacción se relaciona directamente con los niveles de compuestos volátiles sulfurados (como los mencionados anteriormente) (47, 48).

## 2.5. Bacterias asociadas a halitosis

No se ha asociado una sola bacteria como la causante de halitosis, sabemos que las principales bacterias responsables de la halitosis oral son bacterias gram negativas, se ha visto que *Solobacterium moorei* está presente sólo en pacientes con mal olor bucal y no en pacientes controles sanos (11). Lo que sugiere que hay algunas especies que están más relacionadas a la halitosis (tabla 4).

<b>Tabla 4:</b> Principales bacterias relacionadas a halitosis. Scully C, Greenman J 2012.	
<i>Bacteroides loescheii</i>	<i>Centipeda periodontii</i>
<i>Eikenella corroe</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Fusobacterium nucleatum nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum polymorphum</i>
<i>Fusobacterium nucleatum vincentii</i>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>
<i>Phorphyromonas endodontalis</i>	<i>Phorphyromonas gingivalis</i>
<i>Prevotella (Bacteroides) melaninogenica</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Solobacterium moorei</i>	<i>Tennerella forsythensis (bacteroides forsythus)</i>
<i>Treponema denticola</i>	

Se comparó el perfil microbiológico en el dorso de la lengua en pacientes sanos y pacientes con halitosis usando métodos moleculares de cultivo independiente, con el objetivo de determinar la diversidad microbiana en el dorso de la lengua entre estos grupos y en un estado saludable sin halitosis, se identificó que las especies que predominan son: *S. salivarius*, *Rothia mucilaginosa (Stomatococcus mucilaginosus)* y *Eubacterium* (cadena FTB41), siendo *S. salivarius* la más abundante, representando más

del 40% de las especies detectables en pacientes sanos. Por otro lado, en individuos diagnosticados con halitosis, *S. salivarius* sólo se detectó en un individuo y a niveles muy bajos. En línea con lo anterior, las bacterias más asociadas a halitosis son *Atopobium parvulum*, *Eubacterium sulci*, *Fusobacterium periodonticum*, un filotipo (clon BS095) de *Dialister*, un filotipo (clon BW009) de *Streptococcus*, un filotipo (clon DR034) de un filo no cultivado de TM7 y *Solobacterium moorei*. En la mayoría de las muestras, muchas especies o filotipos se encuentran representados en gran proporción, aunque algunas especies no se detectaron en todas las muestras. Por ejemplo, *Cryptobacterium curtum* se encontró en solo 1 muestra pero representó el 20% de los clones analizados en ese sujeto. Otras especies como *Granulicatella (Abiotrophia) adiacens*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus infantis* y *Veillonella* spp fueron detectadas en la mayoría de las muestras (43).

Porter y Scully explican que el origen del mal olor se relaciona con el metabolismo y descomposición bacteriana de sustratos como saliva, sangre y células del tejido oral. Señalan que este fenómeno no está vinculado exclusivamente a un agente causal, sino a varios, mayoritariamente de tipo gram negativo, como: *Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus)*, *Centipeda periodontii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum vincentii*, *Fusobacterium nucleatum nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum* y *Fusobacterium periodonticum*. A pesar de ello, indican que no existe una conexión directa entre una infección específica y el mal olor, sugiriendo que la halitosis surge de diversas interacciones entre especies bacterianas (61).

De este modo entonces, existe claramente una variación de la población bacteriana en individuos diagnosticados con halitosis respecto de aquellos que no la presentan. Cabe destacar que la microbiota productora de CVS en su mayoría corresponden a bacterias anaerobias, y el dorso lingual presenta criptas las cuales otorgan un ambiente ideal para la proliferación de dichas bacterias, en particular los  $\frac{2}{3}$  posteriores de la lengua (24, 59) .

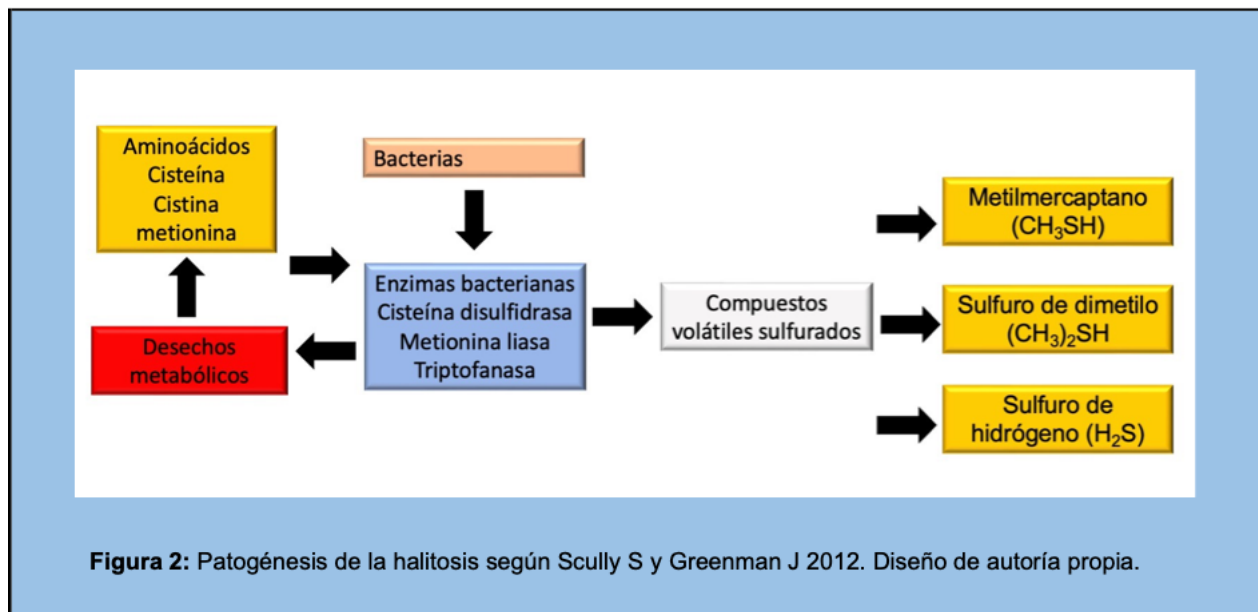
## 2.6. Compuestos olorosos

Como se mencionó anteriormente, parte importante del origen del mal olor es de causa intraoral y uno de sus principales agentes provienen del metabolismo bacteriano (56). Existen distintos compuestos que pueden producir o contribuir al mal olor bucal (tabla 5), algunas interacciones bacterianas con sustratos específicos como la cisteína, metionina, triptófano, arginina y lisina tienen como resultado compuestos olorosos como sulfuro de hidrógeno, metilmercaptano, indol, putrescina y cadaverina respectivamente (57). Las bacterias presentes en la placa, saliva y fisuras del dorso de la lengua son capaces de degradar péptidos y aminoácidos que contienen azufre produciendo los CVS, cuyas principales moléculas son: Sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) que se encuentra en mayor proporción en el tercio posterior de la lengua; Metilmercaptano ( $CH_3SH$ ) y Sulfuro de dimetilo ( $(CH_3)_2SH$ ) en los tejidos periodontales (28, 29). Varios patógenos causantes de la enfermedad periodontal (como *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*) pueden producir mercaptanos y sulfuros, además de ácidos grasos volátiles, que se asocian con el mal aliento (42).

<b>Grupo de compuestos</b>	<b>Ejemplos</b>
Compuestos Volátiles Sulfurados (CVS)	Sulfuro de hidrógeno Metilmercaptano Sulfuro de dimetilo
Poliaminas	Cadaverina Putrescina Trimetilamina
Ácidos grasos de cadena corta	Ácido acético Ácido butírico Ácido propionico Ácido valérico
Indoles	Indol Metil-indol Piridieno

## 2.7. Enzimas productoras de compuestos volátiles sulfurados y compuestos olorosos

La halitosis surge de la colaboración metabólica de diversas especies bacterianas, sin que un agente causal individual sobresalga (figura 2). Por lo tanto, cobra relevancia dilucidar los mecanismos que posibilitan la producción de estos compuestos responsables del mal olor.



En primer lugar, están las enzimas Metionina-Gamma-Liasas (MGL) que se encargan de catalizar la conversión de metionina en amoníaco, 2-oxobutirato y metilmercaptano o también llamado metanotiol (53, 62).

Además, es sabido que la metionina (como sustrato) da lugar al metabolito dimetilsulfuro (62), por lo que estaría implicada como tal en el origen de 2 CVS.

Por otra parte, la enzima cisteinasa o cistina desulfurasa, también presente en gram positivos y negativos, cataliza la reacción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) + hierro presente en el ambiente para generar sulfuro de hierro (54). Además, la cisteína

desulfurasa cataliza la reacción de sulfuro, amoníaco y piruvato en agua y dimetil sulfuro (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SH (55).

*P. gingivalis* y *F. bacterium* metabolizan metionina dando origen a metilmercaptano y además, catalizan la degradación de cisteína en piruvato, amonio y sulfuro de hidrógeno a través de la enzima cisteína desulfurasa (49). Además, se conoce que *P. gingivalis* también presenta enzimas MGL por lo que podría contribuir en mayor medida a la formación de CVS en la cavidad oral de los individuos (62).

## 2.8. Halitosis y Enfermedad Periodontal

Algunos autores postulan que la gingivitis y/o periodontitis serían suficientes para desencadenar la halitosis, aunque no serían un requisito necesario (34). En general, los pacientes con periodontitis crónica tienen una mayor cantidad de saburra lingual que los pacientes en salud periodontal, siendo los dos tercios posteriores de la lengua las principales fuentes de producción de CVS. El papel de estas bacterias ha sido valorado *in vitro*, observándose que *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia* producen H<sub>2</sub>S (35). Los autores Hinode y Amou en 2014 afirman una correlación significativa entre los niveles de CVS y el porcentaje de *Prevotella intermedia* y *F. nucleatum* (44). Aun con estos avances, queda pendiente el análisis de otros CVS y de otros elementos que participan en la producción de estos.

En relación con lo anterior, se ha sugerido que eliminando la placa bacteriana de la lengua se obtienen periodos más largos sin halitosis, comparado a solo cepillar los dientes y realizar enjuagues bucales (36), lo que indicaría que los dos tercios posteriores de la lengua contribuyen de manera significativa al problema.

En pacientes con gingivitis, el sangrado al sondaje y los surco/sacos periodontales proporcionan una gran fuente de sustratos proteicos (leucocitos, células descamadas, fluido crevicular) que son hidrolizados por la microbiota periodontal, emitiendo una mayor

cantidad de CVS que se intensifican e incrementan con la severidad de la enfermedad periodontal, por lo que la producción y emisión de estos compuestos es significativamente más elevada en pacientes con gingivitis o periodontitis que en pacientes en salud periodontal (37).

Los CVS causan alteraciones en los tejidos periodontales. El  $\text{CH}_3\text{SH}$  y  $\text{H}_2\text{S}$  son compuestos nocivos que penetran en el tejido epitelial y conjuntivo, alterando la permeabilidad de las barreras, promoviendo la penetración de metabolitos tóxicos o sustancias inmunogénicas como endotoxinas que contribuyen a la degradación del colágeno, alterando la matriz extracelular y la integridad gingival (38). Además, los CVS mencionados pueden actuar de forma directa sobre el tejido epitelial, facilitando la invasión bacteriana y de forma indirecta cuando los fibroblastos gingivales son expuestos a estos componentes, reduciendo la síntesis total de proteínas, generando un incremento en la degradación y supresión de la síntesis de proteínas colágenas. Se ha demostrado además que el  $\text{CH}_3\text{SH}$  disminuye el contenido total de colágeno en cultivos de fibroblastos en un 70%, donde el 39% corresponde a disminución de la síntesis y un 53% a un aumento de la degradación de esta (39). Sin embargo, desde este estudio, no han aparecido nuevos reportes asociados, por lo que resulta necesario poder profundizar en relación a los efectos tóxicos que generan los CVS sobre los tejidos periodontales, sobre la producción de halitosis, y la contribución a la etiología y desarrollo de la EP (40, 41).

En consecuencia, al tener en cuenta estos antecedentes, así como la fisiopatología de la EP y los impactos del metabolismo bacteriano por la producción de CVS, se podría sugerir una correlación entre la halitosis y la gravedad de la enfermedad periodontal. Por lo que en este estudio, buscamos establecer una asociación entre la presencia de los genes *mgl* y *16S rRNA pg* responsables del mal olor bucal en pacientes con diagnóstico de periodontitis.

## HIPÓTESIS

Existe una mayor presencia del gen *mgl* asociada a bacterias productoras de compuestos volátiles sulfurados relacionados a halitosis en pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal que en pacientes sanos atendidos en la clínica odontológica de la Universidad Finis Terrae.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar la presencia de genes relacionados a bacterias productoras de CVS en pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal de la clínica odontológica de la Universidad Finis Terrae.

### Objetivos Específicos

1. Evaluar la presencia del gen codificante para Metionina-Gamma-Liasa (*mgl*) proveniente de bacterias productoras de CVS en cultivos anaeróbicos derivados de pacientes con EP.
2. Comparar las frecuencias de detección del gen *mgl* entre los grupos de estudio.

## METODOLOGÍA

### 5.1. Diseño del estudio

Estudio observacional transversal analítico.

### 5.2. Universo y muestra

El universo muestral de este estudio corresponde a los pacientes atendidos en la clínica odontológica de la universidad Finis Terrae durante el año 2023, de los cuales se requerirá una muestra de raspado lingual de los dos tercios posteriores para hacer efectivo el estudio.

1. Tests - ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way Analysis: A priori: Compute required sample size Input: Effect size  $f = 0.4$   $\alpha$  err prob = 0.05 Power ( $1-\beta$  err prob) = 0.8 Number of groups = 3 Output: Noncentrality parameter  $\lambda = 10.5600000$  Critical F = 3.1428085 Numerator df = 2 Denominator df = 61 Total sample size = 64 Actual power = 0.8180744
2. El tamaño de la muestra fue calculado con el programa Gpower. mediante la fórmula de comparación de medias. Es necesario una muestra de 64 sujetos para evaluar diferencias de las bacterias en las diferentes etapas periodontales. Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05; una potencia de 0,8 y se asumió un tamaño del efecto grande (0,4).

### 5.3. Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión: Pacientes que firmen de manera voluntaria el consentimiento informado, mayores de 18 años, hombres o mujeres, con o sin hábito tabáquico, que se estén

atendiendo en la clínica odontológica Finis Terrae durante el año 2023 con distintos diagnósticos periodontales:

- Pacientes con salud periodontal.
- Pacientes con gingivitis leve, moderada, severa, localizada o generalizada asociada a biofilm.
- Pacientes con periodontitis estadio I, II, III, IV, localizada, generalizada, patrón incisivo molar, grado A, B o C.

Exclusión: Pacientes desdentados totales, que estén en terapia antibiótica (como mínimo 2 semanas), presenten infecciones odontogénicas agudas, cuadros infecciosos o condiciones médicas que afecten la microbiota oral (ej: sinusitis, alveolitis, tonsilolitis, reflujo gastroesofágico) exceptuando periodontitis, restauraciones directas en mal estado, prótesis fijas o removibles en mal estado, caries activas cavitadas o exodoncias recientes.

## 5.4. Variables

**Tabla 6:** Variables

Variable	Definición conceptual	Naturaleza de la variable	Nivel de medición	Instrumento u obtención de datos	Indicador o codificación
Sexo	Características biológicas y fisiológicas que definen a hombres y mujeres	Cualitativa	Nominal	Ficha clínica del paciente	1 = Hombre 2 = Mujer
Edad	Número de años naturales cumplidos a la fecha	Cuantitativa	Discreta	Ficha clínica del paciente	Nº de años
Diagnóstico de enfermedad periodontal (variable dependiente)	Diagnóstico de la enfermedad periodontal que presente el paciente según la nueva clasificación de enfermedad periodontal (2017)	Cualitativa	Ordinal	Ficha clínica del paciente	1 = Paciente sano 2 = Diagnóstico de gingivitis 3 = Diagnóstico de periodontitis
Especie bacteriana productora de CVS (variable independiente)	Bacteria anaerobia que posee un metabolismo proteolítico y uno de sus productos son CVS	Cualitativa	Nominal	Análisis de PCR a través de una electroforesis	Presencia/ausencia del gen <i>16S rRNA</i> <i>pg</i> en muestras extraídas de pacientes
Gen codificante para la enzima Metionina-gamma-liasas (variable independiente)	Secuencia de DNA que contiene información para elaborar una proteína específica	Cualitativa	Nominal	Análisis de PCR a través de una electroforesis	Presencia/ausencia del gen <i>mgl</i> para la enzima Metionina-gamma-liasas en muestras extraídas de pacientes

## **5.5. Procedimientos para la medición de variables**

### **5.5.1. *Recolección de bacterias anaerobias fastidiosas***

El procedimiento por el cual se llevó a cabo esta investigación consistió en acceder a los datos referentes al diagnóstico (situación, etapa, etc) periodontal de cada paciente presentes en su ficha clínica, disponible en software Dentalink, para saber si presenta diagnóstico de enfermedad periodontal y a que etapa corresponde, en caso de presentarla, fue corroborado por un especialista (Dr Hugo Buitano – Periodoncista), paralelamente y tras la firma del consentimiento informado, uno de los tesista procedió a lavarse las manos y usar guantes para romper el sello de las placa de cultivo, mientras el otro tenía un mechero a 30 cm de la placa. Se recolectaron muestras mediante raspado lingual (2/3 posteriores), utilizando asas plásticas estériles, procedimiento que tuvo una duración aproximada de 5 minutos. El material recolectado fue sembrado en placas de cultivo con el asa plástica, y esparcido por un asa metálica estéril. Luego las placas sembradas se incubaron en una jarra para cultivo de bacterias anaeróbicas con su generador de anaerobiosis y llevadas al Centro de Investigación en Biomedicina (CIBMED) de la Universidad Finis Terrae.

### **5.5.2. *Cultivo de bacterias anaerobias fastidiosas con jarra de cultivo***

El material recolectado fue sembrado en placas de cultivo agar-sangre numeradas y asociadas a un paciente, que estaban suplementadas con Hemina-Menadiona, como medio de cultivo para bacterias anaerobias fastidiosas. Estas placas se cultivaron durante 5 días a 37 °C en una jarra hermética con sobres GasPak produciendo una atmósfera anaeróbica.

### **5.5.3. Extracción de DNA genómico (gDNA)**

Una vez transcurrido el tiempo para el crecimiento de colonias, se extrajeron bacterias y se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Luego se centrifugó cada muestra por 2 min a 14.500 rpm. El pellet de células fue lavado 2 veces con 1 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril utilizando el mismo protocolo de centrifugación inicial. Luego a cada pellet se agregaron 600 µl de Solución de lisis nuclear y se resuspendió con micropipeta. Se incubaron por 5 min a 80 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se mantuvo a temperatura ambiente y se agregaron 3 µl de Solución RNasa. Se incubaron por 15 minutos a 37 °C, luego se mantuvieron a temperatura ambiente para finalmente agregar 200 µl de Solución de precipitación de proteínas, se llevaron al vórtex 3 veces por 5 segundos cada una. Se incubaron en hielo por 5 minutos, una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron a 14.500 rpm por 3 minutos para finalmente recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo de Eppendorf de 1,5 ml limpio.

A cada sobrenadante se le agregaron 600 µl de Isopropanol, para luego ser centrifugado con el mismo protocolo inicial. Se secaron los pellets con cuidado, utilizando papel absorbente y una vez seco se agregaron 600 µl de Etanol al 70%, se resuspendieron y fueron centrifugados con el protocolo inicial. Se aspiró el Etanol con una micropipeta y se dejaron secar los pellets por 15 minutos a temperatura ambiente. Por último se hidrataron con 50 µl de Solución de Rehidratación y se mantuvieron toda la noche a 4 °C.

Se utilizó el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega.

### **5.5.4. PCR convencional para detección de los genes *pg* y *mgI***

Después de extraer las muestras de DNA genómico de los cultivos, se realizó la amplificación mediante la técnica de PCR convencional utilizando el termociclador DLAB

TC1000-S. Como control positivo se incluyó gDNA de una cepa de la bacteria *P. gingivalis* (*pg*) con los partidores para el gen *16S rRNA pg* (*pg-F* y *pg-R*) y los partidores para el gen *mgl* (*mgl-F* y *mgl-R*).

En las tablas 7 se especifican las secuencias de los pares de partidores para los genes *16s pg* (72) y *mgl* (62).

<b>Genes</b>	<b>Nombre partidor</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Tamaño amplicon</b>
<i>16S rRNA pg</i>	<i>pg-F</i>	CTTGACTTCAGTGGCGGCAG	378 pb
	<i>pg-R</i>	AGGGAAGACGGTTTTTCACCA	
<i>mgl</i>	<i>mgl-F</i>	GTAGTGGCTTTGCCACACGT	281 pb
	<i>mgl-R</i>	CACGCATACCCAGATGGCAG	

El primer paso implica la preparación de las muestras para la PCR. Se ocupó un protocolo de amplificación convencional y múltiple con los partidores *pg* y *mgl*, que consta de los siguientes pasos.

PCR convencional para un tubo de muestra:

- H<sub>2</sub>O libre de nucleasas: 15 µL
- Buffer 10X de Promega: 2.5 µL
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM de Promega: 0,75 µl
- dNTPs 10 mM: 0.5 µL
- Partidor 1 (Forward): 25 pmol/µL
- Partidor 2 (Reverse): 25 pmol/µL
- gDNA: 2 µL
- Taq polimerasa de Promega: 0.25 µL

En paralelo, se realizó un segundo protocolo de amplificación múltiple (mPCR), que consta de los siguientes pasos:

- Mastermix (Dream Taq): 12.5  $\mu$ L
- H<sub>2</sub>O libre de nucleasas: 8.5  $\mu$ L
- Partidores (pg y mgl): 0.5  $\mu$ L por cada partidor (2  $\mu$ L total)
- gDNA: 2  $\mu$ L

Posteriormente los tubos fueron incubados en un termociclador DLAB TC1000s, donde fueron sometidos a:

1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 segundos, elongación a 72°C durante 60 s y un ciclo de elongación final de 10 min a 72°C para luego almacenarlos a 4°C.

#### **5.5.5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2%**

Finalmente, los resultados de la amplificación se observaron mediante electroforesis con geles de agarosa al 1,2% teñidos con SafeView Plus (Fermelo Biotec).

Se obtuvieron geles con múltiples carriles para cargar las muestras provenientes del PCR, el primer carril fue cargado con 8  $\mu$ L de un buffer estándar molecular de 100 pares de bases el cual servirá como control entregando una medida aproximada del amplicon (producto PCR).

En el caso de las muestras que se les realizaron PCR convencional, a cada una de estas se les agregó 5  $\mu$ L de buffer de carga para poder visualizarlas.

En los carriles restantes se agregaron 8  $\mu$ L de cada muestra a analizar y finalmente se conectaron electrodos a la cámara y se inició la electroforesis a 100 V durante 1 hora aproximadamente.

Transcurrido este tiempo, se extrajo el gel y se analizó en un transiluminador UV visible. Los resultados se almacenaron en fotografías para luego analizarlos y compararlos.

#### **5.5.6. *Análisis e interpretación de los datos***

1. Los datos de los pacientes de este estudio fueron agrupados y tabulados en una planilla Excel, se les clasificó según el estadio de enfermedad que presentaran (sano, gingivitis, periodontitis) y exportados a un programa estadístico para su análisis (SPSS).
2. Por otra parte, los resultados obtenidos desde la fase experimental serán presentados en tablas de datos y de frecuencia.

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

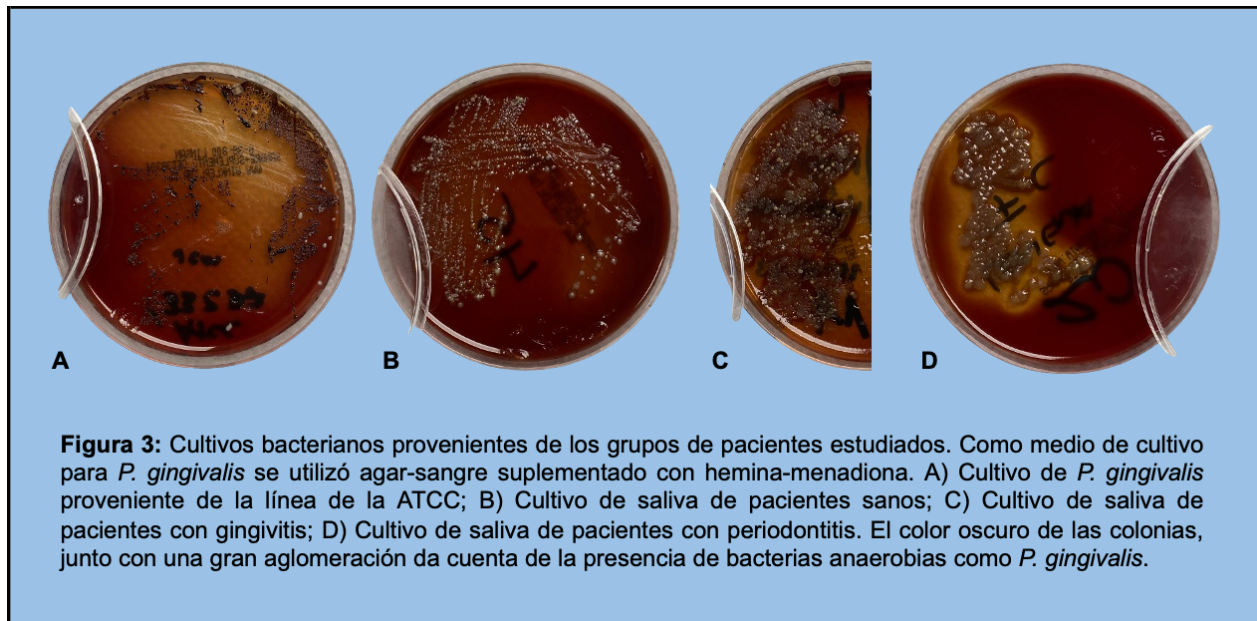
En primer lugar, a cada paciente que cumplió con los criterios de inclusión para el estudio se le explicó en qué consiste este mismo y se le otorgó un consentimiento informado (anexo 3) el cual detalla el procedimiento y la relevancia de la participación de los y las pacientes. Luego, una vez extraídos los datos desde la ficha clínica estos fueron codificados y encriptados de tal manera que la información se asoció a un código que representa a cada paciente. De este modo, la información extraída desde la ficha clínica y la obtenida durante la etapa experimental de laboratorio se mantuvo en forma confidencial, y de acceso exclusivo para los investigadores responsables y tutores de este proyecto.

## RESULTADOS

Para este estudio se utilizaron muestras provenientes de 64 pacientes: 22 controles sanos, 20 con gingivitis, y 22 diagnosticados con EP. Como medición cualitativa, y guiados por la literatura respecto la detección organoléptica en pacientes, se realizó una aproximación olfativa sobre los cultivos realizados. De este modo, una vez realizado el cultivo de las muestras salivales de los dos tercios posteriores de la lengua, se realizó la apertura de las jarras anaeróbicas, pudiéndose detectar mal olor en los tres grupos de estudio, sin embargo, el grupo EP fue el más desagradable al olfato comparado con los grupos sanos y con gingivitis. En la tabla 8 se muestra un análisis cualitativo para representar el grado de mal olor emitido por los cultivos bacterianos. La marca asignada es representativa de los 22 pacientes sanos, 20 con gingivitis y 22 con periodontitis, según corresponda. Se clasificó como el menos desagradable con una X, un olor desagradable con XX y extremadamente desagradable con XXX.

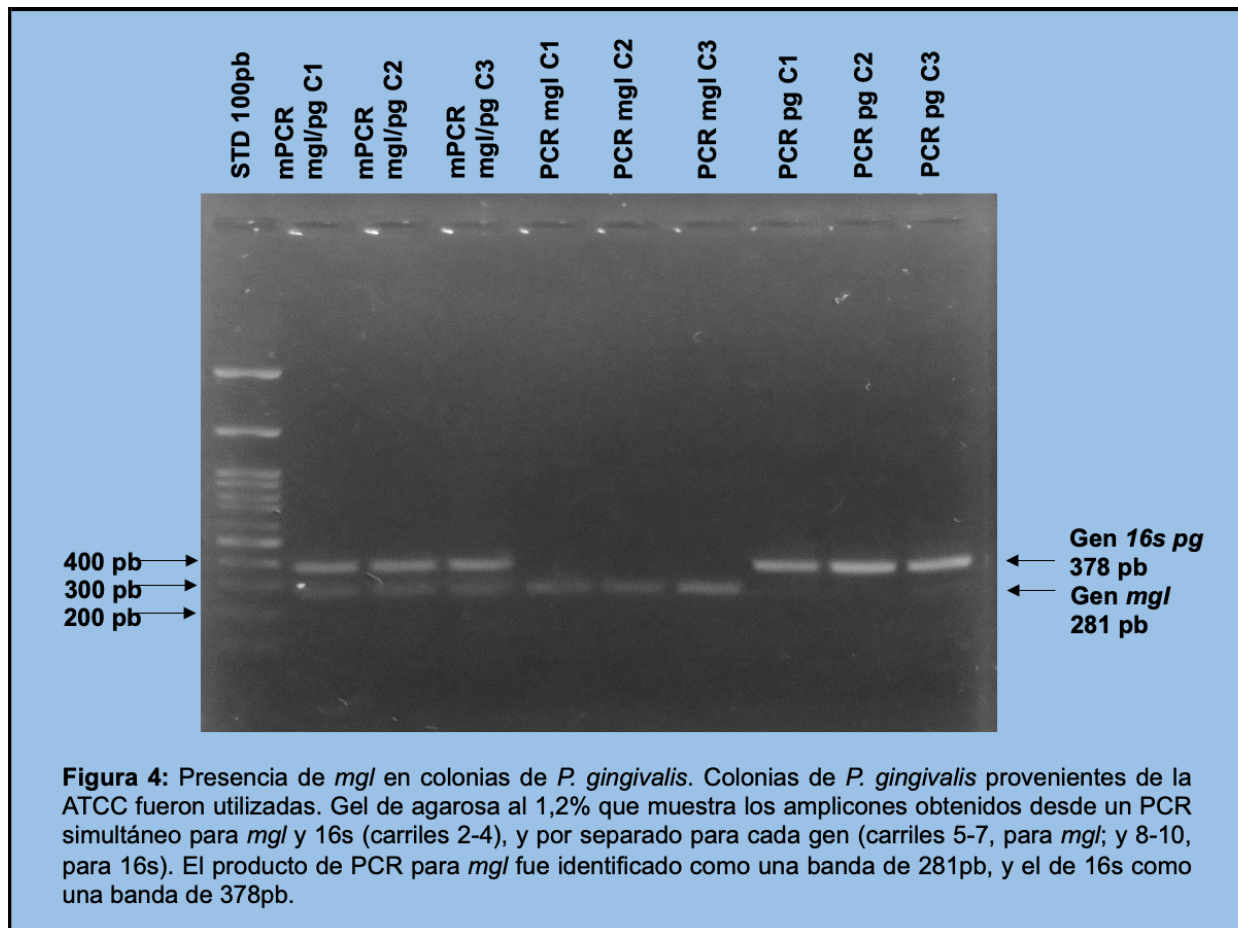
<b>Grupo de estudio</b>	<b>Percepción organoléptica</b>
Pacientes sanos	X
Pacientes con gingivitis	XX
Pacientes con periodontitis	XXX

Otro análisis cualitativo utilizado fue un examen macroscópico de colonias en cultivo, en que se analizó la forma y el color de las colonias obtenidas. De este modo, en los pacientes sanos, se observó un crecimiento bacteriano puntiforme, más blanquecino y de menor abundancia, comparado con la muestra de pacientes con EP, en que las colonias bacterianas se observaron de un tamaño más grande, con una forma circular, más oscuras y rodeadas de un halo, lo que determina la presencia de bacterias anaerobias en el cultivo, tal como se pueden comparar en la figura 3.



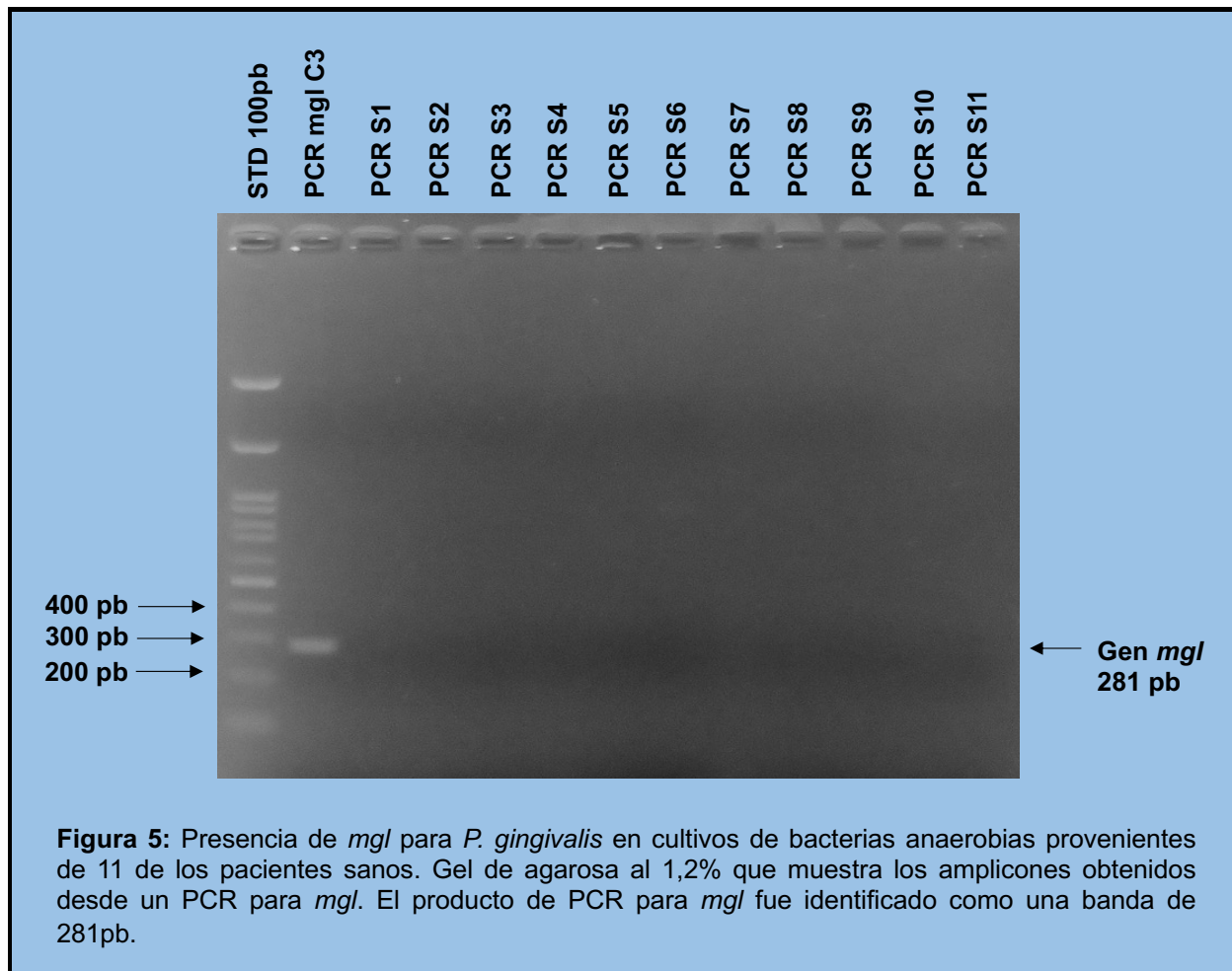
En vista de los análisis cualitativos y macroscópicos señalados en que básicamente los pacientes con EP presentaron mayores características asociadas a la halitosis, lo siguiente fue realizar la medición de algún parámetro más específico relativo a esta condición. Para esto se buscó la presencia del gen *mgl*, codificante para la enzima Metionina-Gamma-Liasa, mediante amplificación de la secuencia correspondiente por PCR convencional.

Se analizaron los amplicones para el *mgl* y el 16s, correspondiente a *P. gingivalis*, de modo de asociar la presencia del gen de la enzima con esta bacteria anaerobia. En primer lugar, y a modo de estandarizar la técnica, se realizó un PCR simultáneo para ambos genes provenientes de 3 colonias bacterianas de *P. gingivalis* comerciales de la ATCC como controles positivos. En la figura 4 se observa la presencia del *mgl* y 16s en las colonias comerciales, confirmando que es posible encontrar el gen de la enzima asociado a *P. gingivalis*.

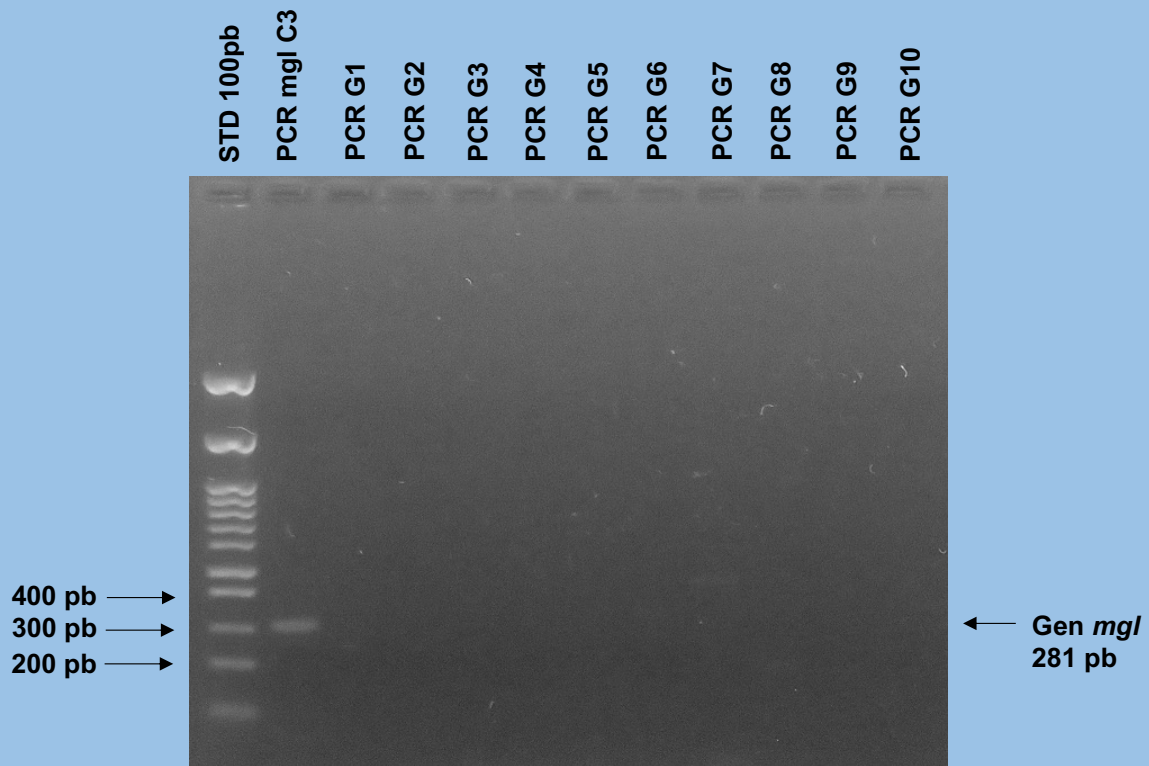


Con lo mostrado en la figura 4, se avanzó hacia la detección de *mgl* y 16s en colonias de bacterias anaerobias obtenidas de los pacientes controles, con gingivitis, y con periodontitis.

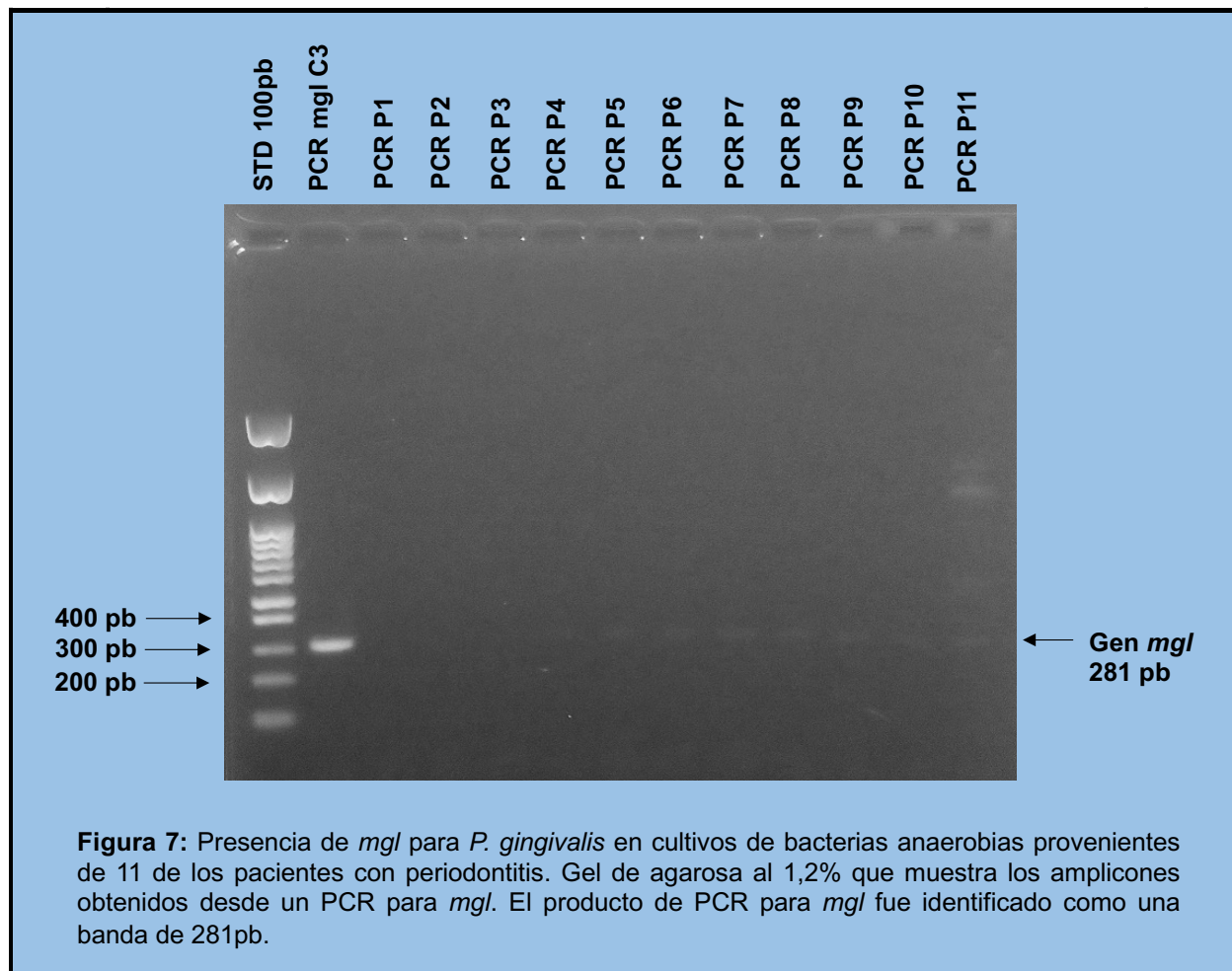
Del mismo modo, se realizó un PCR y, posteriormente, una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% para comparar la presencia o ausencia de los genes en estudio. La figura 5, muestra geles representativos para la detección de *mgl* en 11 pacientes controles sanos (figura 5), 10 pacientes con gingivitis (figura 6), y 11 pacientes con periodontitis (figura 7), observándose la presencia del gen, solamente en 8 cultivos de bacterias anaerobias del grupo con periodontitis. Cabe mencionar que no fue posible detectar el 16s de *P. gingivalis* en ningún grupo de pacientes (datos no mostrados).



**Figura 5:** Presencia de *mgl* para *P. gingivalis* en cultivos de bacterias anaerobias provenientes de 11 de los pacientes sanos. Gel de agarosa al 1,2% que muestra los amplicones obtenidos desde un PCR para *mgl*. El producto de PCR para *mgl* fue identificado como una banda de 281pb.



**Figura 6:** Presencia de *mgl* para *P. gingivalis* en cultivos de bacterias anaerobias provenientes de 10 de los pacientes con gingivitis. Gel de agarosa al 1,2% que muestra los amplicones obtenidos desde un PCR para *mgl*. El producto de PCR para *mgl* fue identificado como una banda de 281pb.



A partir de los datos anteriores, se elaboró una tabla de frecuencia para los genes *mgl* y 16s detectados en los cultivos anaeróbicos provenientes de los 3 grupos de pacientes estudiados. La tabla 9, muestra que, de 22 pacientes con periodontitis, 8 presentaron el gen *mgl*, por lo que la frecuencia fue del 36%.

**Tabla 9:** Frecuencia obtenida para la presencia del gen *mgl* y 16s

GRUPO	NUMERO DE MUESTRAS	PRESENCIA GEN 16S rRNA PG	FR	PRESENCIA GEN MGL	FR	%
Sanos	22	0	0,00	0	0,00	0%
Gingivitis	20	0	0,00	0	0,00	0%
Periodontitis	22	0	0,00	8	0,36	36%
Total	64		1		1,00	100%

Para determinar algún factor asociado al por qué estos 8 pacientes positivos para el *mgl*, se analizaron otros datos recolectados al momento del reclutamiento al estudio. De este modo, pudo encontrarse que 7 de los 8 pacientes (~88%) corresponden a pacientes del género masculino, y que de éstos, 5 (~71%) de los pacientes presentó un estadio IV de la enfermedad (valoración alta). De los 8 pacientes, sólo 3 (~37%) era fumador (tabla 10).

**Tabla 10:** Análisis de variables medidas en los 8 pacientes con presencia del gen *mgl*

Edad	Sexo	Fuma	Diagnóstico periodontal
79	Hombre	No	Periodontitis generalizada estadio IV grado C
40	Hombre	Si	Periodontitis generalizada estadio IV grado C
32	Hombre	Si	Periodontitis generalizada estadio IV grado C
50	Hombre	No	Periodontitis generalizada estadio III grado C
45	Mujer	No	Periodontitis generalizada estadio III grado B
58	Hombre	Si	Periodontitis generalizada estadio IV grado C
64	Hombre	No	Periodontitis generalizada estadio IV grado C
48	Hombre	No	Periodontitis generalizada estadio III grado B

La tabla 11 muestra el análisis por variables medidas en cada grupo de estudio, la media de edad en pacientes con periodontitis es de 50 años, los individuos masculinos fueron quienes presentaron mayor prevalencia del *mgl*, correspondiendo a un 20% del total de la muestra. El gen 16S correspondiente a *P. gingivalis* no fue detectado en el

100% de las muestras estudiadas (datos no mostrados), mientras que el gen *mgl* se encontró presente en el 13% de estas, de las cuales todas eran de pacientes con periodontitis.

**Tabla 11:** Análisis de variables medidas según grupos de estudio

	<b>Sano</b>		<b>Gingivitis</b>		<b>Periodontitis</b>		<b>Total</b>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Número del grupo</b>	22	0,34	20	0,32	22	0,34	64	1,00
<b>Media de edad</b>	25		21		50		32	
<b>Sexo</b>								
Hombre	4	0,06	5	0,08	13	0,20	22	0,34
Mujer	18	0,28	15	0,23	9	0,14	42	0,66
<b>Gen 16s pg</b>								
Ausencia	22	0,34	20	0,31	22	0,34	64	1,00
Presencia	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<b>Gen <i>mgl</i></b>								
Ausencia	22	0,34	20	0,31	14	0,22	56	0,88
Presencia	0	0,00	0	0,00	8	0,13	8	0,13

## DISCUSIÓN

En este estudio se ha analizado la presencia de genes relacionados con bacterias anaeróbicas en una población de 64 pacientes, de los cuales: 22 fueron controles sanos, 20 con gingivitis, y 22 con periodontitis. Los resultados demuestran cualitativamente que aquellos cultivos bacterianos provenientes de los dos tercios posteriores de la lengua de los pacientes con periodontitis presentaron mayores características de bacterias anaeróbicas en comparación a los otros 2 grupos. Esto guarda relación con lo descrito en la literatura en que la periodontitis se caracteriza por una progresión disbiótica de bacterias pertenecientes al complejo rojo: *T. forsythia*, *T. denticola*, y *P. gingivalis*, las que corresponden a bacterias anaeróbicas (65,66). Por otro lado, se ha reportado que como parte del desarrollo de la periodontitis se establece la halitosis, en que determinadas bacterias, gracias a diversas reacciones enzimáticas, producen los CVS responsables del mal aliento (49, 54, 62). Una de estas bacterias es *P. gingivalis* que presenta enzimas como la MGL que están implicadas en la generación de CVS (49, 62), y que además, esta bacteria es mayormente responsable del daño asociado a EP (68). Es por esta razón que el presente estudio se centró en buscar la presencia del gen de esta enzima (*mgl*), asociado a *P. gingivalis* en raspados linguales de los dos tercios posteriores en pacientes con periodontitis, comparando los hallazgos con el grupo de pacientes sanos y con gingivitis.

Como primera aproximación se evidenció (figura 4) que la colonia comercial de *P. gingivalis* proveniente de la ATCC presentaba el *mgl* lo que fue concordante con la literatura (62). De este modo, entonces, se buscó la presencia del *mgl* en las colonias provenientes de los dos tercios posteriores de la lengua de los 3 grupos de pacientes. Los resultados mostraron que este gen estaba presente en 8 de los 22 pacientes con periodontitis, pero no se presentó en pacientes sanos ni diagnosticados solamente con gingivitis (figura 5, tabla 9). Por otro lado, no se logró detectar el gen 16s de *P. gingivalis* en las colonias provenientes de los pacientes (datos no mostrados), y que, si fue detectado en las colonias ATCC, sugiriendo que el *mgl* encontrado no vendría de *P. gingivalis*, al menos en los dos tercios posteriores de la lengua. Si bien la literatura señala

que las criptas linguales corresponden a un nicho ecológico de esta bacteria (69), se ha reportado que otras zonas como: surcos gingivales en estado de salud, sacos periodontales, suponen un reservorio mayor para la recolección de *P. gingivalis*. (68, 69). También, se debe tomar en cuenta el sitio escogido para la toma de muestras, si bien, como se mencionó anteriormente, las criptas linguales sirven de nicho ecológico para microorganismos anaerobios, para la valoración de la presencia y gravedad de la EP se considera medir la profundidad del surco gingival (64) y no de las criptas linguales, por tanto, resulta interesante incorporar este nuevo sitio de extracción de muestras en un nuevo estudio y de esta manera contrastar los resultados obtenidos.

Por otro lado, la MGL es expresada por diversos tipos de bacterias anaeróbicas productoras de CVS como: *T. denticola*, *P. gingivalis*, *C. sporogenes*, entre otras (70); por lo que es posible que el gen *mgl* encontrado en los 8 pacientes del estudio provenga de alguna de ellas.

Curiosamente, no se encontró el *mgl* en pacientes controles sanos, ni en pacientes diagnosticados con gingivitis, los que junto a los pacientes con periodontitis, mostraron características relacionadas con la halitosis en los cultivos de colonias anaerobias (tabla 8 y figura 3). Esto sugiere que los CVS responsables del mal olor de los cultivos, no sería producido por la MGL, sin embargo, cuando la EP presenta un estado más avanzado y severo, habría participación de la MGL en la producción de CVS, y por ello se incrementa el mal olor de estos cultivos (tabla 8). Este punto es muy relevante para este estudio ya que si bien, estudios han asociado la MGL y su producto: Metil Mercaptano ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) con bacterias periodontales (53, 71), no se ha demostrado un efecto directo de estos elementos sobre la patogénesis ni la mantención de la EP, y solamente a la fecha, existe un estudio en modelo murino de EP, asociado a *P. gingivalis*, en que se observó que el  $\text{H}_2\text{S}$  potencia la patogenicidad del  $\text{CH}_3\text{SH}$  en la formación de abscesos y desarrollo de inflamación, aunque sin un mecanismo claro (67). De este modo, nuestro estudio sería pionero en sugerir que la aparición del gen *mgl* podría relacionarse con estadios avanzados (clasificación IV) de EP (tabla 10) y, además, en la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae, sería el primer estudio de este tipo.

Por último, un aspecto muy llamativo de los resultados es que en las 8 muestras que se detectó la presencia del gen *mgI* los pacientes presentaban estadios más severos de la enfermedad periodontal que corresponden a estadios III y IV en los cuales los pacientes pueden llegar a requerir rehabilitación protésica debido al nº de piezas dentales pérdidas producto de la EP (64), esto nos hace suponer que la presencia del gen *mgI* y la enzima MGL guardan relación con un mayor grado de destrucción de los tejidos orales y del metabolismo bacteriano causante de este (62).

En cuanto a los grados B y C que van asociados a estos diagnósticos, estos van a responder a evidencia directa de la enfermedad y factores modificables del paciente, lo que nos va a indicar qué tan rápida es la tasa de progresión de la EP siendo C el grado de mayor tasa de progresión (64).

Finalmente, con los datos expuestos, nuestro trabajo apunta a que existe relación entre la presencia del gen *mgI* con el estadio avanzado de la EP. Como se ha señalado, esto podría estar en concordancia con la literatura en que el producto de esta enzima, el CH<sub>3</sub>SH sería clave para el desarrollo de procesos inflamatorios y el daño severo asociado a la EP (53, 62). Sin embargo, se requiere una continuidad de este estudio para analizar una población de pacientes más extensa de modo de evaluar, de forma reproducible los hallazgos de este estudio. Por otro lado, resultaría útil contrastar nuestros resultados con alguna medición organoléptica (*gold estándar*) de halitosis realizada por un facultativo validado en este proceso, de este modo, se podría situar a este tipo de marcadores de halitosis como herramientas diagnósticas útiles en el avance hacia la medicina personalizada, preventiva y con mayor información para la toma de decisiones sobre el tratamiento de los pacientes.

## CONCLUSIÓN

- En base a los resultados de este estudio se puede sugerir que la presencia de *mgI* está relacionada a pacientes con periodontitis, e incluso con estadios más severos.
- No fue posible detectar el gen 16s de *P. gingivalis*, posiblemente porque el sitio de recolección no fue el apropiado en esta cohorte de pacientes.
- Es necesario continuar con el estudio para ampliar el tamaño muestral y saber, de forma reproducible, si el *mgI* sigue presentándose en aquellos pacientes con EP en estadios avanzados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Velásquez Gimón ME, González Blanco O. La Halitosis: Definición, clasificación y factores etiológicos. *Acta Odontol Venez* [Internet]. 2006 [cited 2023 Jul 4];44(2):240–4. Available from: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-63652006000200016&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652006000200016&lng=es).
2. Bravo I JC, Bahamonde S H. Halitosis: Fisiología y enfrentamiento. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jul 4];74(3):275–82. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-48162014000300013&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162014000300013&lng=es).
3. Schmidt J, Krause F, Haak R. Halitosis: measurement in daily practice. *Quintessence Int* [Internet]. 2015 [citado el 30 de abril de 2023];46(7):633–41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26046112/>
4. Morita, M., & Wang, H. L. (2001). Association between oral malodor and adult periodontitis: a review. *Journal of clinical periodontology*, 28(9), 813–819. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028009813.x>
5. Chapple, I. L., Bouchard, P., Cagetti, M. G., Campus, G., Carra, M. C., Cocco, F., Nibali, L., Hujoel, P., Laine, M. L., Lingstrom, P., Manton, D. J., Montero, E., Pitts, N., Rangé, H., Schlueter, N., Teughels, W., Twetman, S., Van Loveren, C., Van der Weijden, F., Vieira, A. R., ... Schulte, A. G. (2017). Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*, 44 Suppl 18, S39–S51. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12685>
6. Jara N, Bahamonde H, Bravo JP. Halitosis en otorrinolaringología [Internet]. Conicyt.cl. [citado el 30 de abril de 2023]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/orl/v74n1/art12.pdf>
7. Fernández Amézaga J., Rosanes González R.. Halitosis: diagnóstico y tratamiento en Atención Primaria. *Medifam* [Internet]. 2002 Ene [citado 2023 Abr 29] ; 12( 1 ): 46-57. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1131-57682002000100005&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682002000100005&lng=es).

8. Hu, X., Huang, Y. Y., Wang, Y., Wang, X., & Hamblin, M. R. (2018). Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Frontiers in microbiology*, 9, 1299. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01299>
9. Leading the world to optimal oral health, Herrera D, Meyle J, Renvert S, Socios J, Proyecto D, et al. Salud y enfermedades periodontales [Internet]. Fdiworlddental.org. [citado el 29 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.fdiworlddental.org/sites/default/files/2020-11/gphp-2018-toolkit-es.pdf>
10. Bosity A, Kulkarni GV, Rosenberg M, McCulloch CA. Relationship of oral malodor to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations. *J Periodontol* [Internet]. 1994 [citado el 29 de abril de 2023];65(1):37–46. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8133414/>
11. Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK, Zambon MM, Gerber D, Rego R, et al. Identification of oral bacterial species associated with halitosis. *J Am Dent Assoc* [Internet]. 2007 [citado el 1 de mayo de 2023];138(8):1113–20. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17670880/>
12. Makino Y, Yamaga T, Yoshihara A, Nohno K, Miyazaki H. Association between volatile sulfur compounds and periodontal disease progression in elderly non-smokers. *J Periodontol* [Internet]. 2012 [citado el 29 de abril de 2023];83(5):635–43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21861638/>
13. Aylıkçı, B. U., & Colak, H. (2013). Halitosis: From diagnosis to management. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 4(1), 14–23. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.107255>
14. Schätzle M, Loe H, Bürgin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003 Oct;30(10):887-901. doi:[10.1034/j.1600-051x.2003.00414.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2003.00414.x)
15. Mariotti A. Dental Plaque-Induced Gingival Diseases. *Annals of Periodontology*. 1999 Dec;4(1):7–17. doi:[10.1902/annals.1999.4.1.7](https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.7)
16. De Estomatología EP. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD [Internet]. Edu.pe. [citado el 27 de mayo de 2023]. Disponible en:

[https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/107706/Farro\\_LAS-OI\\_aya\\_GB-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/107706/Farro_LAS-OI_aya_GB-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

17. De Luca-Monasterios F, Chimenos-Küstner E, López-López J. Effect of chewing gum on halitosis. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2014;143(2):64–7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025775314000219>
18. Foglio Bonda P.L., Rocchetti V., Migliario M., Giannoni M.. La halitosis: revisión de la literatura. Primera parte. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2007 Dic [citado 2023 Mayo 25] ; 23( 6 ): 375-386. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-12852007000600004&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852007000600004&lng=es).
19. Dou W, Li J, Xu L, Zhu J, Hu K, Sui Z, et al. Halitosis and helicobacter pylori infection: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016 [citado el 27 de mayo de 2023];95(39):e4223. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000004223>.
20. Jara N, Bahamonde H, Bravo JP. Halitosis en otorrinolaringología [Internet]. Conicyt.cl. [citado el 30 de abril de 2023]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/orl/v74n1/art12.pdf>
21. Rai M, Spratt D, Gomez-Pereira PR, Patel J, Nair SP. Light activated antimicrobial agents can inactivate oral malodour causing bacteria. *J Breath Res* [Internet]. 2016 [citado el 27 de mayo de 2023];10(4):046009. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27753430/>
22. Seo E, Song J, Hur M, Lee M, Lee MS. Effects of aroma mouthwash on stress level, xerostomía, and halitosis in healthy nurses: A non-randomized controlled clinical trial. *Eur J Integr Med* 2017;10:82-89.
23. Aydin M, Harvey-Woodworth CN. Halitosis: a new definition and classification. *Br Dent J* [Internet]. 2014 [citado el 27 de mayo de 2023];217(1):E1. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25012349/>
24. Scully C, Greenman J. Halitosis (breath odor). *Periodontol* 2000 [Internet]. 2008;48(1):66–75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2008.00266.x>

25. Schmidt J, Krause F, Haak R. Halitosis: measurement in daily practice. *Quintessence Int* [Internet]. 2015 [citado el 30 de abril de 2023];46(7):633–41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26046112/>
26. Silva MF, Leite FRM, Ferreira LB, Pola NM, Scannapieco FA, Demarco FF, et al. Estimated prevalence of halitosis: a systematic review and meta-regression analysis. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2018 [citado el 27 de mayo de 2023];22(1):47–55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28676903/>
27. Nunes CG, Davi J. Propuesta de un protocolo de diagnóstico y tratamiento de la halitosis para uso en clínica odontológica. 2010.
28. Loesche WJ, Kazor C. Microbiology and treatment of halitosis. 2000 *Periodontol* 28:256-79.
29. Neiders M, Ramos B. Operation of bad breath clinics. *Quintessence Int* 1999;30:295-301.
30. Miyazaki H, Sakao S, Katoh Y, et al. Correlation between volatile sulphur compounds and certain oral health measurements in the general population. *J Periodontol*. 1995;66(8):679-684. doi: 10.1902/jop.1995.66.8.679.
31. Spielman, A. I., Bivona, P., & Rifkin, B. R. (1996). Halitosis. A common oral problem. *The New York state dental journal*, 62(10), 36–42.
32. Tangerman, A., & Winkel, E. G. (2007). Intra- and extra-oral halitosis: finding of a new form of extra-oral blood-borne halitosis caused by dimethyl sulphide. *Journal of clinical periodontology*, 34(9), 748–755. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01116.x>
33. Quirynen, M., Dadamio, J., Van den Velde, S., De Smit, M., Dekeyser, C., Van Tornout, M., & Vandekerckhove, B. (2009). Characteristics of 2000 patients who visited a halitosis clinic. *Journal of clinical periodontology*, 36(11), 970–975. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01478.x>
34. Rosenberg M. Introduction. En: *Bad Breath: Research perspectives*. Ramat Aviv: Ramot Publishing- Tel Aviv University, : M. Rosenberg Ed. 1995: 1-12.
35. Persson S, Claesson R, Carlsson J. The capacity of subgingival species to produce volatile sulphur compounds in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4: 169-72.

36. Tonzetich J, Ng S. K. Reduction of maoldour by oral cleasing procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976; 42: 172-81.
37. Morita M, Wang M L. Relationship of sulcular sulphide level to severity of periodontal disease and BANA test. *J Periodontol* 2001; 72: 79-84
38. Johnson PW, Yaegaki K y Tonzetich J. Effect of methyl mercaptan on synthesis and degradation of collagen. *J. periodont Res.* 1996; 31:323-329
39. Johnson PW, Ng W y Tonzetich J. Modulation of human gingival fibroblast cell metabolism by methyl mercaptan. *J Periodont Res* 1992; 27: 476-483.
40. Kleinberg I y Westbay G. Oral malodor. *Oral Biology and Medicine* 1990;1: 247-259.
41. N Khaira N, RM Palmer, RF Wilson, DA Scott y Wg Wade. Production of volatile sulphur compounds in diseased periodontal pockets is significantly increased in smokers. *Oral Diseases* 2000; 6: 371-375.
42. Kuchenbecke Rösing IC, Loesche II. Halitosis: an overview of epidemiology, etiology and clinical management. *Braz Oral Res* vol.25 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2011.
43. Kazor, C. E., Mitchell, P. M., Lee, A. M., Stokes, L. N., Loesche, W. J., Dewhirst, F. E., & Paster, B. J. (2003). Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 558–563. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.558-563.2003>
44. Amou T, Hinode D, Yoshioka M, Grenier D. Relationship between halitosis and periodontal disease - associated oral bacteria in tongue coatings. *Int J Dent Hyg* [Internet]. 2014;12(2):145–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/idh.12046>.
45. Duque A, Universidad CES, Tejada C, Universidad CES. Halitosis: Un asunto del odontólogo. *CES odontol* [Internet]. 2016 [citado el 30 de mayo de 2023];29(1):70–81. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-971X2016000100008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2016000100008)
46. Codinach M, Salas J. Halitosis: Diagnóstico y tratamiento [Internet]. *Isciii.es.* [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v30n3/original7.pdf>
47. Salako NO, Philip L. Comparison of the use of the Halimeter and the Oral Chroma™ in the assessment of the ability of common cultivable oral anaerobic bacteria to produce malodorous volatile sulfur compounds from cysteine and methionine. *Med*

- Princ Pract [Internet]. 2011 [citado el 30 de mayo de 2023];20(1):75–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21160219/>
48. Rosenberg M, Kulkarni GV, Bosy A, McCulloch CA. Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulphide monitor. J Dent Res [Internet]. 1991;70(11):1436–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/00220345910700110801>
49. Lugo de Díaz G, Giménez de Salazar X. La halitosis como un posible factor de riesgo de la enfermedad periodontal. Acta Odontol Venez [Internet]. 2006 [cited 2023 Jul 4];44(2):265–76. Available from: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-63652006000200019&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652006000200019&lng=es).
50. Park S-N, Lim YK, Kook J-K. Development of quantitative real-time PCR primers for detecting 42 oral bacterial species. Arch Microbiol [Internet]. 2013;195(7):473–82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-013-0896-4>
51. Dalwai F, Spratt DA, Pratten J. Use of quantitative PCR and culture methods to characterize ecological flux in bacterial biofilms. J Clin Microbiol [Internet]. 2007;45(9):3072–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01131-07>
52. Su C-Y, Shigeishi H, Nishimura R, Ohta K, Sugiyama M. Detection of oral bacteria on the tongue dorsum using PCR amplification of 16S ribosomal RNA and its association with systemic disease in middle-aged and elderly patients. Biomed Rep [Internet]. 2019;10(1):70–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3892/br.2018.1175>
53. De solicitud europea: ©. Número. © TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3 [Internet]. Googleapis.com. [citado el 29 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/53/4f/4a/dac76b95cfd6cc/ES2327262T3.pdf>
54. De F de AV del 02 de J. Manual de Laboratorio del Módulo Biología Bucal y Bases Farmacológicas [Internet]. Unam.mx. [citado el 29 de noviembre de 2023]. Disponible en: [https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2022/Licenciaturas/CirujanoDentista/manuales/Manual\\_BB\\_y\\_BF\\_2022.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2022/Licenciaturas/CirujanoDentista/manuales/Manual_BB_y_BF_2022.pdf)

55. Scully C, Greenman J. Halitology (breath odour: aetiopathogenesis and management). *Oral Dis* [Internet]. 2012;18(4):333–45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01890.x>
56. Allaker RP. Investigations into the micro-ecology of oral malodour in man and companion animals. *J Breath Res* [Internet]. 2010 [citado el 29 de diciembre de 2023];4(1):017103. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21386208/>
57. Greenman J, Newman HN, Wilson M. Dental plaque revisited, oral biofilms in health and disease. *Microbial Aetiology of Halitosis*. 1999:419-2.
58. Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I, Aranda W, et al. Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean national dental examination survey. *J Periodontol* [Internet]. 2010 [citado el 30 de diciembre de 2023];81(10):1403–10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20629544/>
59. Arweiler NB, Netuschil L. The Oral Microbiota. En: *Microbiota of the Human Body*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 45–60.
60. Moss SJ. Halitosis and oral malodor. Report submitted to the FDI Commission. 1998:1-6
61. Porter SR, Scully C. Oral malodour (halitosis). *BMJ* [Internet]. 2006 [citado el 30 de diciembre de 2023];333(7569):632–5. Disponible en: <https://www.bmj.com/content/333/7569/632.full>
62. Kv V. Purification and Characterization of Methionine Gamma Lyase-Deaminase (Mgld) from the Oral Pathogenic Organism *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Anal Biochem* [Internet]. 2015;04(s2). Disponible en: <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/purification-and-characterization-of-methionine-gamma-lyasedeaminasemgld-from-the-oral-pathogenic-organism-porphyromonas-gingivalis-2161-1009-1000223.pdf>
63. Cloudfront.net. [citado el 1 de enero de 2024]. Disponible en: [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/38581127/Articulo\\_Perio-1-libre.pdf?1440621228=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DArticulo\\_Perio\\_1.pdf&Expires=1704126714&Signature=dCTr4MpRqiOP7OrY9HHySsG0bijMTYTsl1xtcW6FO7bf9X9oiAvNLwWme-QmkqM7ZbuCOwyRjvsXjCfpUzv3Q7fnoNObuYCsjqpuVfGIfPY9sW1BjV-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/38581127/Articulo_Perio-1-libre.pdf?1440621228=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DArticulo_Perio_1.pdf&Expires=1704126714&Signature=dCTr4MpRqiOP7OrY9HHySsG0bijMTYTsl1xtcW6FO7bf9X9oiAvNLwWme-QmkqM7ZbuCOwyRjvsXjCfpUzv3Q7fnoNObuYCsjqpuVfGIfPY9sW1BjV-)

[aMub9Vzc~pRZMwJY2yZScTvxVfjikapMHtEBvx5QJOvoUxNHQPZ4t8WQluMiV-wwYp0t-TeOg6f5wGGr-KRs5u5awjJUAio47Fvv5Z6vnIXOuKCRXfXWINrJTURldTrMdid518xm2PNBqOO~4lu3fWjtkMLAKW~MpjEjyJKLDwGrRfJ38BXmgDsWvOEZMvdK2SnIzhzQH4altLA1ikH5H7w7b98qn0Ti64Q &Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926952/)

64. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. J Periodontol [Internet]. 2018 [citado el 1 de enero de 2024];89(S1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926952/>
65. Blanc LR V. Principales factores de virulencia periodontopatogenos. revista cientifica odontologica 2013. 2013;1:56–9
66. Ba S-PJR-GF. Presencia de periodontopatogenos productores de sulfuro de hidrogeno antes y despues del tratamiento periodontal. Estudio piloto. Revista odontologica latinoamericana [Internet]. 2021 [citado el 12 de 2024];13(1):13–8. Disponible en: <https://www.odontologia.uady.mx/revistas/rol/pdf/V13N1p13.pdf>
67. Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Methyl mercaptan production by periodontal bacteria. Int Dent J [Internet]. 2002 [citado el 4 de enero de 2024];52(5):217–20. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12090456/>
68. Enersen M, Nakano K, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. J Oral Microbiol [Internet]. 2013;5(1):20265. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v5i0.20265>
69. Tribble GD, Kerr JE, Wang B-Y. Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences. Future Microbiol [Internet]. 2013;8(5):607–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.13.30>
70. Sato D, Nozaki T. Methionine gamma-lyase: The unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. IUBMB Life [Internet]. 2009;61(11):1019–28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/iub.255>
71. Yoshimura M, Nakano Y, Yamashita Y, Oho T, Saito T, Koga T. Formation of Methyl Mercaptan from L-Methionine by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun [Internet]. 2000 [citado el 4 de enero de 2024];68(12):6912–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.68.12.6912-6916.2000>

72. Renato R.R. Braga <sup>a</sup> , Maria Auxiliadora R. Carvalho <sup>a</sup> , Oscar Bruña-Romero <sup>a</sup> , Rodrigo E. Teixeira <sup>a</sup> , José Eustáquio Costa <sup>b</sup> , Edilberto N. Mendes <sup>c</sup> , Luiz M. Farias <sup>a</sup> , Paula P. Magalhães. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe*. el 1 de marzo de 2010;16:234–9

## ANEXOS

1.



Santiago, 4 de Julio de 2023

Señores  
Coordinación de  
Investigación Facultad de  
Odontología PRESENTE

Estimados:

En mi calidad de directora del Laboratorio de Investigación en Biomedicina (LIBMED) de la Facultad de Medicina de la Universidad Finis Terrae, certifico que los protocolos a realizar presentados en el anteproyecto de tesis de los alumnos Felipe Cáceres y Vicente Constanzo titulado "DETECCIÓN DEL GEN CODIFICANTE PARA LA ENZIMA METIONINA-GAMMA-LIASA ASOCIADA A BACTERIAS PRODUCTORAS DE COMPUESTOS VOLÁTILES SULFURADOS EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON ENFERMEDAD PERIODONTAL ATENDIDOS EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD FINIS TERRAE DURANTE EL AÑO 2023", serán ejecutados en este laboratorio bajo la supervisión de sus tutores, cumpliendo con las normas de Bioseguridad correspondientes.

Los alumnos a su vez se comprometen a cumplir cabalmente con estas normas.

Dra. Liliana Berrocal S.  
Directora de Laboratorio Investigación en Biomedicina  
(LIBMED) Escuela de Medicina  
Universidad Finis Terrae

2.



**ACTA DE RESOLUCIÓN NUEVO ESTUDIO  
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO UNIVERSIDAD FINIS TERRAE Acreditado por SEREMI de Salud  
Resolución Exenta N°002681/2021 del 24 de febrero de 2021**

**Fecha y N° de Sesión:** 04 de septiembre de 2023, sesión extraordinaria n°5 **ID Protocolo: 23-085**

**Título del Proyecto:** Detección del gen codificante para la enzima metionina-gamma-liasas asociado a bacterias productoras de compuestos volátiles sulfurados en pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal atendidos en la clínica odontológica de la Universidad Finis Terrae durante el año 2023.

**Investigador Responsable:** Daniel Hevia Magaña

**Alumnos tesistas:** Felipe Cáceres / Vicente Constanzo

**Facultad/Unidad Académica:** Facultad de Odontología

**Miembros del Comité que participaron en la aprobación del estudio:**

Karin Weinborn Astudillo, Presidente (s) CEC-UFT  
Andrea Villagrán Torres, Secretaria Ejecutiva CEC-UFT  
Francisca Valdivieso Undurraga, Facultad de Medicina  
María Angélica Sotomayor, Abogado miembro externo  
Manuel Santos Alcántara, Instituto de Bioética  
Alyssa Garay Navea, representante de la comunidad  
Paulo López Soto, Instituto de Bioética  
Enrique Navarro, Abogado  
Pilar Busquets Losada, Escuela de Enfermería

**Documentos recibidos y revisados por el Comité:**

- - Proyecto de Investigación
- - Curriculum vitae del investigador
- - Certificado de título profesional
- - Anexo I "Ficha de presentación"
- - Anexo II "Compromiso del Investigador"
- - Anexo III "Respaldo Unidad Académica"
- - Anexo IV "Resumen del proyecto de investigación para evaluación ética"
- - Anexo VI "Solicitud de Dispensa de Documento de Consentimiento Informado"

**Considerando que:**

1. El investigador responsable referido cuenta con la experiencia necesaria para la conducción y el desarrollo de este tipo de estudio;

2. La metodología descrita es apropiada para el cumplimiento del objetivo general del estudio que consiste en: *asociar los marcadores moleculares asociados a bacterias productoras de CVS en pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal en la clínica de la Universidad Finis Terrae* y los respectivos objetivos específicos, de acuerdo con los estándares internacionales de rigor científico;

3. Durante la conducción del estudio se garantiza un balance riesgo/beneficio favorable para los participantes;

4. El protocolo contempla todos los resguardos necesarios para la seguridad y bienestar de los participantes;

5. Se ha contemplado el resguardo de la confidencialidad de la información sensible e identificable en la difusión de los resultados, por lo que no introduce un riesgo de menoscabo para la intimidad de los participantes; y

6. Los participantes ingresarán voluntariamente luego de ser adecuadamente informados sobre los aspectos esenciales del estudio, sus deberes y derechos, y los plazos estipulados para el cumplimiento de los objetivos de la investigación.

**Constatado que, el texto del documento de Consentimiento Informado contiene:**

1. La descripción general de los objetivos de la investigación;
2. El detalle de los procedimientos que involucra la participación en este estudio;
3. Los antecedentes sobre el uso que se dará a la información obtenida a partir de cada procedimiento de la investigación;
4. El compromiso respecto a la utilización actual y futura de la información, la que sólo se realizará dentro de los marcos del presente estudio y para el logro de dichos objetivos;
5. El resguardo de la confidencialidad y el anonimato de la información recogida, según corresponde a cada procedimiento del estudio;
6. El detalle respecto del costo en tiempo que significa la participación en el estudio;
7. La información sobre los beneficios y derechos frente a riesgos por la participación en la investigación; y
8. La voluntariedad de la participación y la garantía para cada participante de hacer abandono del estudio, sin repercusión alguna.

**Resolución CEC UFT:**

Este proyecto ha sido **aprobado** por este Comité con fecha **04 de septiembre de 2023** en la **sesión extraordinaria n°5**, la que tiene vigencia de un año.

**El CEC solicita la investigadora responsable que:**

- 1.- Antes de iniciar el estudio, deberá contar con la autorización de la autoridad administrativa correspondiente a la institución en la cual se ejecute el estudio (Director Hospital, Centro de Salud, Colegio o quien corresponda). El no cumplimiento de esta obligación lo expone a sanciones administrativas de acuerdo a la legislación vigente.
- 2.- Para iniciar el proceso de consentimiento y de reclutamiento se debe disponer previamente de la última versión aprobada y timbrada por este Comité **los documentos de Consentimiento Informado e instrumentos.**
- 3.- La presente aprobación ética tiene una **validez de un año**, al cabo del cual deberá solicitar su renovación, con al menos 45 días de anticipación si desea continuar con el estudio. Si no ha recibido la respuesta oficial a su solicitud, el investigador deberá detener las actividades del proyecto, no podrá enrolar a ningún nuevo participante y no podrá proceder con el análisis de los datos.
- 4.- En la eventualidad de requerir cualquier modificación al estudio o a los documentos aprobados originalmente, el investigador deberá notificarlo al Comité por medio de una enmienda al correo [cec@uft.cl](mailto:cec@uft.cl) para la evaluación y emisión de una nueva acta de resolución ética.

Muy cordialmente,

**Mg. Andrea Villagrán Torres Karin Weinborn Astudillo**



A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Karin Weinborn Astudillo".

A second handwritten signature in blue ink, appearing to be "Andrea Villagrán Torres".

**Secretaria Ejecutiva CEC-UFT**

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC-UFT

**Presidenta (s) CEC-UFT**

Se certifica que la información contenida en el presente documento es correcta y que refleja el Acta del Comité Ético Científico de la Universidad Finis Terrae (CEC-UFT). Este Comité adhiere a los principios éticos de la Universidad Finis Terrae que considera como eje fundamental el respeto a la dignidad de la persona humana en cualquier condición. Este Comité cumple además con las Guías de buena práctica clínica definidas por la Conferencia Internacional de Armonización (GCP-ICH); y con las leyes chilenas 19.628; 20.120; 20.584 y 20.850 que modifica el Código Sanitario.

3.



UNIVERSIDAD  
**Finis Terrae**

**Nombre del Estudio:** DETECCIÓN DEL GEN CODIFICANTE PARA LA ENZIMA METIONINA-GAMMA-LIASA ASOCIADA A BACTERIAS PRODUCTORAS DE COMPUESTOS VOLÁTILES SULFURADOS EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON ENFERMEDAD PERIODONTAL ATENDIDOS EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD FINIS TERRAE DURANTE EL AÑO 2023

**Patrocinador/ Fuente Financiamiento**

**Investigador Responsable:** *Daniel Hevia Magaña. Teléfono contacto: +569 93966957*

*Correo electrónico: danielhev@gmail.com*

**Unidad Académica:** Facultad de Odontología, Universidad Finis Terrae

## **DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **Objetivos**

Usted ha sido invitado/invitada a participar en este estudio porque es paciente de la clínica odontológica de la universidad Finis Terrae, y como tal, forma parte del grupo objetivo de este estudio cuyo propósito es asociar los niveles de marcadores moleculares relativos a bacterias productoras de compuestos volátiles sulfurados con la etapa de enfermedad periodontal diagnosticada en el paciente.

#### **1. Procedimiento de la investigación: Metodología**

El procedimiento por el cual se llevará a cabo esta investigación consistirá en consultar los datos referentes al estado periodontal desde la ficha clínica de cada paciente para saber si presenta diagnóstico de enfermedad periodontal y a que etapa corresponde en caso de presentarlo, dichos datos serán corroborados por un especialista (Dr. Hugo Buitano – Periodoncista), paralelamente se va a proceder a extraer muestras desde la lengua (2/3 posteriores) y una muestra de saliva, procedimiento que tendrá una duración aproximada de 15 minutos y será realizado por parte de los estudiantes Felipe Cáceres y Vicente Constanzo, estudiantes de sexto año de odontología de la universidad Finis Terrae, con la supervisión del docente. Luego dichas muestras serán llevadas al laboratorio de la universidad y en base a ellas realizar cultivos bacterianos en medio de cultivo agar-sangre suplementado con hemina-manadiona, posterior a esto se extraerán muestras de colonias bacterianas y serán analizadas mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) para análisis genético de la misma muestra, todo esto llevado a cabo por los estudiantes Felipe Cáceres y Vicente Constanzo con la ayuda de Dr. Daniel Hevia Magaña tutor y profesor guía de este trabajo de investigación, la información recolectada será incluida en la tesis de grado y será utilizada únicamente con el propósito de la investigación.

#### **2. Beneficios**

Usted no se verá beneficiado por participar en esta investigación de salud. Sin embargo, la información obtenida gracias a su participación será de gran utilidad para asociar los niveles de marcadores moleculares relativos a bacterias productoras de compuestos volátiles sulfurados con la etapa de enfermedad periodontal diagnosticada.

#### **4. Riesgos**

Eventualmente durante la obtención de la muestra el paciente puede experimentar alguna sensación de disconfort o incomodidad. De ocurrir esto o si los investigadores perciben esta situación, el paciente puede manifestar su malestar y detener el procedimiento.

5. Confidencialidad de la información

La información será recabada desde la ficha clínica por parte de los estudiantes tesisistas del proyecto: Felipe Cáceres y Vicente Constanzo, estudiantes de sexto año de odontología de la universidad Finis Terrae con la supervisión del Periodoncista Dr. Hugo Buitano profesor colaborador de la investigación, quienes en conjunto determinarán el diagnóstico periodontal del paciente paralelamente los estudiantes Felipe Cáceres y Vicente Constanzo extraerán muestras desde la lengua y saliva del paciente.

Estas muestras serán llevadas al laboratorio de la universidad, en base a ellas se realizarán cultivos bacterianos bajo condiciones especiales y serán analizadas mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) para estudios genéticos de la misma muestra, todo esto llevado a cabo por los estudiantes Felipe Cáceres y Vicente Constanzo con la ayuda de Daniel Hevia tutor y profesor guía de este trabajo de investigación, luego estos datos se codificarán y encriptarán volviendo anónimas sus identidades siendo representadas por un número. La información obtenida se mantendrá en forma confidencial, y de acceso exclusivo del comité investigador, conformado por los investigadores Felipe Cáceres y Vicente Constanzo e investigador responsable; Dr. Daniel Hevia Magaña. Es posible que los resultados obtenidos sean utilizados para futuros estudios, presentados en revistas y conferencias, sin embargo, su nombre no será conocido

6. Voluntariedad

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted tiene el derecho de no aceptar participar o de retractar su consentimiento y retirarse de la investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho como paciente de la facultad de odontología, ni existirán sanciones por parte de esta institución, por lo que se garantiza que no tendrá consecuencias negativas en su atención. Esta investigación no significa un beneficio para su atención odontológica

7. Preguntas

Si tiene preguntas acerca de esta investigación puede contactar o llamar al investigador responsable del estudio Dr. Daniel Hevia Magaña, al teléfono..., Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad Finis Terrae

8. Declaración de consentimiento

Se me ha explicado el propósito de esta investigación, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee. Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado/forzada a hacerlo. No estoy renunciando a ningún derecho que me asista. Se me comunicará de toda nueva información relacionada con el estudio que surja durante la investigación y que pueda tener importancia directa para mí. Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación en esta investigación según mi parecer y en cualquier momento que lo desee. En el caso de retiro, no sufriré sanción o pérdida de derechos por parte de la institución académica.

**Firmas**

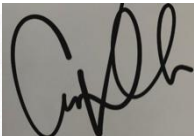
**Nombre paciente:** \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha:

Felipe Cáceres

Fecha:  
Vicente Conzano

Fecha:  
Director de la institución:  
Fecha:



04/09/2023