



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL
CRANEOFACIAL

**RE-ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA DISBIOSIS MICROBIANA DURANTE
PERIODONTITIS EXPERIMENTAL**

Natalia Paz Endo Lavado

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asociada Dra. Loreto Abusleme Ramos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asociado Dr. Nicolás Dutzan Muñoz

Prof. Asistente Dra. Marion Arce Paniagua

Adscrito a Proyecto FONDECYT de Iniciación 11180505

Santiago - Chile

2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL
CRANEOFACIAL

**RE-ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA DISBIOSIS MICROBIANA DURANTE
PERIODONTITIS**

Natalia Paz Endo Lavado

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asociada Dra. Loreto Abusleme Ramos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asociado Dr. Nicolás Dutzan Muñoz

Prof. Asistente Dra. Marion Arce Paniagua

Adscrito a Proyecto FONDECYT de Iniciación 11180505

Santiago - Chile

2022

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que me acompañó y me apoyó incondicionalmente durante todo este proceso. Gracias por su cariño, comprensión y, en especial, paciencia. Sin ustedes no habría llegado tan lejos.

A David, mi mejor amigo y novio, que me ha acompañado en casi todo este proceso brindándome su apoyo y amor incondicional en todo momento.

A Francisca, mi mejor amiga, que siempre me ha apoyado a pesar de la gran distancia que nos separa y siempre me impulsa a ir por más.

A mis amigos, que me acompañaron durante este camino y hemos vivido momentos alegres y tristes, pero siempre perseverando.

A mi tutora principal, la Dra. Loreto Abusleme Ramos, y tutores asociados, el Dr. Nicolás Dutzan Muñoz y la Dra. Marion Arce Paniagua, que, aparte de su gran dedicación y guía en este trabajo, me han abierto las puertas a nuevas posibilidades.

A mis compañeros tesisistas por su gran compañerismo.

Al laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Al Proyecto FONDECYT de Iniciación 11180505

Finalmente, a la Universidad de Chile, sus docentes y funcionarios por su formación tanto profesional como persona.

ÍNDICE

1) RESUMEN.....	6
2) INTRODUCCIÓN.....	8
3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
4) MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5) RESULTADOS.....	24
6) DISCUSIÓN.....	44
7) CONCLUSIONES.....	52
8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
9) ANEXOS Y APÉNDICES.....	64

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria asociada a la presencia de comunidades microbianas disbióticas. Diversos estudios que investigan la patogénesis de esta enfermedad utilizan el modelo de Periodontitis Inducida por Ligadura (PIL) en ratones, y han examinado en profundidad este microbioma mediante técnicas de secuenciación masiva, en específico la amplificación del gen 16S rADN. Sin embargo, la comparación de los perfiles microbianos entre estudios resulta muy compleja debido a diferencias en el procesamiento bioinformático y las bases de datos usadas para la asignación taxonómica.

El objetivo de este estudio fue re-analizar el conjunto de datos de secuenciación masiva de estudios que utilizaron el modelo PIL, a través de un protocolo de análisis bioinformático unificado, para facilitar la comparación entre ellos y determinar si las comunidades bacterianas son similares.

Se realizó el re-análisis de las secuencias del gen 16S rADN de 9 estudios disponibles en la literatura que utilizaron el modelo PIL. Las secuencias fueron agrupadas según la región hipervariable del gen 16S rADN (V1-V3 y V4), pre-procesados, agrupados en Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) y clasificados con la base de datos *Ribosomal Database Project* (RDP). Además, se utilizó la base de datos de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) 16S rADN para mayor resolución taxonómica. Se realizaron análisis de alfa y beta diversidad, además de determinar el perfil de las comunidades microbianas mediante la abundancia relativa.

Los resultados revelaron que la riqueza y diversidad a través de los estudios es similar, y que existen cambios en la estructura de la comunidad microbiana, influenciados por la inducción de la periodontitis y el origen del estudio. Se observó con claridad un cambio en la abundancia relativa de las especies bacterianas desde el quinto día posterior a la instalación de la ligadura, con una composición diferente entre salud y periodontitis experimental. También observamos algunas especies

bacterianas compartidas entre estudios que dominan las comunidades asociadas a PIL.

En conclusión, este re-análisis proporciona una descripción unificada de la disbiosis microbiana asociada al modelo PIL, permitiéndonos compararlas y determinar las similitudes y diferencias entre los estudios.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis y su importancia

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria multifactorial asociada con la presencia de comunidades microbianas disbióticas. Está caracterizada por una destrucción progresiva de los tejidos de soporte de los dientes, siendo sus principales signos la pérdida de inserción clínica, presencia de saco periodontal y sangrado gingival (Papapanou y cols., 2017). Entre las consecuencias de esta enfermedad destacan la pérdida dentaria (pudiendo llegar al edentulismo), disminución de la función masticatoria, autoestima y la calidad de vida (Tonnetti y cols., 2017). La prevalencia mundial indica que 9.8% de la población (796 millones de personas) padece de formas severas de periodontitis (GBD Oral Disorders Collaborators, 2020). En Chile, hay pocos estudios que evalúen la condición periodontal, a pesar de ello, en todos se concluye que la salud periodontal está deteriorada en la población (Carvajal, 2016). El 2010 se publicó una investigación donde se observó que el nivel de daño periodontal en la población chilena afecta al 58% de la población adulta en Chile con una pérdida de inserción ≥ 5 mm (Gamonal y cols., 2010). Una publicación reciente de Morales A. y cols. (2021) donde se compara la nueva clasificación de enfermedades y condiciones periodontales de la Academia de Periodontología Americana y la Federación Europea de Periodontología (AAP/EFP) *versus* la clasificación de los centros de control y prevención de enfermedades y la Academia de Periodontología Americana (CDC/AAP) en la población chilena reveló, en el grupo etario adolescente la prevalencia de periodontitis según la clasificación de AAP/EFP fue de un 75,6%, donde la mayoría estaban en estadio I (39,3%) y estadio II (28,2%). La forma de periodontitis más común fue periodontitis localizada estadio I grado B (18,2%) seguido de periodontitis generalizada estadio I grado B (14,8%). En los adultos, según la clasificación de la AAP/EFP la prevalencia de periodontitis fue de un 99% donde la mayoría fue clasificada como estadio IV (81,3%) seguido de estadio III (12,8%). La forma más común de periodontitis fue periodontitis localizada estadio

IV grado B (38,9%), seguido de periodontitis generalizada estadio IV grado B (34,6%). Al analizar estos resultados podemos concluir que la prevalencia de periodontitis en la población chilena es sumamente alta, constituyendo problema importante a nivel de salud pública y también a nivel del sujeto que la padece.

Disbiosis microbiana en periodontitis

La periodontitis ha sido estudiada durante años. Este conocimiento ha llevado a reconocer el papel fundamental de la disbiosis bacteriana en el ecosistema periodontal y la respuesta inflamatoria exagerada del hospedero en la patogénesis de esta enfermedad. La disbiosis es definida como un estado alterado de la comunidad microbiana en composición y función gatillado por factores relacionados al hospedero y ambientales que sobrepasan la capacidad de las comunidades para adaptarse, llevando a un cambio microbiano (Levy y cols., 2017; Tiffany y Baumler, 2019). Este desbalance entre la microbiota comensal y la respuesta del hospedero promueve la destrucción de los tejidos e impide el control (“*clearance*”) bacteriano efectivo (Van Dyke y Sima, 2019).

Cuando el hospedero no tiene una higiene oral óptima, la comunidad bacteriana inicia un proceso de sucesiones ecológicas. Miembros de las comunidades microbianas asociadas a enfermedad se comienzan a detectar simultáneamente con microorganismos habitualmente asociados a salud, resultando en una comunidad diversa compuesta de especies de ambos grupos; es así como la enfermedad va progresando y la microbiota transicional se va reemplazando por organismos asociados a enfermedad llevando a una comunidad más homogénea (Kirst y cols., 2015). Esta comunidad comienza a estar caracterizada por un predominio de bacterias anaerobias, en su mayoría Gram negativo, que liberan productos que pueden causar un daño directo a las células del hospedero y sus tejidos y/o que activan la respuesta celular y humoral (Clark W. y Løe H., 1993), produciendo así un aumento de los signos inflamatorios en las encías y de la cantidad de fluido crevicular gingival. Además, se produce un aumento significativo

en la biomasa de la comunidad en aquellos sitios con periodontitis inflamados en comparación con los que no lo están (Abusleme y cols., 2013). Por otro lado, la respuesta inmune del hospedero afecta la homeostasis del tejido periodontal (Darveau, 2010).

Análisis del microbioma en periodontitis

El microbioma subgingival se ha estado estudiando por más de 50 años. Debido a la extensa historia de esta línea investigativa se ha transitado por distintas técnicas para llegar a los conocimientos actuales (Curtis, 2014). Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva se han comparado los cambios en las comunidades microbianas en salud, gingivitis y enfermedad periodontal. En salud observamos también bacterias con una característica metabólica común que es la alta tolerancia a ambientes oxigenados como bacterias aerobias o anaerobias facultativas (Abusleme y cols., 2021). Los cambios de la comunidad producidos entre los estadios de salud y gingivitis incluyen un cambio estructural y en la diversidad, desde una dominancia de bacterias Gram positivo a especies Gram negativo anaeróbicas capaces de consumir oxígeno (Abusleme y cols., 2021; Kistler y cols., 2013). En gingivitis se presenta un microbioma con mayor diversidad y riqueza en comparación a los otros dos estadios (Abusleme y cols., 2021; Park y cols., 2015) donde hay una gran variedad de taxones Gram-negativo que difieren a los Gram-negativo presentes en periodontitis, donde de las 69 especies presentes en gingivitis, solo 14 son asociadas a periodontitis (Diaz y cols., 2016). Al comparar salud y periodontitis, se ha observado que hay una mayor riqueza en periodontitis. Sin embargo, en cuanto a la diversidad, definida como el número y la distribución de la abundancia de los distintos tipos de organismos presentes en una comunidad (Human Microbiome Project Consortium, 2012), no difirió entre salud y periodontitis (Abusleme y cols., 2021). Por último, a nivel estructural se ha observado que los estadios de salud, gingivitis y periodontitis poseen estructuras comunitarias diferentes (Abusleme y cols., 2021; Park y cols., 2015).

Por otra parte, muchos de los descubrimientos respecto a la transición de salud a enfermedad se han logrado mediante el uso de modelos animales ya que nos permiten caracterizar mecanismos y encontrar relaciones causa-efecto. Si bien tienen sus limitaciones, nos dan la posibilidad de examinar las interacciones entre el hospedero y la microbiota. Su capacidad radica en probar hipótesis específicas más que imitar todos los aspectos de la enfermedad periodontal (Graves y cols., 2011). Es así como se ha podido determinar tanto el papel de la respuesta inmune del hospedero como el de los microorganismos en infecciones transmisibles, permitiendo entender los mecanismos por el cual las bacterias nos pueden causar enfermedad y como en el hospedero puede modificar el desarrollo de la misma (Graves y cols., 2008).

Modelos animales de periodontitis

Hay múltiples modelos animales, cada uno con sus ventajas y desventajas. Los primates no-humanos tienen estructuras orales y dientes similares a los humanos pero su costo y los requisitos especiales de crianza limitan su uso. Los cerdos miniaturas poseen estructuras maxilofaciales y orales similares a los humanos en términos anatómicos y fisiológicos, sin embargo, son caros, presentan dificultades de crianza y existen pocas investigaciones que justifiquen su uso. Los perros tienen limitaciones similares a las mencionadas pero son capaces de desarrollar de forma natural la periodontitis al igual que los humanos (Oz y Puleo, 2011).

En la literatura podemos encontrar aún más modelos animales aparte de los ya descritos pero la gran mayoría de los estudios optan por el modelo en ratón al ser económico y poseer molares similares en estructura a los humanos. Si bien los ratones son naturalmente resistentes a periodontitis y poseen una microbiota diferente (Oz y Puleo, 2011), no se descarta su uso ya que la periodontitis es una enfermedad inflamatoria provocada por una disbiosis y por lo tanto, no es dependiente de un conjunto de bacterias en particular sino por una combinación específica de genes o actividad colectiva de virulencia dentro de una comunidad

microbiana alterada (Hajishengallis y cols., 2015). Cabe destacar que existen semejanzas en la inmunopatogenia de la enfermedad periodontal en humanos como en modelos murinos. Si bien no son iguales, las comunidades disbióticas muestran un pronunciado comportamiento resiliente, la cual puede tener una gran significancia en el desarrollo y la progresión de la enfermedad (Payne y cols., 2019). También, al igual que los humanos, la periodontitis esta mediada por los mismos factores inflamatorios (prostaglandina E2, TNF α , IL (interleuquina)-1 β , IL-17, entre otros) que en los modelos murinos (Hajishengallis y cols., 2015). Otra similitud es que poseen células quimiosensoriales solitarias (SCCs) que están involucradas en las interacciones entre el hospedero y las bacterias al gatillar la respuesta inmune innata previniendo el sobrecrecimiento de bacterias orales y regulando la composición de la biopelícula oral (Zheng y cols, 2019). Por lo tanto, el modelo es válido mientras sea usado para probar hipótesis específicas de la patogénesis de la periodontitis al ser consistentes con los modelos *in vitro* de células humanas (Hajishengallis y cols., 2015). Además, se posee una cantidad considerable de información sobre el sistema inmune de los roedores y hay ratones transgénicos con deleciones genéticas específicas para encontrar relaciones causa-efecto, suponiendo una gran ventaja para utilizar este modelo experimental (Graves y cols., 2008).

En cuanto a la microbiota de estos animales se ha visto que las comunidades microbianas después del nacimiento, antes de la erupción dentaria, difieren significativamente de las comunidades posteriores a la erupción dentaria. Son *Staphylococcus* sp. (*S. fleuretii*) los que más predominan en la etapa pre-eruptiva, sugiriendo que la principal fuente de bacterias orales proviene de la piel. Durante la erupción *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*) se vuelve más abundante y es el estadio donde más diversidad se ve en la comunidad microbiana. Posterior a la erupción dentaria, se establece la comunidad más diferente al compararla con la comunidad pre-eruptiva. Estas son dominadas por *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*) y *Lactobacillus* sp. (*L. faecis*). Estas comunidades son más diversas y tienen especies

más propias de la cavidad oral (Abusleme y cols, 2020). Además, se ha demostrado que, al igual que en los humanos, en el modelo murino el microbioma disbiótico es estable en el tiempo y es capaz de ser transferido horizontal y verticalmente (Payne y cols., 2019, Abusleme y cols., 2020), ocasionando así que la comunidad microbiana impulse la pérdida de hueso alveolar en individuos previamente sanos (Abusleme y cols., 2020).

Modelos experimentales en ratones para el estudio de la periodontitis

Dentro del mismo modelo animal podemos encontrar diferentes métodos para inducir periodontitis donde podemos destacar: el modelo de ratón de Baker (Baker y cols., 1994) donde se inoculan bacterias orales para inducir la resorción de hueso alveolar; el modelo de inducción química utilizando ácido trinitrobenzenosulfónico y sodio de sulfato de dextrano para gatillar la inflamación de los tejidos orales (Oz y Ebersole, 2010); el modelo de absceso incisivo murino donde se inyecta bacterias en las encías de los incisivos inferiores, entre otros (Oz y Puleo, 2011).

Uno de los modelos experimentales más populares en ratones para el estudio de la patogénesis de la periodontitis es el de la periodontitis inducida por ligadura (PIL) consistente en la inducción de pérdida ósea alveolar inflamatoria en ratones a través de la colocación de ligadura de seda o algodón alrededor del segundo molar maxilar facilitando así la acumulación de la microbiota que se encuentra naturalmente en la cavidad oral del ratón, produciendo inflamación y consecuente pérdida de hueso. En este protocolo no se requiere de la inoculación de microorganismos exógenos para que se produzca una disbiosis, sino que se trabaja con la microbiota del mismo animal (Abe y Hajishengallis, 2013) los que poseen factores de virulencia distintivos (de Souza y cols., 2011).

Se ha observado que el modelo de la ligadura provoca una resorción progresiva de hueso alveolar en dos fases. En primer lugar, ocurre la fase aguda, entre los 0-14 días, con una destrucción progresiva de los tejidos periodontales. Posteriormente ocurre la fase crónica entre los 15-21 días, caracterizado por el cese de la

inflamación periodontal y el cese de la destrucción del tejido (de Molon y cols., 2018). Este comportamiento se explica porque se genera más espacio entre la ligadura y el tejido gingival – al migrar por la resorción del hueso- recuperándose el espacio biológico (de Molon y cols., 2016).

Dentro del mismo modelo se observan en la literatura modificaciones del protocolo según las necesidades del experimento. Por ejemplo, algunos intervienen las comunidades microbianas del ratón, algunas que insertan alguna especie exógena al ecosistema y finalmente aquellas que trabajan en ratones libres de microorganismos (Marchesan J. y cols., 2018). Otra diferencia es el tipo de ratón a utilizar y las condiciones en que se encuentran debido a la diversidad de cepas, proveedores y bioterios, que ejercen una influencia importante en la microbiota y pudiesen afectar el tipo de disbiosis observada durante periodontitis (Abusleme y cols., 2020). En este caso solo consideramos aquellos estudios que trabajan con el modelo de ligadura utilizando las comunidades nativas del ratón.

Análisis bioinformáticos utilizados para la caracterización del microbioma oral

Las técnicas de secuenciación masiva han revolucionado la investigación del mundo microbiano debido a que la mayoría de los microorganismos no han podido ser cultivados o porque las técnicas de cultivo actuales no son capaces de generar crecimiento de algunos microorganismos no cultivables (Rappé y Giovannoni, 2003). Una de estas técnicas, la secuenciación masiva de amplicones del gen 16S rADN, utiliza los genes que codifican para una subunidad ribosomal. En bacterias y arqueas esta corresponde a 16S rADN, amplificándose así la región a elección mediante PCR.

El uso del gen 16S rADN, que codifica para la subunidad pequeña (30S) del ribosoma procarionte, se fundamenta en que es altamente conservado y universal, cuya secuencia es de 1500 pares de bases de largo y posee 9 regiones hipervariables (V1-V9) separados por segmentos conservados, usando estas regiones para el diseño de los partidores (Baker y cols., 2003). Lamentablemente

las plataformas de secuenciación, como Illumina MiSeq, no son capaces de secuenciar todas las pares de bases de 16S rADN y se debe optar por una o varias regiones hipervariables para analizar (Fuks y cols., 2018). Se ha demostrado que el uso de diferentes partidores y regiones afectan los resultados de las investigaciones de las comunidades microbianas (Abellan-Schneyder y cols., 2021; Klindworth y cols., 2013; Liu y cols., 2008; Rintala y cols., 2017; Tremblay y cols., 2015), por lo tanto estos factores deben ser considerados al momento de diseñar el análisis bioinformático de la secuenciación. En el caso de análisis del microbioma en humanos se ha demostrado que el análisis de las regiones V1-3 y V3-5 genera una mejor calidad de datos en términos de diversidad, clasificación taxonómica de las secuencias y menos errores (Human Microbiome Project Consortium, 2012), sin embargo se ha observado que en las comunidades orales el uso de las regiones V1-3 da resultados con mayor reproductibilidad y mejor definición taxonómica, en comparación a los que utilizan V3-4 y V4-5, siendo consistente con estudios de piel y tracto gastrointestinal (Teng y cols., 2018).

Se han utilizado diversos tipos de asignación taxonómica para la caracterización de las comunidades disbióticas asociadas a la ligadura lo cual puede causar diferencias importantes en la diversidad y en la identidad taxonómica de los microorganismos encontrados (Liu y cols., 2008). Esta caracterización se basa en el concepto de Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) generalmente definidas con un 97% de similitud en regiones predeterminadas del gen 16S rADN, que es coincidente con el nivel de especie (Nguyen y cols., 2016) y, bajo estos parámetros, utilizan base de datos como *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, *Ribosomal Database Project (RDP)* o Greengenes para determinar su identificación taxonómica.

Estudio del microbioma periodontal en ratón

Al comparar las investigaciones que utilizan ratones, donde se utiliza PIL y posteriormente se analiza la ligadura misma, podemos ver la variabilidad de metodologías utilizadas y los diferentes resultados que obtuvieron.

Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018) analizó la región hipervariable V4 en grupos control y PIL (5 días de ligadura) a través del software mothur, donde las OTUs más abundantes encontradas fueron *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. (*P. aeruginosa*). Por otra parte, Johnstone y cols. (Johnstone y cols., 2021) analizó el microbioma de forma similar a Dutzan, utilizando la región hipervariable V4 en PIL (5 días de ligadura), sin embargo, sus resultados los mostraron a nivel de género siendo los más prevalentes *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*. Ambos trabajos de Kittaka y cols. (Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020) utilizaron otro software para el análisis de la región V4 en muestras de PIL día 5, denominado USEARCH, obteniendo como resultado que los órdenes bacterianos más prevalentes eran *Pasteurellales*, *Lactobacillales*, *Bacteroidales* y *Bifidobacteriales*. Kitamoto (Kitamoto y cols., 2020), utilizó la región hipervariable V4 pero, en vez de analizar PIL se centraron en otros tiempos experimentales, fundamentalmente al día 14, obteniendo como resultados que OTUs predominantes pertenecen a las familias *Enterobacteriaceae* y *Porphyromonadaceae*, y al género *Enterococcus* sp. Tsukasaki y cols. (Tsukasaki, 2018) utilizando el software CLC Genomics Workbench analizó la región hipervariable V4 pero en los días 3-5-7-10-14 luego de la inducción de la periodontitis mediante la ligadura. Además, realizó la asignación taxonómica mediante la biblioteca de Greengenes, al contrario del resto que usó mayoritariamente RDP. En este caso las OTUs pertenecientes a las clases *Gammaproteobacteria* y *Bacilli* fueron las predominantes en el día 14 posterior a la colocación de la ligadura. Williams y cols. (Williams y cols., 2020) analizó muestras de PIL al día 21 a través de la región V4 utilizando para la asignación taxonómica la base de datos de Greengenes donde los géneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y la especie *Bifidobacterium pseudolongum* mostraron ser las predominantes. Hoare y cols. (Hoare y cols., 2021) también analizó PIL a los 5 días pero a través de la región hipervariable V1-V2 observándose que las OTUs más prevalentes eran *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*), *Pasteurella* sp. (*Rodentibacter pneumotropicus*), *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. (*S. acidominimus*). Y, por

último, tenemos el estudio de Zheng y cols. (Zheng y cols., 2019) que analizó muestra de PIL al día 7 post colocación de la ligadura, utilizando la región hipervariable V1-V3 mediante el software USEARCH y utilizando para la clasificación taxonómica la biblioteca de “CORE” oral, obteniendo como resultados que los géneros *Pasteurella*, *Porphyromonas*, *Streptococcus* y *Enterococcus* son los más prevalentes.

Como se puede observar al comparar los resultados de las investigaciones la diversidad de las comunidades se ve significativamente reducida, pero hay algunas diferencias en las metodologías y como los datos son presentados que comparar las comunidades bacterianas se vuelve una tarea sumamente compleja en cuanto a composición y análisis de diversidad.

Planteamiento del problema

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria asociada a la presencia de comunidades microbianas disbióticas. Diversos trabajos que investigan la patogénesis de esta enfermedad utilizan el modelo de periodontitis inducida por ligadura (PIL) en ratones, y han examinado en profundidad este microbioma mediante técnicas de secuenciación masiva, en específico la amplificación del gen 16S rADN. Las diferencias en los reportes de los resultados de las publicaciones y en la metodología del procesamiento de las secuencias hace que la comparación de los datos obtenidos sea un proceso sumamente difícil de realizar. Es por ello que se requiere de un re-análisis bioinformático donde todos los estudios sean pre-procesados y analizados en conjunto para así disminuir la cantidad de variables que podrían afectar los resultados finales y así se podrá realizar una síntesis de los tipos de disbiosis encontrados, apreciar si existen diferencias importantes entre laboratorios y para sintetizar qué hemos descubierto del microbioma asociado a periodontitis con este modelo. Las conclusiones que emanen de este trabajo son relevantes, ya que nos permiten entender aspectos fundamentales de la

etiopatogénesis de las enfermedades periodontales, y en un futuro influir en la generación de nuevas alternativas terapéuticas.

HIPÓTESIS

La disbiosis microbiana asociada al modelo de periodontitis inducida por ligadura es similar en su composición y estructura entre los estudios a analizar.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la disbiosis microbiana asociada al modelo de periodontitis inducida por ligadura es similar en su composición y estructura entre los estudios a comparar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener y reprocesar los datos bioinformáticos disponibles de estudios que utilizan el modelo de periodontitis inducida por ligadura en ratones y utilicen como muestra la ligadura.
- 2) Analizar para cada estudio la diversidad, estructura y abundancia relativa de las comunidades microbianas durante PIL y controles.
- 3) Comparar la diversidad, estructura y abundancia relativa de las comunidades microbianas entre los distintos estudios incluidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Experimental

Selección y obtención de datos sometidos al re-análisis

Se seleccionaron los estudios que utilizaron el modelo experimental de la ligadura en ratones criados bajo condiciones libres de patógenos específicos y realizaron el análisis de la comunidad microbiana utilizando como muestra la ligadura a través de técnicas de secuenciación masiva. Para esto se realizaron varias búsquedas utilizando los siguientes términos MESH (ligature – microbiome- mice- murine- dysbiosis- oral- periodontitis), y se buscó de forma manual en revistas reconocidas del área de la biomedicina, periodontología y ecología microbiana.

Los artículos que cumplieron los siguientes criterios fueron los sometidos a este re-análisis de datos:

1) Utilizar el modelo de ligadura para inducción de periodontitis. No fueron admitidas las publicaciones que, además de utilizar el modelo, inoculen algún otro microorganismo.

2) La muestra microbiana a analizar sea la ligadura. Esto debido a que los hisopados orales y muestra de tejido gingival circundante al diente difieren en el perfil del microbioma (Johnstone y cols., 2021). Se sugiere que el hisopado oral para la evaluación de la totalidad del microbioma oral, en cambio la muestra de tejido o ligadura tiene una mayor utilidad para el estudio de periodontitis (Abusleme y cols., 2017; Abusleme y cols., 2020). Debido a la proximidad de la ligadura a los tejidos gingivales se debería obtener un perfil de comunidad microbiana más representativo de periodontitis experimental.

3) Han caracterizado las comunidades bacterianas con técnicas de secuenciación masiva, basadas en la secuenciación del gen 16S rADN.

4) Tuviesen disponibles sus datos bioinformáticos crudos para su re-análisis. En caso de no estar publicados se contactó a respectivo autor correspondiente para obtenerlos.

5) Las investigaciones contaban con una correcta identificación de cada muestra.

6) Que el formato de los datos de la secuenciación sea de archivos tipo fastq o fasta.

Los trabajos que cumplieron con los criterios de inclusión fueron nueve; siete de ellos utilizaron partidores que amplificaban a la región hipervariable V4 del gen 16S rADN; uno se centró en las regiones hipervariables V1-V2 y el último en las regiones hipervariables V1-V3, obteniéndose un total de 91 muestras (Tabla 1). Algunos de ellos tenían los datos en repositorios de acceso público (Johnstone y cols., 2021; Kitamoto y cols., 2020; Zheng y cols., 2019), los restantes se obtuvieron contactando vía e-mail al autor correspondiente solicitando los datos requeridos (Dutzan y cols., 2018; Hoare y cols., 2021; Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018, Williams y cols., 2020).

La obtención de los datos mediante repositorios de acceso público fue, en el caso del estudio de Johnstone (Johnstone y cols., 2021) en *European Nucleotide Archive* (ENA Browser (ebi.ac.uk)), colocando el número de acceso otorgado por los autores en el buscador correspondiente. Estos se descargaron directamente del sitio en formato fastq.

En el caso de las publicaciones (Kitamoto y cols., 2020; Zheng y cols., 2019) que tenían sus datos en *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (buscando el número de acceso otorgado por los autores, en el motor de búsqueda SRA. A través de las herramientas otorgadas por el mismo sitio, SRA Toolkit (Download: Software: Sequence Read Archive: NCBI/NLM/NIH), se bajaron los datos requeridos utilizando la consola del ordenador con el comando *prefetch*. Los datos se obtuvieron en formato SRA. Para la conversión de archivos SRA a fastq se aplicó el comando *fastq-dump*.

Re-análisis de los datos publicados que cumplen con los criterios de inclusión

Los datos obtenidos fueron separados en dos grupos según las regiones hipervariables del gen 16S rADN que analizaron: V1-V3 y V4. Las secuencias fueron procesadas utilizando el software mothur (www.mothur.org) (Schloss y cols., 2009), siguiendo un protocolo previamente validado (Kozich y cols., 2013). Las secuencias fueron filtradas por calidad, ensambladas en contigs (de ser necesario) y filtradas por tamaño donde se dejaron sólo aquellas con una longitud entre 200 y 520 pares de bases en ambos grupos. Las secuencias fueron alineadas con la base de datos de SILVA 16S rADN (132) (Quast y cols., 2013). Las secuencias quiméricas fueron removidas a través de la implementación de mothur para el algoritmo VSEARCH (Rognes y cols., 2016). Las secuencias fueron clasificadas usando el clasificador Ribosomal Database Project (RDP) trainset v.18 (Wang y cols., 2007), como esta implementado en mothur, con un corte=80, siguiendo con la remoción de todas las secuencias coincidentes con los cloroplastos, mitocondria, sin identificar, arquea y eucariota.

Se definieron las unidades operacionales taxonómicas (OTUs) utilizando un criterio de similitud del 97% y se clasificó hasta nivel de género cuando era posible. Además, para mejorar la resolución taxonómica hasta nivel de especie, en aquellos casos en que se había alcanzado la clasificación a nivel de género, se comparó la secuencia representativa de las primeras 25 OTUs más prevalentes en BLAST, utilizando la base de datos de NCBI 16S rADN. Cuando se alcanzó un nivel mayor a 97% de similitud y cobertura, la especie bacteriana se reportó en paréntesis como parte del nombre de cada OTU como se ha descrito previamente (Abusleme y cols., 2020; Dutzan y cols., 2017). Cuando las secuencias representativas coincidían con múltiples especies, se seleccionó la especie oral más prevalente basado en la literatura, en caso de contar con esta información. La clasificación a nivel de especie

fue reportada entre paréntesis debido a que es una aproximación, como se ha reportado con anterioridad (Abusleme y cols., 2020; Dutzan y cols., 2017).

Análisis de datos, estadística y visualización

Para análisis de alfa diversidad, que se refiere a la comparación de la diversidad total en la comunidad, vale decir al interior de cada una de las muestras (Lozupone y Knight, 2008), se utilizó el número observado de OTUs como un estimador de riqueza y la versión no paramétrica del índice de Shannon como indicador de diversidad. Estos fueron calculados en mothur. Las pruebas utilizadas para encontrar diferencias estadísticamente significativas fueron las de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Para el análisis de beta diversidad, que es medida que compara las diferencias entre dos o más comunidades (Lozupone y Knight, 2008), se evaluó las diferencias globales estructurales de la comunidad calculando la matriz de distancias a nivel de OTUs basada en “Yue and Clayton Theta Similarity coefficient” a través de mothur. Esta matriz es visualizada utilizando “Principal Coordinates Analysis” (PcoA). Análisis de la varianza molecular (AMOVA) fue utilizado para probar las diferencias entre las estructuras de las comunidades, como está implementado en mothur. Para la comparación de la abundancia relativa de OTUs, se utilizó el método de LefSe (Segata y cols., 2011).

Todos los gráficos fueron generados usando R (versión 4.1.2, <https://www.r-project.org>) y Rstudio (Build 382, <http://www.rstudio.com/>). Para la visualización de los datos se utilizaron los paquetes de R ‘ggplot2’, versión 3.3.5 (<http://ggplot2.org>), ‘reshape’ versión 0.8.8 (<http://had.co.nz/reshape/>), ‘ggh4x’, versión 0.2.1 (<https://github.com/teunbrand/ggh4x>), ‘RcolorBrewer’ versión 1.1-2 (<https://CRAN.R-project.org/package=RcolorBrewer>). Para los análisis estadísticos de alfa diversidad entre los mismos tiempos experimentales, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples de Dunn’s. Estos análisis fueron generados usando GraphPad Prism 9 (San Diego, California).

RESULTADOS

Selección y combinación del conjunto de datos de los diferentes estudios

Para evaluar los perfiles del microbioma oral asociados a disbiosis en PIL, se combinaron y re-analizaron los datos de secuenciación del microbioma asociado a la ligadura provenientes de 9 estudios, agrupados según las regiones hipervariables del gen 16S rADN analizadas. Un total de 91 muestras fueron incluidas. Siete de los trabajos usaron partidores específicos para la región hipervariable V4 del gen 16S rADN (Dutzan y cols., 2018; Johnstone y cols., 2021; Kitamoto y cols., 2020; Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018; Williams y cols., 2020), los cuales fueron combinados para el re-análisis. También, dos de ellos se enfocaron en las primeras regiones hipervariables del gen 16S rADN, uno en las regiones hipervariables V1-V2 (Hoare y cols., 2021) y otro en las regiones hipervariables V1-V3 (Zheng y cols., 2019), ambos fueron combinados y reprocesados juntos (Tabla 1).

El análisis del microbioma a través de los estudios presentaba importantes diferencias en el diseño experimental. Se recolectaron las ligaduras a distintos tiempos experimentales, desde el día 0 (control) hasta el día 21, con solo dos investigaciones que incluyen muestras controles o basales (Tabla 1) (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020). Se debe mencionar que Tsukasaki y cols. (Tsukasaki y cols., 2018) también recolectó muestras controles, pero los autores refieren que no fueron capaces de generar librerías de amplicones desde estas muestras, sugiriendo que las bacterias orales eran muy pocas para ser analizadas mediante la secuenciación del gen 16S rADN.

En cuanto a los animales utilizados, todas las investigaciones usaron la cepa C57BL7/6 de ratón, de los cuales gran parte fueron obtenidos desde *Jackson Laboratories* (7 de 9). Las investigaciones de Williams (Williams y cols., 2020) y

Zheng (Zheng y cols., 2019) obtuvieron sus ratones de las instalaciones *CLEA Japan* (Tokyo, Japón) y *Monell Chemical Senses Center* (Filadelfia, Estados Unidos), respectivamente. Los establecimientos donde los animales fueron alojados son todos distintos, exceptuando las dos investigaciones cuyo primer autor fue M. Kittaka (Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020).

El método de extracción de ADN también difiere en la mayoría de los estudios, pero el método más utilizado fue *Dneasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) en 5 investigaciones (Dutzan y cols., 2018; Hoare y cols., 2021; Johnstone y cols., 2021; Kitamoto y cols., 2020, Williams y cols., 2020) seguido del método *Meta-G-Name DNA Isolation Kit* (Epicentre, Madison, WI, USA) en 2 estudios (Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020).

La secuencia de los partidores y el lugar exacto donde se unen dentro del gen 16S rADN no estaban especificados en 4 investigaciones donde se trabajó con la región hipervariable V4 (Johnstone y cols., 2021; Kitamoto y cols., 2020; Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020) y los otros tres amplificaron la región V4 entre las posiciones 515F – 806R (Dutzan y cols., 2018; Tsukasaki y cols., 2018; Williams y cols., 2020). Para los dos trabajos que utilizaron las primeras zonas hipervariables del gen 16S rADN, si contábamos con información referente a los partidores.

Es importante destacar que todos utilizaron *Illumina MiSeq* como plataforma de secuenciación (Tabla 1).

Tabla 1: Características principales de estudios seleccionados

Estudio	Dutzan y cols., 2018	Johnstone y cols., 2021	Kitamoto y cols., 2020	Kiittaka y cols., 2019	Kittaka y cols., 2020	Tsukasaki y cols., 2018	Williams y cols., 2020	Hoare y cols., 2021	Zheng y cols., 2019
Obtención de datos	Contacto Directo	Contacto Directo / ENA	NCBI	Contacto Directo	Contacto Directo	Contacto Directo	Contacto Directo	Contacto Directo	NCBI
Número de Muestras	10	8	20	6	6	18	8	5	10
Diseño del estudio	Muestras microbiológicas control y LIP al día 5 posterior a la inducción de LIP	Muestras microbiológicas LIP al día 5 posterior a la inducción de LIP	Muestras microbiológicas control y LIP al día 3, 7, 10 y 14 posterior a la inducción de LIP	Muestras microbiológicas LIP al día 5 posterior a la inducción de LIP	Muestras microbiológicas LIP al día 5 posterior a la inducción de LIP	Muestras microbiológicas control (no se detectó bacterias) y LIP al día 3, 5, 7, 10 y 14 posterior a la inducción de LIP	Muestras microbiológicas LIP al día 21 posterior a la inducción de LIP	Muestras microbiológicas LIP al día 5 posterior a la inducción de LIP	Muestras microbiológicas LIP al día 7 posterior a la inducción de LIP
Cepa de ratón	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6J	C57BL/6	C57BL/6J	C57BL/6J	C57BL/6	C57BL/6J	C57BL/6J
Ubicación de la instalación de animales	National Institute of Dental and Craniofacial Research	University of Minnesota	University of Minnesota	University of Missouri-Kansas City e Indiana University	University of Missouri-Kansas City e Indiana University	University of Tokyo	University of California, Los Angeles	University of Pennsylvania	Monell Chemical Senses Center
Vendedor de los ratones	Jackson Laboratories	Jackson Laboratories	Jackson Laboratories	Jackson Laboratories	Jackson Laboratories	Jackson Laboratories	CLEA Japan	Jackson Laboratories	Monell Chemical Senses Center
Método de extracción de ADN	Versión modificada de DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) que incluye un paso de lisis químico/enzimático	Digestión enzimática (lisozima y mutanolisina) (SigmaAldrich) seguido de aislamiento basado en perlas usando DNeasy Powerlyzer Powersoil kit (Qiagen)	Protocolo modificado de DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)	Meta-G-Name DNA Isolation Kit (Epicentre).	Meta-G-Name DNA Isolation Kit (Epicentre).	NucleoSpin Tissue Kit (Takara)	DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen).	Tratamiento con lisozima y proteinasa K y DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen)	PureLink Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)
Primers y región secuenciada del gen de ADN ribosomal 16S	515F - 806R (V4)	Primers específicos para la región V4 (no especificado)	Primers específicos para la región V4 (no especificado)	Primers específicos para la región V4 (no especificado)	Primers específicos para la región V4 (no especificado)	515F - 806R (V4)	515F - 806R (V4)	8F - 361R (V1-V2)	27F - 533R (V1-V3)
Plataforma usada para la secuenciación	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq

Análisis de alfa diversidad

Al analizar la riqueza de las comunidades bacterianas hemos encontrado que todos los estudios que analizaron la región V4 mostraron una riqueza microbiana similar, definida como el número de OTUs observadas, exceptuando el de Kitamoto y cols. (Kitamoto y cols., 2020), en donde las comunidades bacterianas mostraron una riqueza significativamente mayor en estado basal al ser comparados con los controles de Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018), y en el día 3 y 7 posterior a la colocación de ligadura cuando se comparó con las muestras del estudio de Tsukasaki (Tsukasaki y cols. 2018) (Fig. 1).

Interesantemente, en el día 5 posterior a colocación de la ligadura, que es la cantidad de tiempo que más se usó a través de todos los estudios (5 de 7), las comunidades microbianas analizadas desde las ligaduras exhibieron una riqueza microbiana comparable y no se observan diferencias significativas entre las mismas.

En las investigaciones donde se analizó la región hipervariable V1-V3, la riqueza microbiana fue similar a la descrita en las publicaciones que se basaron en la región hipervariable V4. Podemos observar como el de Hoare y cols. (2021) tiene valores similares a los estudios de V4 que utilizaron el día cinco como tiempo experimental. Asimismo, al comparar la investigación de Zheng y cols. (2019) con los estudios de V4 que mantuvieron la ligadura durante siete días, los valores son similares.

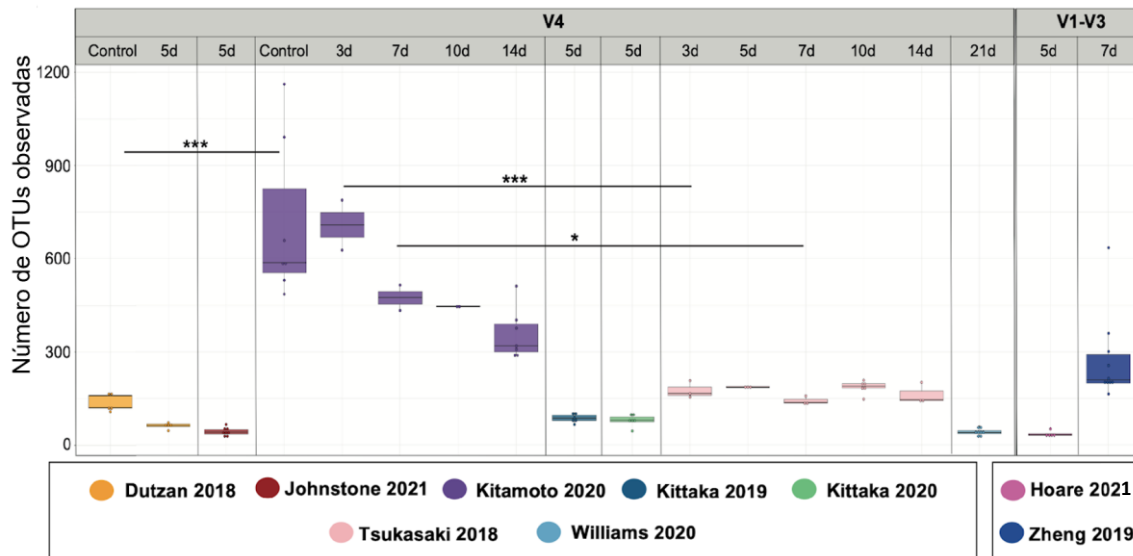


Figura 1: Estimaciones de alfa diversidad para comunidades microbianas asociadas a PIL según estudios y tiempos experimentales mediante el número de especies bacterianas observadas.

Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para las secuencias de los estudios que usan la región hipervariable V4 del gen 16S rADN. Estas comparaciones se realizaron entre tiempos experimentales equivalentes entre estudios. * $P < 0.5$, *** $P < 0.001$.

En términos de diversidad microbiana (Fig. 2), se observan resultados similares a los encontrados en riqueza microbiana. En aquellos que utilizaron la región hipervariable V4, la alfa diversidad fue similar entre estudios al compararlos en los mismos tiempos experimentales, exceptuando las muestras controles entre los estudios de Dutzan y Kitamoto (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020). Además, podemos observar que las muestras control de Kitamoto (Kitamoto y cols., 2020) son significativamente más diversas que las muestras controles de Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018) según el índice de diversidad de Shannon.

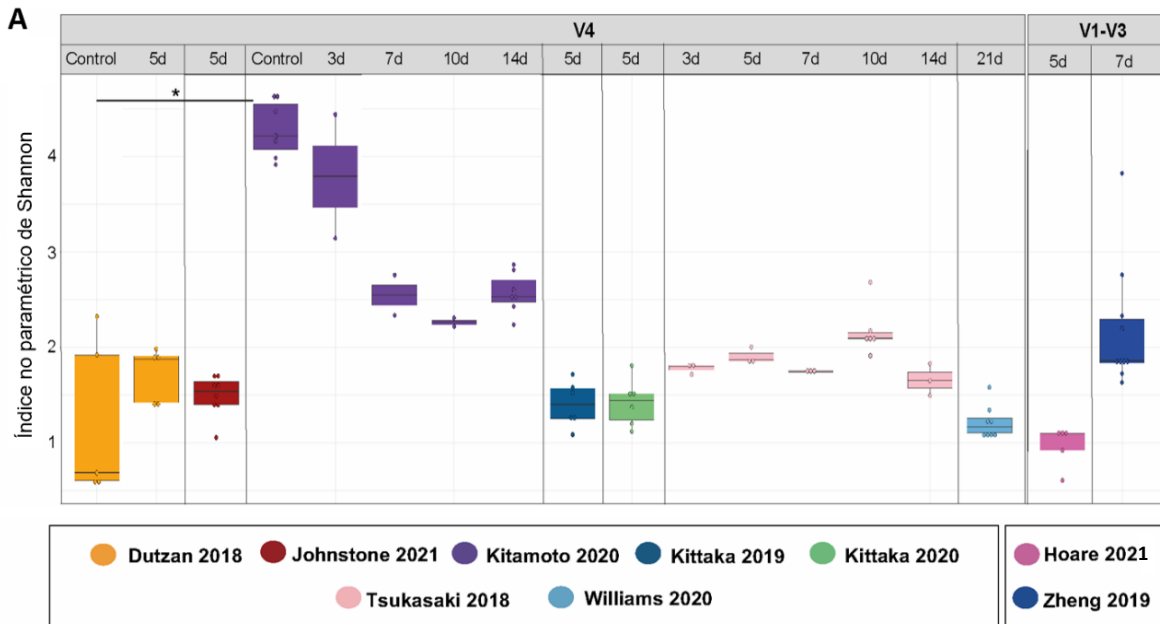


Figura 2: Estimaciones de diversidad alfa para comunidades microbianas asociadas a PIL a través de estudios y distintos tiempos experimentales.

A. Índice de diversidad no paramétrico de Shannon. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para las secuencias de V4. Estas comparaciones se realizaron entre los mismos tiempos experimentales. * $P < 0.5$.

Es interesante resaltar que, independientemente de la región analizada, al comparar las muestras con los mismos tiempos experimentales, se observa una diversidad microbiana similar. Tanto las muestras del día 5 (Dutzan y cols., 2018; Hoare y cols., 2021; Johnstone y cols., 2021; Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018) y los días 7 (Kitamoto y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018; Zheng y cols., 2019) poseen, valores comparables según el índice no paramétrico de Shannon.

Es importante mencionar que se realizaron comparaciones estadísticas directas solo entre los trabajos que presentaban datos del microbioma en los mismos tiempos

experimentales, definidos según la cantidad de tiempo, medida en días, desde que se colocó la ligadura hasta su recolección.

Análisis de beta diversidad

Al realizar los análisis de beta diversidad, medida en ecología microbiana que compara las diferencias entre dos o más comunidades (Lozupone y Knight, 2008), hemos encontrado que uno de los determinantes de la estructura microbiana es el estudio desde donde proceden los datos, agrupándose de acuerdo con éstos, siendo significativa la separación de las comunidades según procedencia de las muestras tanto en el grupo de V4 (Fig. 3A) como el de V1-V3 (Fig. 3B) ($p < 0.001$). La única excepción serían las muestras de las diferentes publicaciones de Kittaka (Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020) donde no se encontraron diferencias significativas (Tabla 2).

Observamos en la figura 3A cómo aquellos estudios que poseen una sucesión de tiempos experimentales (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018) exhiben elipses de mayor área y se distinguen agrupaciones bien definidas dentro de la misma nube o “cluster” de comunidades microbianas.

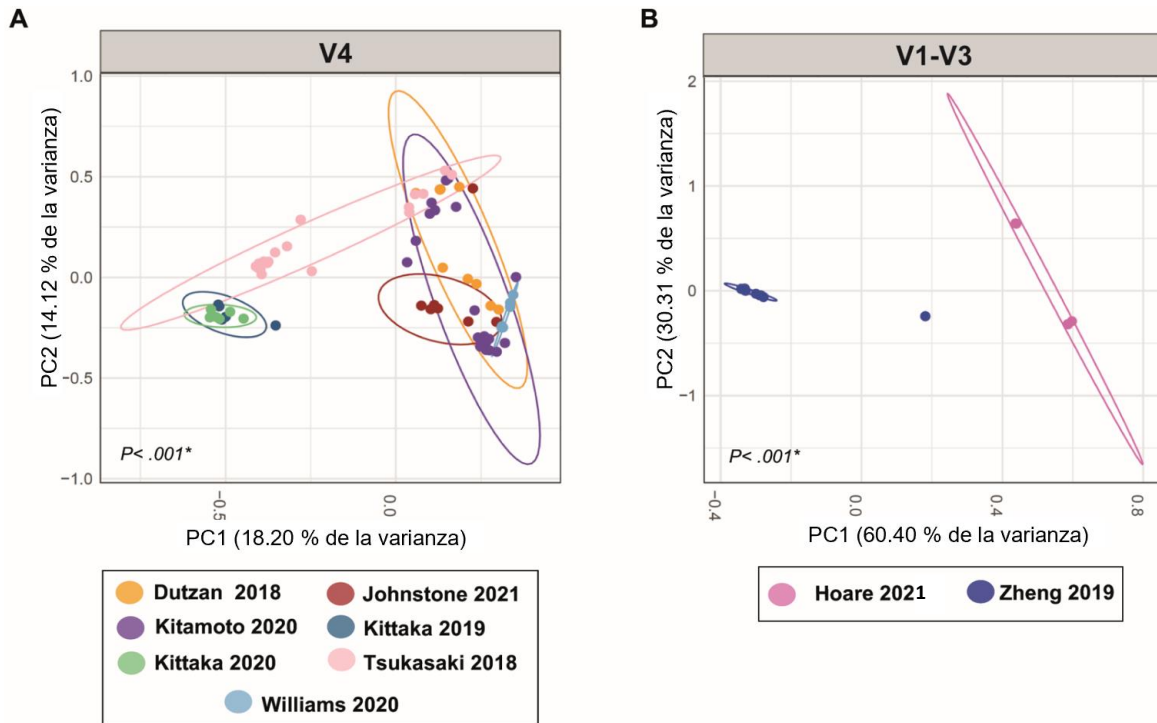


FIGURA 3. Estimaciones de beta diversidad para comunidades microbianas de diferentes estudios.

Los gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) se construyeron en función de la distancia ThetaYC. Los gráficos de PCoA muestran la agrupación de comunidades microbianas según el estudio del que se obtuvieron muestras para el grupo V4 (A), y para el grupo V1-V3 (B). Las nubes de datos se muestran con elipses de confianza del 95 %. La separación de las nubes de datos analizadas posee una significancia de ($P < .001$) obtenido mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA).

Tabla 2: Valores p de la figura 3A

Estudios	Williams 2020	Tsukasaki 2018	Kittaka 2020	Kittaka 2019	Kitamoto 2020	Johnstone 2021
Dutzan 2018	0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.001*	<0.001*
Johnstone 2021	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	
Kitamoto 2020	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*		
Kittaka 2019	<0.001*	<0.001*	0.592			
Kittaka 2020	<0.001*	<0.001*				
Tsukasaki 2018	<0.001*					

Al comparar la similitud de la estructura microbiana entre las muestras con el mismo tiempo experimental en el grupo de V4 (Fig. 4A), se observó una separación significativa de las comunidades microbianas según la cantidad de días transcurridos desde la colocación de la ligadura ($p < 0.001$), sin embargo, esta diferencia deja de ser significativa cuando hay dos días de diferencia entre los grupos de muestras. Además, se puede observar que a partir del día 7 la estructura microbiana se mantiene posterior a la inducción de periodontitis al no presentarse diferencias significativas entre los días 7, 10 y 14. El grupo de muestras en donde la ligadura se mantuvo por 21 días, se agrupa separadamente de las comunidades microbianas obtenidas en tiempos experimentales más tempranos, y esta separación es significativa (Tabla 3).

Llama la atención que las muestras control exhiben una estructura microbiana común, y hubo un cambio del microbioma significativo en la estructura desde el estado basal hasta después de la inducción de periodontitis con todos los tiempos experimentales comparados (Fig. 4A y 4B). Como el día 5 posterior a la colocación de la ligadura fue el punto de tiempo más evaluado a través de los estudios en la región V4 (5 del 9 en total), se decidió comparar la estructura microbiana entre todas las comunidades microbianas obtenidas con este tiempo experimental en comparación con los controles (Fig. 4B, Tabla 4).

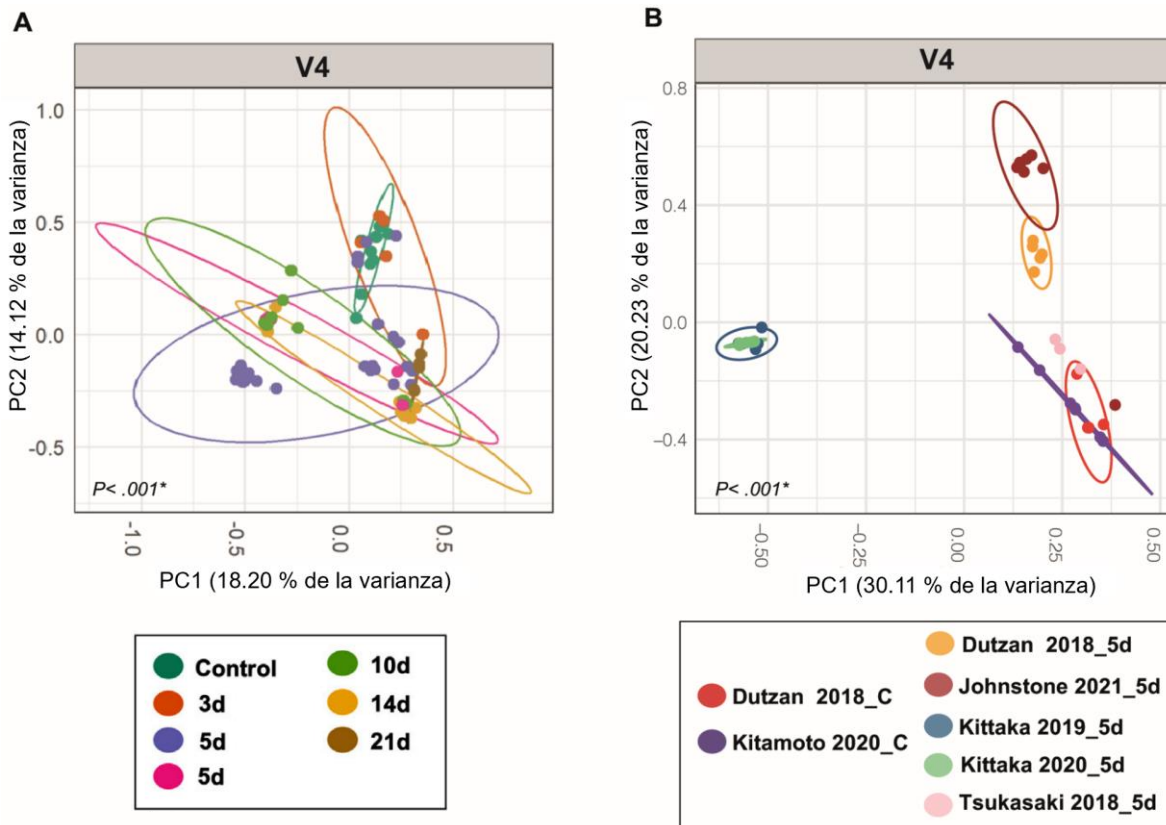


FIGURA 4. Estimaciones de beta diversidad para comunidades microbianas de diferentes estudios y tiempos experimentales.

Los gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) se construyeron en función de la distancia ThetaYC, una medida de la estructura de la comunidad. Los gráficos de PCoA muestran la agrupación de comunidades microbianas según el día del que se obtuvieron muestras para el grupo V4 (A) y para una selección de muestras que se obtuvieron para el control y día 5 en el grupo V4 (B). Las nubes de datos se muestran con elipses de confianza del 95%. La separación de las nubes de datos analizadas posee una significancia de ($P < .001$) obtenido mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA).

Tabla 3: Valores p de la figura 4.A

Días	21d	14d	10d	7d	5d	3d
Control	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.04
3d	<0.001*	<0.001*	0.002*	0.002*	0.004	
5d	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.005		
7d	<0.001*	0.096	0.576			
10d	0.001*	0.051				
14d	<0.001*					

Tabla 4: Valores p de la figura 4.B

Estudios/Día	Tsukasaki 2018_5d	Kittaka 2020_5d	Kittaka 2019_5d	Kitamoto 2020_C	Johnstone 2021_5d	Dutzan 2018_5d
Dutzan 2018_C	0.031	<0.001*	0.002*	0.012	<0.001*	0.01
Dutzan 2018_5d	0.012	<0.001*	<0.001*	0.001*	<0.001*	
Johnstone 2021_5d	0.005	0.001*	<0.001*	<0.001*		
Kitamoto 2020_C	0.007	0.001*	<0.001*			
Kittaka 2019_5d	0.009	0.667				
Kittaka 2020/5d	0.011					

Independientemente de que se compararon los mismos tiempos experimentales, se observa una marcada agrupación de las comunidades microbianas, de acuerdo al estudio de origen. Por otro lado, se analizó las diferencias globales de las estructuras comunitarias en estudios que tenían muestras longitudinales (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018) y se observó que en las muestras controles provenientes de Dutzan y Kitamoto (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020) (Fig. 5A y 5B, respectivamente) y en las muestras de los días 3 y 5 de Tsukasaki (Tsukasaki y cols., 2018) (Fig. 5C), las comunidades microbianas se agruparon juntas, exhibiendo una estructura microbiana similar y se produce un cambio microbiano estructural desde estas condiciones “basales” hasta la inducción de periodontitis.

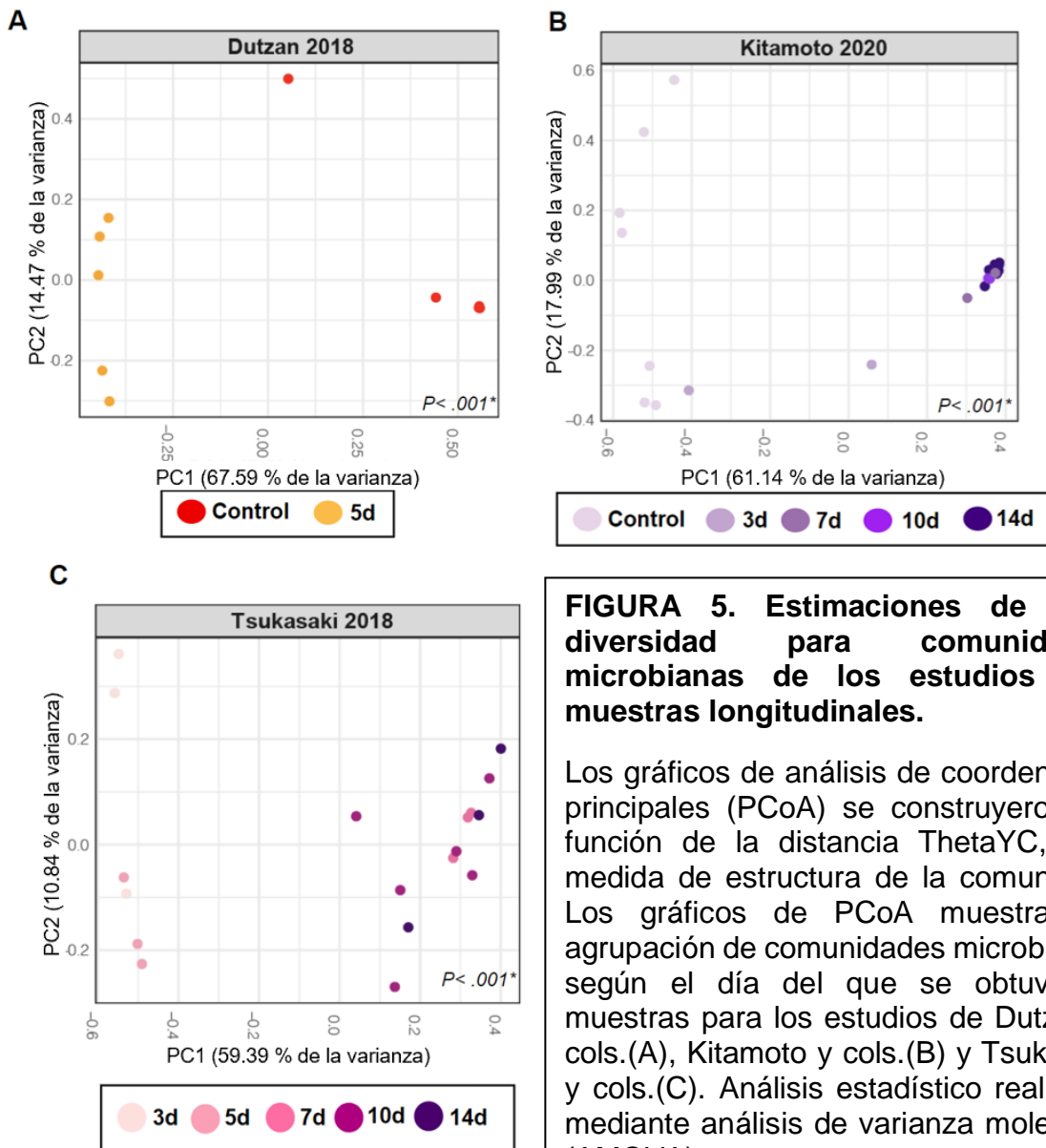


FIGURA 5. Estimaciones de beta diversidad para comunidades microbianas de los estudios con muestras longitudinales.

Los gráficos de análisis de coordenadas principales (PCoA) se construyeron en función de la distancia ThetaYC, una medida de estructura de la comunidad. Los gráficos de PCoA muestran la agrupación de comunidades microbianas según el día del que se obtuvieron muestras para los estudios de Dutzan y cols.(A), Kitamoto y cols.(B) y Tsukasaki y cols.(C). Análisis estadístico realizado mediante análisis de varianza molecular (AMOVA).

Abundancia relativa de los diferentes estudios incluidos en nuestro análisis

Por último, se analizó la abundancia relativa de los taxones más dominantes presentes en cada investigación, y se observaron diferencias marcadas en los perfiles microbianos según de donde provenían las muestras (Fig. 6 y 7). Los perfiles de los estudios que obtuvieron sus muestras en distintos puntos a través del tiempo (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018) muestran un claro cambio microbiano en la abundancia relativa de los taxones bacterianos a medida que los días de la inducción de periodontitis progresaban y se establecía la disbiosis.

A pesar de las diferencias mencionadas previamente entre las investigaciones, se observa que ciertos géneros, como *Streptococcus* y *Enterococcus*, son compartidos y se presentan de forma abundante en todas las comunidades bacterianas de PIL. Por ejemplo, la OTU identificada como *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*) muestra una mayor proporción en los controles de Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018), Kitamoto y cols. (Kitamoto y cols., 2020) y el tercer día de Tsukasaki y cols. (Tsukasaki y cols., 2018), observándose una disminución a medida que pasan los días y la disbiosis evoluciona (Fig. 6).

Una OTU perteneciente al género *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*) muestra una mayor proporción en el estudio de Williams y cols. (Williams y cols., 2020) 21 días posterior a la colocación de la ligadura y en la investigación de Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018) cinco días después de la ligadura, en este último se observó un aumento significativo entre los grupos basales y los del quinto día.

Otro taxón compartido entre los diferentes estudios fue la OTU identificada como *Ligalactobacillus* sp. (*L. murinus*), la cual estaba presente en todas las muestras exceptuando a las de Williams y cols. (Williams y cols., 2020).

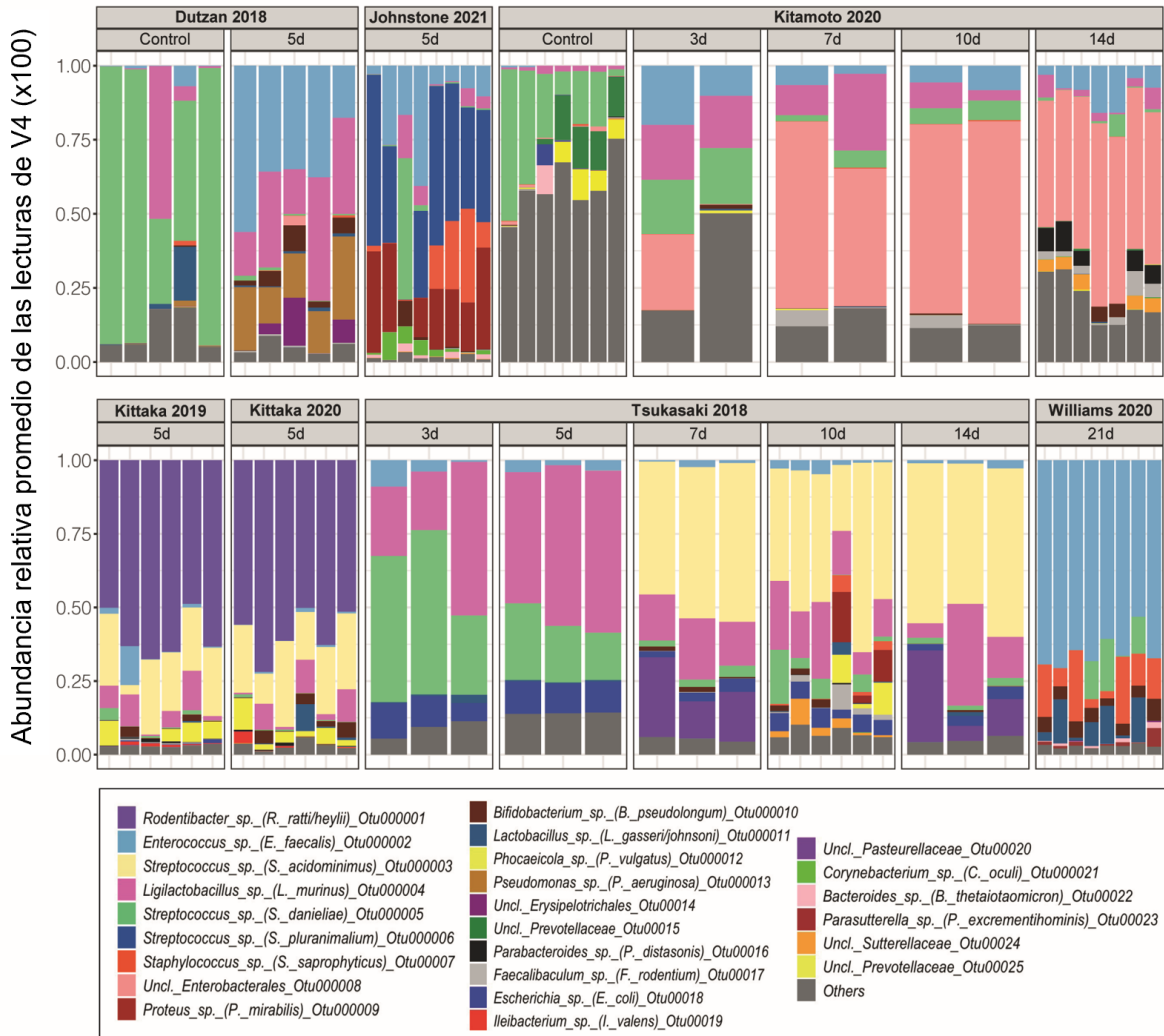


FIGURA 6. Resumen de las OTUs bacterianas más abundantes en el microbioma de los estudios del grupo V4.

Gráfico de abundancia relativa que muestra las principales OTUs en las comunidades según la mayor resolución taxonómica alcanzada y reportando el nivel de especie cuando es posible, de los estudios y tiempos experimentales para la región V4. La taxonomía a nivel de especie se informa entre paréntesis cuando se logró una similitud >97 % utilizando BLAST. Cada barra representa una muestra.

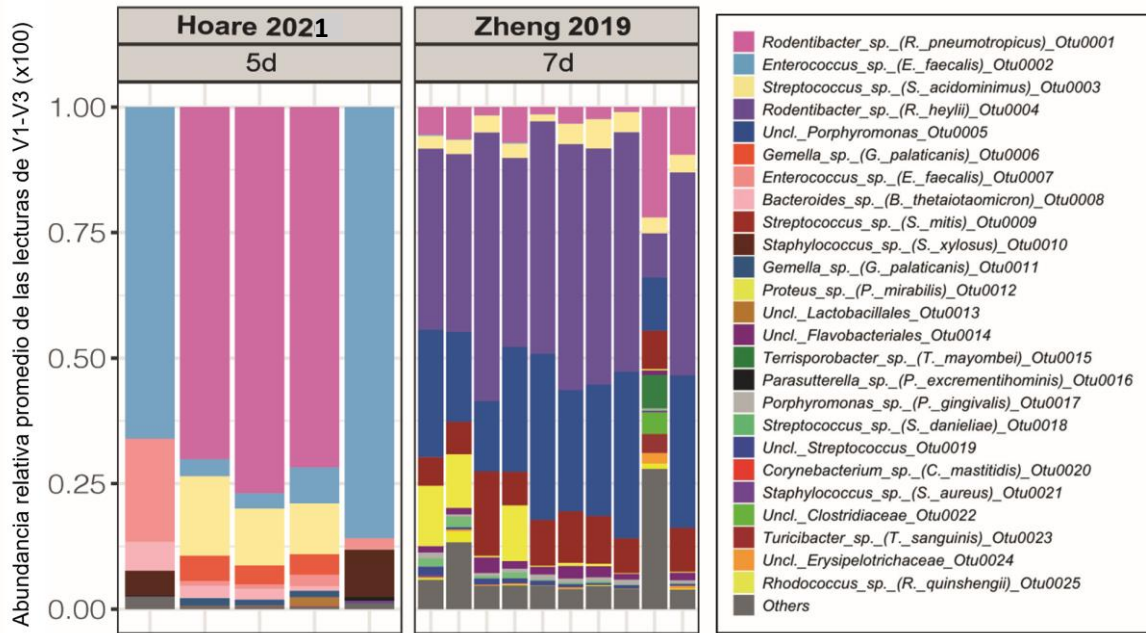


FIGURA 7. Resumen de las OTUs bacterianos más abundantes en estudios de microbioma para el grupo V1-V3.

Gráfico de abundancia relativa que muestra las principales OTUs en las comunidades según la mayor resolución taxonómica alcanzada y reportando el nivel de especie cuando es posible, en diferentes estudios para la región V1-V3. La taxonomía a nivel de especie se informa entre paréntesis cuando se logró una similitud >97 %. Cada barra representa 1 muestra.

Se puede observar otra OTU identificada como *Streptococcus* sp. (*S. acidominimus*) se encontró principalmente en el estudio de Tsukasaki y cols. (Tsukasaki y cols., 2018), aumentando su abundancia relativa a partir del día 7 hasta el día 14 posterior a la colocación de la ligadura, predominando en todos los tiempos experimentales posteriores. Además, esta OTU identificada como *Streptococcus* sp. (*S. acidominimus*), también fue detectada en ambas investigaciones de Kittaka (Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020), siendo el segundo más abundante miembro de las comunidades microbianas en dichos artículos. También fue detectado en las investigaciones de V1-V3 de Hoare y cols. (Hoare y cols., 2021) y Zheng y cols. (Zheng y cols., 2019) (Fig. 7), aunque con una abundancia mucho menor. Al comparar estos últimos dos que analizaron la región V1-V3 se observa que

Rodentibacter sp. (*R. pneumotropicus*) y *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*) fueron los miembros comunitarios que se presentaron con más abundancia en ambos.

El último miembro comunitario más común entre estudios fue una OTU identificada como *Rodentibacter* sp. (*Rodentibacter rattii/heylii*), encontrándose en ambos trabajos de Kittaka y cols. (Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020) y el de Zheng y cols. (Zheng y cols., 2019) (Fig. 6 y 7).

Por otra parte, pudimos observar cómo en las investigaciones con muestras longitudinales había OTUs con diferencias significativas en su abundancia relativa, de acuerdo al tiempo experimental. En el caso del trabajo de Dutzan y cols. (2018) (Fig. 8) en las muestras controles observamos que hay una predominancia de OTUs pertenecientes a las familias *Muribaculaceae* y *Lachnospiraceae*, además debemos destacar que las primeras 3 OTUs que están sobre-representadas en este tiempo experimental son identificadas como *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*), Uncl. *Verrucomicrobiaceae*, y *Flavobacterium* sp., mientras que las OTUs al día 5 posterior a la colocación de la ligadura tienen una mayor representación de otras OTUs, siendo *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*), *Pseudomonas* sp. (*P. aeruginosa*) y Uncl. *Erysipelotrichales* las más sobre-representadas de manera significativa en este grupo experimental.



FIGURA 8. OTUs diferencialmente representadas en PIL y muestras controles provenientes del estudio de Dutzan y cols. (2018). El gráfico muestra los taxones diferencialmente representados según los análisis de LEfSe donde se comparan las muestras controles y las del día 5 posterior a PIL. La clasificación es a nivel de OTU/especie. Las barras representan el puntaje del análisis discriminante lineal (LDA).

Al analizar el trabajo de Kitamoto y cols. (2020) (Fig. 9) hay una predominancia de OTUS correspondientes a la familia *Lachnospiraceae* principalmente, pero también podemos encontrar la misma OTU (Otu00051) de la familia *Muribaculaceae* en el grupo control. Observamos que las tres OTUs que más se representan de forma diferencial en el grupo control son *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*) y dos OTUs de

Uncl. Bacteroidales. Asimismo, en las muestras de día 14 posterior a la colocación de la ligadura encontramos que tenemos una predominancia de OTUs pertenecientes al orden *Enterobacterales* y las OTUs correspondientes a *Uncl. Enterobacterales*, *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*) y *Faecalibaculum* sp. (*F. rodentium*) son las más diferencialmente representadas en el grupo.

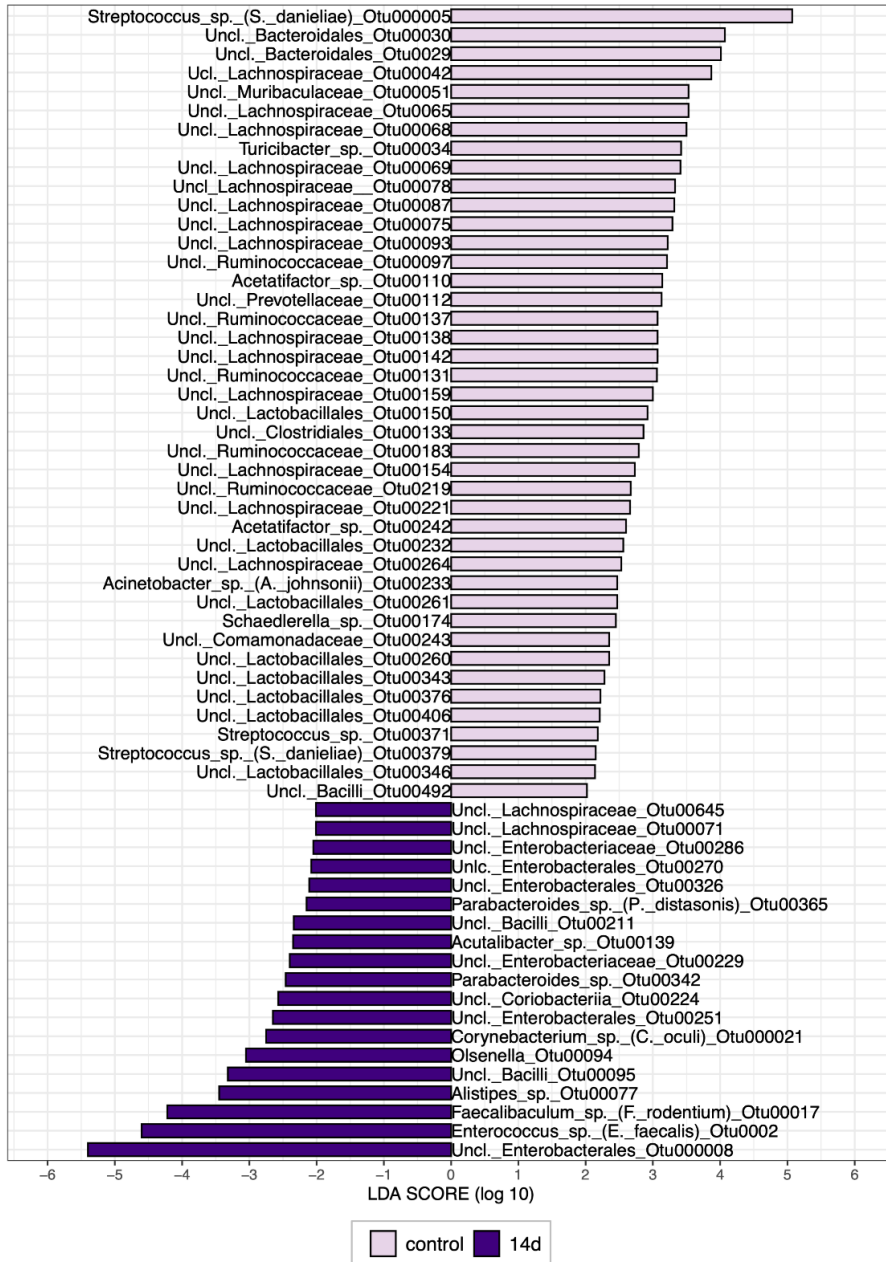


FIGURA 9. OTUs diferencialmente representadas en PIL y muestras controles provenientes del estudio de Kitamoto y cols. (2020). El gráfico muestra los taxones diferencialmente representados según los análisis de LEfSe donde se comparan las muestras controles y las del día 5 posterior a PIL. La clasificación es a nivel de OTU/especie. Las barras representan el puntaje del análisis discriminante lineal (LDA).

En el caso del estudio de Tsukasaki y cols. (2018) (Fig. 10) se decidió utilizar las muestras del día 3 y 5 como controles ya que sus muestras basales no fueron amplificadas. Observamos que en las muestras controles nuevamente aparecen OTUs de la familia *Muribaculaceae*. Además, el orden *Lactobacillales* aparece sobre-representado en este conjunto de muestras. Las tres OTUs más prevalente en este grupo de muestras definidas como salud periodontal debido a los resultados de los análisis de PcoA, son *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*), *Ligilactobacillus* sp. (*L. murinus*) y *Escherichia* sp. (*E. coli*). Mientras que en el caso de las muestras del día 10 encontramos una mayor variación en órdenes y familias, siendo *Streptococcus* sp. (*S. acidominimus*), Uncl. *Sutterellaceae* y *Faecalibaculum* sp. (*F. rodentium*) son las más diferencialmente representativas en el grupo.

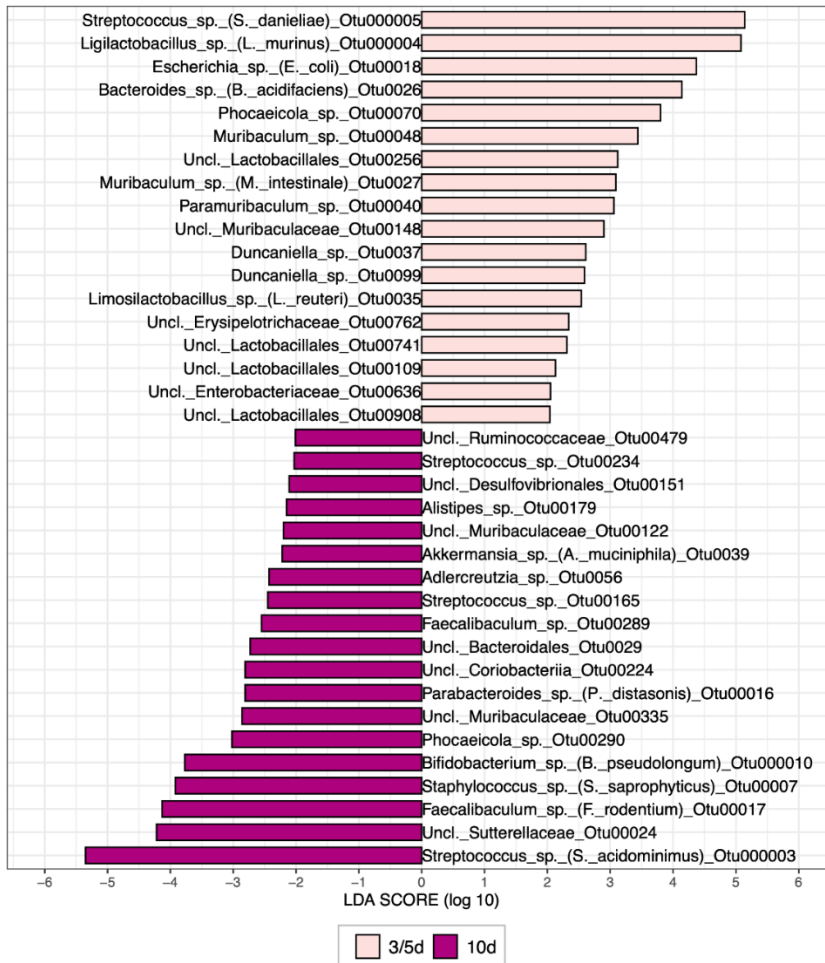


FIGURA 10. OTUs diferencialmente representadas en PIL y muestras controles provenientes del estudio de Tsukasaki y cols. (2018). El gráfico muestra los taxones diferencialmente representados según los análisis de LfSe donde se comparan las muestras controles y las del día 5 posterior a PIL. La clasificación es a nivel de OTU/especie. Las barras representan el puntaje del análisis discriminante lineal (LDA).

Finalmente, intentamos sintetizar e identificar cuáles OTUs estaban asociadas a salud periodontal y a periodontitis inducida a ligadura en ratones. Para ello se definió que las OTUs debían tener un valor en el análisis discriminante lineal mayor a 3 y haber sido detectada en al menos dos de los tres estudios analizados (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018) para asegurarse de que hubiese una fuerte asociación a la condición periodontal correspondiente. Se observó que las OTUs identificadas como *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*) y una OTU perteneciente a la familia *Muribaculaceae*, definían salud periodontal, mientras que las OTUs *Faecalibaculum* sp. (*F. rodentium*), *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*), *Bifidobacterium* sp. (*B. pseudolongum*) y *Adlercreutzia* sp. fueron las más representadas y abundantes durante PIL (Fig. 11).

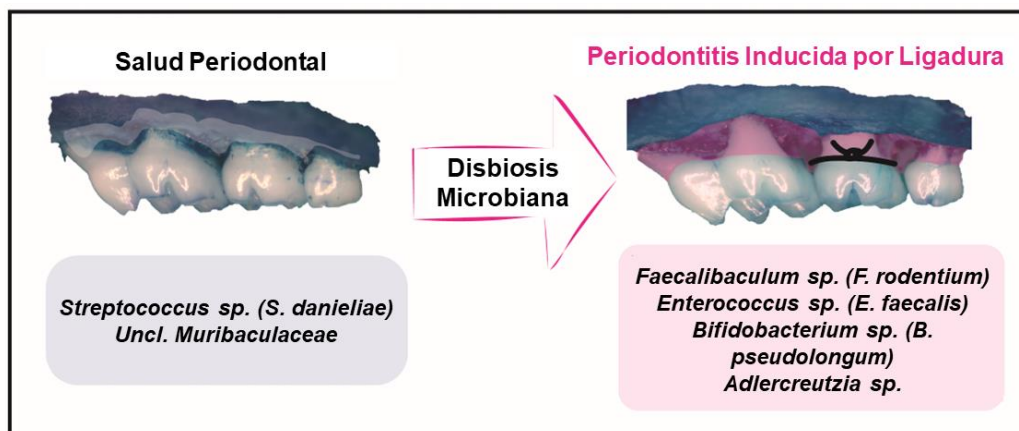


FIGURA 11. Resumen de las OTUs diferencialmente representadas en salud periodontal y durante periodontitis inducida por ligadura (PIL).

La figura muestra las OTUs que estaban sobre representadas tanto en salud periodontal y en PIL entre los tres estudios con muestras longitudinales. Las OTUs mostradas fueron seleccionadas según los valores obtenidos mediante el análisis discriminante lineal (LDA) (mayores a 3) y que fueron detectados en al menos dos de los tres estudios incluidos en esta comparación.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue realizar una comparación de los diferentes artículos que utilizaran el modelo de PIL en ratones, respecto a la composición y estructura de las diferentes comunidades bacterianas. En un intento por homogenizar y unificar los análisis de los microbiomas disponibles hasta la fecha durante PIL, combinamos y analizamos los datos de secuenciación de los 9 estudios que analizaban los microbiomas asociados a PIL (Dutzan y cols., 2018; Hoare y cols., 2021; Johnstone y cols., 2021; Kitamoto y cols., 2020; Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018; Williams y cols., 2020; Zheng y cols., 2019). Se observó que la disbiosis microbiana subyacente al modelo PIL presenta índices de riqueza y diversidad comparables, pero la estructura microbiana y abundancia relativa de taxones bacterianos difiere según la inducción de periodontitis y estudio de procedencia.

La aparición de las técnicas de secuenciación masiva de última generación para la caracterización del microbioma y el uso generalizado de modelos animales para estudiar la patogenia de la periodontitis nos ha permitido ampliar considerablemente nuestra comprensión del papel de las comunidades microbianas como desencadenantes de la resorción ósea alveolar. Entre las estrategias que se han utilizado para inducir la periodontitis en ratones, el método PIL se ha convertido en un modelo murino ampliamente adoptado al ser capaz de inducir la resorción de hueso alveolar en unos pocos días, en los que un cambio en el microbioma constituye un importante impulsor de este proceso (Abe y Hajishengallis, 2013; Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018). Por lo tanto, este modelo se caracteriza por el establecimiento de la disbiosis microbiana sin manipulación adicional, lo que proporciona un entorno experimental relevante para el estudio de estas comunidades en el contexto de nuestra comprensión actual de la disbiosis oral polimicrobiana asociada con la patogénesis de la periodontitis (Hajishengallis y Lamont, 2021). Por lo tanto, en este estudio, el objetivo fue

sintetizar y volver a reanalizar los taxones que caracterizan a PIL en los diferentes trabajos disponibles, ya que las diferencias en el procesamiento complicaban la comparación de los datos y, en consecuencia, obtener conclusiones. No obstante, se reconoce que las diferencias experimentales entre los estudios son una limitación importante al comparar los datos, y, por lo tanto, de este re-análisis.

Diferencias experimentales y metodológicas de los estudios influyen las comunidades microbianas

Todas las investigaciones incluidas en este re-análisis presentaron alguna diferencia en su metodología. Por ejemplo, para la extracción de ADN, sólo 5 de los 9 estudios emplearon el mismo protocolo, que es un factor conocido que podría influir en los perfiles microbianos orales, alfa y beta diversidad (Abusleme y cols., 2014; Teng y cols., 2018). Por otro lado, todos los animales pertenecían al mismo linaje isogénico (C57BL/6), pero algunos de ellos se obtuvieron de diferentes proveedores (Williams y cols., 2020; Zheng y cols., 2019). Se ha demostrado previamente que los ratones de diferentes proveedores exhiben distintas comunidades microbianas orales, intestinales y fecales (Abusleme y cols., 2020; Dutzan y cols., 2017; Ivanov y cols., 2009; Raush y cols., 2016) señalando como posibles causas factores extrínsecos del ambiente como la descamación de la piel de los animales, cuidadores y científicos que están o manejan el ambiente donde se crían los ratones, el pH del agua, el tratamiento de la comida que se es otorga y las condiciones de crianza (Long y cols., 2021; Raush y cols., 2016). Estas variables podrían definir las comunidades tempranas del microbioma oral influenciando, finalmente, la diferencia de los microbiomas al momento de la ejecución del experimento (Abusleme y cols., 2020). Además, las instalaciones donde se mantienen los animales también son un factor importante que influye en la composición del perfil del microbioma en ratones, como se demostró recientemente en las comunidades microbianas intestinales, que experimentan cambios microbianos mientras se aclimatan a un nuevo bioterio, independiente del proveedor

de origen; sin embargo, existe una fracción importante de OTUs compartidas que aún se retiene (Long y cols., 2021).

Los hallazgos de nuestro estudio demuestran que existe una riqueza y diversidad similar en todos los trabajos analizados, ya que observamos que el quinto día después de la colocación de la ligadura todas las publicaciones que evaluaron las comunidades microbianas en ese momento exhibieron riqueza y diversidad de microbiomas comparables (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020; Kittaka y cols., 2019; Kittaka y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018). La única excepción fue el de Kitamoto y cols. (Kitamoto y cols., 2020), que mostró una mayor riqueza y diversidad. Esto podría deberse a las diferencias experimentales y/o metodologías inherentes en ese estudio en particular (Kitamoto y cols., 2020), ya que podemos afirmar que estas diferencias no estaban relacionadas con una mayor profundidad de secuenciación porque las librerías de amplicones se normalizaron con el recuento exacto de secuencias para obtener las estimaciones de alfa diversidad de todas las investigaciones. Si comparamos el estudio de Kitamoto (Kitamoto y cols., 2020) con el trabajo con el cual menos variables tiene (Johnstone y cols., 2021) podemos observar que en el de Kitamoto (Kitamoto y cols., 2020) utiliza ratones de 8 a 12 semanas de edad sin especificar un manejo previo de ellos. En cambio, el estudio de Johnstone (Johnstone y cols., 2021) se ocupa de equilibrar las microbiotas orales y criar los ratones desde el destete de ellos a las 2-4 semanas, siendo el experimento a las 10 semanas de edad. Es probable que el establecimiento de las comunidades tempranas de los ratones haya afectado el perfil microbiano obtenido (Abusleme y cols., 2020). Por último, es muy probable que haya otras variables presentes no especificadas en la metodología que justifiquen esta diferencia. En el futuro sería de utilidad especificar en qué momento se adquirieron los ratones, pH del agua, ciclo de sueño, entre otros factores identificados en la literatura como posibles moduladores de la microbiota oral (Abusleme y cols., 2020; Long y cols., 2021; Raush y cols., 2016).

La estructura y composición de las comunidades bacterianas es definida por la inducción de periodontitis y el estudio de procedencia

Encontramos que la estructura de la comunidad, independientemente de la región del gen 16S rADN analizada, está definida en gran medida por la inducción de periodontitis y el estudio del que se originaron las muestras. Estos hallazgos plantean un aspecto interesante con respecto a la capacidad conservada del modelo PIL para desencadenar cambios en la estructura microbiana periodontal a través de los distintos estudios, un aspecto que podríamos inferir de la literatura pero que, debido a las diferencias importantes en los análisis bioinformáticos, era difícil de determinar y visualizar previo a nuestro estudio. En otras investigaciones en donde volvieron a analizar los conjuntos de datos del microbioma intestinal murino también describieron alteraciones consistentes de la estructura microbiana en un modelo de ratones bien descrito donde el entorno induce obesidad y alteraciones metabólicas (conocido como modelo de la “Dieta alta en grasas”) (Bisanz y cols., 2019) y durante el envejecimiento (You y cols., 2022). Estos meta-análisis y re-análisis bioinformáticos también han demostrado que cada trabajo tiene una marcada influencia en la estructura microbiana, pero esto no parece afectar la reproducibilidad de las alteraciones microbianas observadas con el modelo experimental o variable de interés.

La abundancia y estructura comunitaria va cambiando a medida que se establece la periodontitis experimental

Observamos un cambio microbiano claro en la abundancia relativa de taxones bacterianos a medida que avanzaban los días en los estudios que incluyeron muestreo longitudinal (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018). La caracterización de las comunidades microbianas que se acumulan en la ligadura muestra que estas comunidades experimentan grandes cambios en la estructura y composición, lo que lleva a la disbiosis microbiana. Este proceso de

acumulación y aumento de la biomasa bacteriana, junto con cambios marcados en la dinámica de la comunidad parecen recapitular la transición microbiana que ocurre en los humanos de salud periodontal a enfermedad, aunque a un ritmo mucho más rápido y con diferentes taxones dominantes (Abusleme y cols., 2021; Hajishengallis y Lamont, 2021). De hecho, nuestros análisis revelaron perfiles marcadamente diferentes de las comunidades microbianas disbióticas en todos los trabajos. Reconocemos que los aspectos experimentales inherentes a cada investigación y la variación de muestras entre individuos pueden explicar en parte estos taxones microbianos diferentes. Sin embargo, también se pueden reconocer diferentes tipos de comunidades subgingivales durante la periodontitis (Beyer y cols., 2018; Hong y cols., 2015), por lo que esta variación del microbioma asociada con PIL también puede reflejar esa heterogeneidad.

OTUs transversalmente conservadas durante salud y periodontitis experimental en ratón

A pesar de la variación de la comunidad entre los estudios, observamos especies bacterianas que se conservan en las comunidades microbianas asociadas a la ligadura al inicio y en la inducción de la periodontitis. Una OTU identificada como *Streptococcus* sp (*S. danieliae*) domina las comunidades periodontales durante la salud y también se detectó consistentemente a partir de las muestras de microbioma después de 5 o más días con ligadura. Este hallazgo indica que *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*) bien puede ser una especie bacteriana central o “core” de las comunidades orales murinas, como se ha descrito consistentemente en otras publicaciones (Abusleme y cols., 2020; Benga y cols., 2014; Hernandez-Arriaga y cols., 2019; Joseph y cols., 2021). Con respecto a las especies bacterianas que eran abundantes y predominantes en la comunidad asociada a PIL, una OTU afiliada a *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*) fue el más abundante en todos los trabajos, seguido de una OTU identificada como *Ligalactobacillus* sp. (*L. murinus*). *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*) parece prosperar en diferentes entornos de desregulación inmunitaria oral en ratones además de la periodontitis inducida por ligadura, como un modelo

de candidiasis durante la inmunosupresión por corticoides (Bertolini y cols., 2021). *Ligalactobacillus* sp. (*L. murinus*), como en el caso de *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*), se ha detectado ampliamente en artículos que evalúan el microbioma asociado con la mucosa y la periodontitis en ratones (Abusleme y cols., 2020; Dutzan y cols., 2017; Payne y cols., 2019). Otros taxones bacterianos frecuentemente asociados a PIL en las investigaciones fueron las OTUs identificadas como *Streptococcus* sp. (*S. acidominimus*) y *Rodentibacter* sp. (*R. ratti/heylii*), microorganismos que han sido descritos como comensales en superficies mucosas (Benga y cols., 2018). Por último, una OTU identificada como *Proteus* sp. (*P. mirabilis*) también fue abundante y prevalente en el conjunto de datos reanalizados de muestras en PIL. Interesantemente, se ha informado que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* sp.) dominan las comunidades asociadas con la periodontitis experimental durante PIL, promoviendo la colitis e impulsando la diferenciación de células Th17 específicas en la mucosa oral que pueden migrar al intestino (Kitamoto y cols., 2020).

La periodontitis no está definida por miembros comunitarios bacterianos específicos

Debemos destacar que todos los estudios logran inducir la periodontitis en los ratones y podemos encontrar ciertos taxones microbianos que se repiten entre los diferentes trabajos sugiriendo que cumplen un papel clave en la conformación de las comunidades tanto en salud como en periodontitis experimental, pero que pueden ser reemplazados por otros miembros comunitarios ya que estos no están presentes en todos los perfiles microbianos analizados. Esto nos permite dilucidar que pueden existir distintos perfiles de disbiosis microbiana y que más que una especie particular sea clave para salud y enfermedad periodontal, sean ciertos mecanismos de patogenicidad comunes y la interacción de éstos con el hospedero los esenciales para iniciar periodontitis. Esta heterogeneidad también se ha documentado en humanos previamente (Beyer y cols., 2018; Hong y cols., 2015; Sahrman y cols., 2020), reforzando esta idea de que la etiopatogenia de la

periodontitis no es atribuible a ciertos microorganismos específicos, es más, se ha visto que las especies asociadas a periodontitis son parte de la microbiota nativa en salud periodontal, enriqueciéndose cuando el ambiente cambia a uno de inflamación (Abusleme y cols., 2021). Este cambio de perspectiva permitiría el desarrollo de nuevas terapias preventivas o de tratamiento para el control de la periodontitis donde el objetivo terapéutico sean bloquear factores de virulencia para evitar la respuesta por parte del hospedero o la intervención directa de las comunidades bacterianas.

Proyecciones futuras

Podemos observar cómo en PIL tenemos una dominancia de bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas como *Faecalibaculum* sp. (*F. rodentium*), *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*) y *Bifidobacterium* sp. (*B. pseudolongum*), las cuales también se encuentran en el microbioma intestinal de ratones (Barnes y cols., 2017; Chang y cols., 2015; Mongodin y cols., 2017; Zagato y cols., 2020). La presencia de dichos taxones se explica por el hábito coprofágico de estos animales. Sin embargo, independiente de esta diferencia de comportamiento con respecto a los humanos, podemos ver como los microbiomas orales son similares en cuanto a las características estructurales de la comunidad.

Además, se observó que la OTU0017 en los estudios que analizaron la región V1-3 correspondía a *Porphyromonas* sp. (*P. gingivalis*) y, la OTU0005 al realizar la asignación taxonómica mediante la base de datos Mouse Oral Microbiome también fue identificada como la misma especie (Arce y cols., 2022). Este patógeno es conocido al ser asociado al desarrollo de la periodontitis en humanos (Abusleme y cols., 2021). Conjuntamente, si bien no se encontró la presencia de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, otra bacteria conocida por su presencia en periodontitis en humanos (Gholizadeh y cols., 2017), tenemos la alta presencia de miembros de la misma familia *Pasteurellaceae* en ratones con PIL que podrían estar cumpliendo un rol similar.

Sería interesante, en un futuro, poder identificar que miembros de la comunidad bacteriana en ratones cumplen la función de estas especies altamente prevalentes en periodontitis humana para finalmente desarrollar alternativas terapéuticas trabajando con estos miembros comunitarios.

En conjunto, este trabajo ofrece una descripción general unificada de los cambios microbianos asociados a la periodontitis experimental (modelo PIL) lo que facilita el análisis de las comunidades disbióticas asociadas con periodontitis, proporcionando nuevos conocimientos para contribuir a la expansión de los conocimientos de las interacciones hospedero-microbioma en los tejidos periodontales y así poder generar nuevos enfoques terapéuticos.

CONCLUSIONES

En conclusión, tanto en la riqueza de las OTUs y la diversidad de las comunidades fueron similares entre los artículos comparados independiente de las diferencias inherentes de cada uno. Sin embargo, la beta diversidad difiere significativamente según el trabajo de origen y los tiempos experimentales empleados.

En el caso de la abundancia relativa se concluye que, al igual que la beta diversidad, es dependiente del origen del estudio y los tiempos experimentales al encontrar diferentes perfiles de disbiosis bacteriana. En aquellas publicaciones con un diseño experimental longitudinal (Dutzan y cols., 2018; Kitamoto y cols., 2020; Tsukasaki y cols., 2018) podemos ver una clara sucesión microbiana y el establecimiento de comunidades disbióticas, asociadas a la inducción de periodontitis experimental. Además, identificamos OTUs asociadas a las diferentes condiciones periodontales en ratones donde *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*) domina las comunidades periodontales en salud y en periodontitis inducida por ligadura encontramos que *Enterococcus* sp. (*E. faecalis*) fue la OTU más abundante en los estudios longitudinales, entre otras OTUs.

Este estudio refuerza la idea que variables relacionadas a la crianza y manejo de los ratones tienen una fuerte influencia sobre las comunidades microbianas ya que los únicos grupos que fueron similares en todo aspecto son los que corresponden a Kittaka y cols. (2019, 2020). Además, debemos agregar que las diferencias metodológicas de la técnica de secuenciación usada, donde la elección de la región hipervariable a analizar, partidores y el método de extracción de ADN también pueden causar resultados distintos. A pesar de eso, somos capaces de visualizar determinantes microbianos comunes en los trabajos que podría tener un papel importante en cómo se gesta la disbiosis y, quizás, una participación más directa en la estimulación de los mecanismos inflamatorios periodontales y consecuentemente en la resorción ósea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, T., y Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of immunological methods*, 394(1-2), 49–54.

Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., y cols. (2021). Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere*, 6(1), e01202-20.

Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., y cols. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*, 7(5), 1016–1025.

Abusleme, L, Hoare, A, Hong, B-Y, Diaz, PI. (2021) Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000*; 86: 57– 78.

Abusleme, L., Hong, B. Y., Dupuy, A. K., Strausbaugh, L. D., y Diaz, P. I. (2014). Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *J Oral Microbiol*, 6.

Abusleme, L., Hong, B. Y., Hoare, A., Konkel, J. E., Diaz, P. I., y cols. (2017). Oral Microbiome Characterization in Murine Models. *Bio-protocol*, 7(24), e2655.

Abusleme, L., O’Gorman, H., Dutzan, N., Greenwell-Wild, T., y Moutsopoulos, N. M. (2020). Establishment and Stability of the Murine Oral Microbiome. *Journal of dental research*, 99(6), 721–729.

Anbinder, A. L., Moraes, R. M., Lima, G. M., Oliveira, F. E., Campos, D. R., y cols. (2016). Periodontal disease exacerbates systemic ovariectomy-induced bone loss in mice. *Bone*, 83, 241–247.

Arce, M., Endo, N., Dutzan, N., y Abusleme, L. (2022). A reappraisal of microbiome dysbiosis during experimental periodontitis. *Molecular oral microbiology*, 10.1111/omi.12382. Advance online publication.

Baker, G. C., Smith, J. J., y Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541–555.

Baker, P. J., Evans, R. T., y Roopenian, D. C. (1994). Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Archives of oral biology*, 39(12), 1035–1040.

Barnes, A., Dale, J. L., Chen, Y., Manias, D. A., Greenwood Quaintance, K. E., y cols. (2017). *Enterococcus faecalis* readily colonizes the entire gastrointestinal tract and forms biofilms in a germ-free mouse model. *Virulence*, 8(3), 282–296.

Benga, L., Benten, W. P., Engelhardt, E., Kohrer, K., Gougoula, C., y cols. (2014). 16S ribosomal DNA sequence-based identification of bacteria in laboratory rodents: a practical approach in laboratory animal bacteriology diagnostics. *Lab Anim*, 48(4), 305-312.

Benga, L., Sager, M., y Christensen, H. (2018). From the [*Pasteurella*] pneumotropica complex to *Rodentibacter* spp.: an update on [*Pasteurella*] pneumotropica. *Vet Microbiol*, 217, 121-134.

Bertolini, M., Vazquez Munoz, R., Archambault, L., Shah, S., Souza, J., y cols. (2021). Mucosal Bacteria Modulate *Candida albicans* Virulence in Oropharyngeal Candidiasis. *mBio*, 12(4), e0193721.

Beyer, K., Zaura, E., Brandt, B. W., Buijs, M. J., Brun, J. G., y cols. (2018). Subgingival microbiome of rheumatoid arthritis patients in relation to their disease status and periodontal health. *PloS One*, 13(9), e0202278.

Bisanz, J. E., Upadhyay, V., Turnbaugh, J. A., Ly, K., y Turnbaugh, P. J. (2019). Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet. *Cell Host Microbe*, 26(2), 265-272 e264.

Carvajal, Paola. (2016). Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 9(2), 177-183.

Chang, D. H., Rhee, M. S., Ahn, S., Bang, B. H., Oh, J. E., y cols. (2015). *Faecalibaculum rodentium* gen. nov., sp. nov., isolated from the faeces of a laboratory mouse. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(6), 1309–1318.

Clark, W. B., y Löe, H. (1993). Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 2, 72–82.

Curtis M. A. (2014). Periodontal microbiology—the lid's off the box again. *Journal of dental research*, 93(9), 840–842.

Darveau R. P. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature reviews. Microbiology*, 8(7), 481–490.

de Molon, R. S., Park, C. H., Jin, Q., Sugai, J., y Cirelli, J. A. (2018). Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microscopy research and technique*, 81(12), 1412–1421.

de Molon, R. S., Mascarenhas, V. I., de Avila, E. D., Finoti, L. S., Toffoli, G. B., y cols. (2016). Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clinical Oral Investigations*, 20(6), 1203–1216.

de Souza, J. A., Nogueira, A. V., de Souza, P. P., Cirelli, J. A., Garlet, G. P., y cols. (2011). Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*, 56(10), 1120–1128

Diaz, P. I., Dupuy, A. K., Abusleme, L., Reese, B., Oberfell, C., y cols. (2012). Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Mol Oral Microbiol*, 27(3), 182-201.

Diaz, P.I., Hoare, A., y Hong, B. Y. (2016). Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *Journal of the California Dental Association*, 44(7), 421–435.

Dutzan, N., Abusleme, L., Bridgeman, H., Greenwell-Wild, T., Zangerle-Murray, T., y cols. (2017). On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity*, 46(1), 133-147.

Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., y cols. (2018). A dysbiotic microbiome triggers T_H17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Science translational medicine*, 10(463), eaat0797.

Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel A., Turnbaugh P.J., y cols. (2018) Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome* 6, 17.

Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I., y cols. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of periodontology*, 81(10), 1403–1410.

Gholizadeh, P., Pormohammad, A., Eslami, H., Shokouhi, B., Fakhrzadeh, V., y cols. (2017). Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial pathogenesis*, 113, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.001>

Graves, D. T., Kang, J., Andriankaja, O., Wada, K., y Rossa, C., Jr (2012). Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Frontiers of oral biology*, 15, 117–132.

Graves, D. T., Fine, D., Teng, Y. T., Van Dyke, T. E., y Hajishengallis, G. (2008). The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*, 35(2), 89–105.

GBD 2017 Oral Disorders Collaborators, Bernabe, E., Marcenes, W., Hernandez, C. R., Bailey, J. y cols. (2020). Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *Journal of dental research*, 99(4), 362–373.

Hajishengallis, G., y Lamont, R. J. (2021). Polymicrobial communities in periodontal disease: Their quasi-organismal nature and dialogue with the host. *Periodontol 2000*, 86(1), 210-230.

Hajishengallis, G., Lamont, R. J., y Graves, D. T. (2015). The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*, 6(3), 229–235.

Hernandez-Arriaga, A., Baumann, A., Witte, O. W., Frahm, C., Bergheim, I., y cols. (2019). Changes in Oral Microbial Ecology of C57BL/6 Mice at Different Ages Associated with Sampling Methodology. *Microorganisms*, 7(9).

Hoare, A., Wang, H., Meethil, A., Abusleme, L., Hong, B. Y., y cols. (2021). A cross-species interaction with a symbiotic commensal enables cell-density-dependent growth and in vivo virulence of an oral pathogen. *The ISME journal*, 15(5), 1490–1504.

Hong, B. Y., Furtado Araujo, M. V., Strausbaugh, L. D., Terzi, E., Ioannidou, E., y cols. (2015). Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics. *PloS One*, 10(5), e0127077.

Human Microbiome Project Consortium (2012). A framework for human microbiome research. *Nature*, 486(7402), 215–221.

Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.

Ivanov, I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., y cols. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139(3), 485-498.

Johnstone, K. F., Wei, Y., Bittner-Eddy, P. D., Vreeman, G. W., Stone, I. A., y cols. (2021). Calprotectin (S100A8/A9) Is an Innate Immune Effector in Experimental Periodontitis. *Infection and immunity*, 89(10), e0012221.

Joseph, S., Aduse-Opoku, J., Hashim, A., Hanski, E., Streich, R., y cols. (2021). A 16S rRNA Gene and Draft Genome Database for the Murine Oral Bacterial Community. *mSystems*, 6(1).

Kirst, M. E., Li, E. C., Alfant, B., Chi, Y. Y., Walker, C., y cols. (2015). Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Applied and environmental microbiology*, 81(2), 783–793.

Kistler, J. O., Booth, V., Bradshaw, D. J., y Wade, W. G. (2013). Bacterial community development in experimental gingivitis. *PloS one*, 8(8), e71227.

Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Jiao, Y., Gilliland, M. G., 3rd, Hayashi, A., y cols. (2020). The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell*, 182(2), 447–462.e14.

Kittaka, M., Yoshimoto, T., Schlosser, C., Rottapel, R., Kajiya, M., y cols. (2020). Alveolar Bone Protection by Targeting the SH3BP2-SYK Axis in Osteoclasts. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 35(2), 382–395.

Kittaka, M., Yoshimoto, T., Schlosser, C., Kajiya, M., Kurihara, H., y cols. (2020). Microbe-Dependent Exacerbated Alveolar Bone Destruction in Heterozygous Cherubism Mice. *JBMR plus*, 4(6), e10352.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., y cols. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1.

- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., y Schloss, P. D. (2013). Development of a dualindex sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79, 5112-5120.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., y Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*, 17(4), 219-232.
- Liu, Z., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., y Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic acids research*, 36(18), e120.
- Long, L. L., Svenson, K. L., Mourino, A. J., Michaud, M., Fahey, J. R., y cols. (2021). Shared and distinctive features of the gut microbiome of C57BL/6 mice from different vendors and production sites, and in response to a new vivarium. *Lab Anim (NY)*, 50(7), 185-195.
- Lozupone, C. A., y Knight, R. (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS microbiology reviews*, 32(4), 557–578.
- Marchesan, J., Girnary, M. S., Jing, L., Miao, M. Z., Zhang, S., y cols. (2018). An experimental murine model to study periodontitis. *Nature protocols*, 13(10), 2247–2267.
- Mongodin, E. F., Hittle, L. L., Nadendla, S., Brinkman, C. C., Xiong, Y., y cols. (2017). Complete Genome Sequence of a Strain of *Bifidobacterium pseudolongum* Isolated from Mouse Feces and Associated with Improved Organ Transplant Outcome. *Genome announcements*, 5(40), e01089-17.
- Morales, A., Strauss, F. J., Hämmerle, C., Romandini, M., Cavalla, F., y cols. (2022). Performance of the 2017 AAP/EFP case definition compared with the CDC/AAP definition in population-based studies. *Journal of periodontology*, 93(7), 1003–1013.

Nguyen, N. P., Warnow, T., Pop, M., y White, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ biofilms and microbiomes*, 2, 16004.

Oz, H. S., y Ebersole, J. L. (2010). A novel murine model for chronic inflammatory alveolar bone loss. *Journal of periodontal research*, 45(1), 94–99.

Oz, H. S., y Puleo, D. A. (2011). Animal models for periodontal disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 754857.

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., y cols. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(S1), S173–S182.

Park, O. J., Yi, H., Jeon, J. H., Kang, S. S., Koo, K. T., y cols. (2015). Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *Journal of dental research*, 94(7), 921–927.

Payne, M. A., Hashim, A., Alsam, A., Joseph, S., Aduse-Opoku, J., y cols. (2019). Horizontal and Vertical Transfer of Oral Microbial Dysbiosis and Periodontal Disease. *Journal of dental research*, 98(13), 1503–1510.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., y cols. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D590-596.

Rappé, M. S., y Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual review of microbiology*, 57, 369–394.

Rausch, P., Basic, M., Batra, A., Bischoff, S. C., Blaut, M., y cols. (2016). Analysis of factors contributing to variation in the C57BL/6J fecal microbiota across German animal facilities. *Int J Med Microbiol*, 306(5), 343-355.

Rintala, A., Pietilä, S., Munukka, E., Eerola, E., Pursiheimo, J. P., y cols. (2017). Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 28(1), 19–30.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584

Sahrman, P., Gilli, F., Wiedemeier, D. B., Attin, T., Schmidlin, P. R., y cols. (2020). The Microbiome of Peri-Implantitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms*, 8(5), 661.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., y cols. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75,75377541.

Teng, F., Darveekaran Nair, S. S., Zhu, P., Li, S., Huang, S., y cols. (2018). Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Scientific reports*, 8(1), 16321.

Tiffany, C. R., y Baumler, A. J. (2019). Dysbiosis: from fiction to function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 317(5), G602-G608.

Tonetti, M. S., Bottenberg, P., Conrads, G., Eickholz, P., Heasman, P., y cols. (2017). Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing - Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*, 44 Suppl 18, S135–S144.

Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, y cols. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol.* 4;6:771.

Tsukasaki, M., Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., y cols. (2018). Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nature communications*, 9(1), 701.

Van Dyke, TE, y Sima, C. (2020) Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: Is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? *Periodontol 2000* 82: 205- 213.

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. y Cole, J. R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73, 5261-5267.

Williams, D. W., Vuong, H. E., Kim, S., Lenon, A., Ho, K., y cols. (2020). Indigenous Microbiota Protects against Inflammation-Induced Osteonecrosis. *Journal of dental research*, 99(6), 676–684.

Xiao, E., Mattos, M., Vieira, G., Chen, S., Corrêa, J. D., y cols. (2017). Diabetes Enhances IL-17 Expression and Alters the Oral Microbiome to Increase Its Pathogenicity. *Cell host & microbe*, 22(1), 120–128.e4.

You, X., Dadwal, U. C., Lenburg, M. E., Kacena, M. A., y Charles, J. F. (2022). Murine Gut Microbiome Meta-analysis Reveals Alterations in Carbohydrate Metabolism in Response to Aging. *mSystems*, e0124821.

Yuan, H., Gupte, R., Zelkha, S., y Amar, S. (2011). Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(11), 1029–1036.

Zagato, E., Pozzi, C., Bertocchi, A., Schioppa, T., Saccheri, F., y cols. (2020). Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum rodentium* and its human

homologue protect from intestinal tumour growth. *Nature microbiology*, 5(3), 511–524.

Zheng, X., Tizzano, M., Redding, K., He, J., Peng, X., y cols. (2019). Gingival solitary chemosensory cells are immune sentinels for periodontitis. *Nature communications*, 10(1), 4496.

ANEXOS Y APÉNDICES

Anexo 1



Programa
Fondecyt

N° 018/FONDECYT/518

Santiago, 30 de Octubre del 2018
Ref.: Proyecto N° 11180505

Señora
LORETO ABUSLEME RAMOS

Estimada señora ABUSLEME:

Por encargo de los Consejos Superiores de Ciencia y Desarrollo Tecnológico, informamos a usted que su proyecto postulado al Concurso de Iniciación en Investigación 2018, ha sido aprobado. Reciba nuestras sinceras felicitaciones por el éxito de su postulación.

En esta convocatoria concursaron 1.233 proyectos y se financiaron 363 (29,4%). Su propuesta fue evaluada en el Consejo de CIENCIA y calificada con 4,300 puntos, ubicándose en el lugar N° 5 del Grupo de Estudio de MEDICINA G2-G3 - CS. CLÍNICAS Y CS. DE LA SALUD PÚBLICA. En este Grupo concursaron 54 proyectos, se evaluaron 45 y aprobaron 14 (25,9%). La calificación del último proyecto financiado en este Grupo fue de 4,030 puntos.

Adjuntamos un informe del proceso de evaluación, así como las calificaciones y comentarios que el Panel realizó al proyecto.

En el sistema de evaluación, donde se encuentra disponible la presente carta, podrá acceder al presupuesto asignado a su proyecto y a un informe con el detalle de las certificaciones y/o autorizaciones aprobatorias, que deberá presentar como uno de los requisitos para la transferencia de recursos al proyecto, de acuerdo a lo establecido en el numeral 6.2.1. de las bases concursales.

Tenga presente que los recursos asignados por concepto de honorarios serán revisados anualmente, ajustándose a los montos máximos establecidos en las bases correspondientes, por participación en proyectos FONDECYT en calidad de Investigadores(as) Responsables y Coinvestigadores(as), si aplica. Si el presupuesto otorgado ha sido modificado en relación a lo solicitado, usted puede redistribuir anualmente los recursos, de acuerdo a las necesidades de ejecución del proyecto, si lo estima pertinente.

El convenio de financiamiento que deberán suscribir usted y el(la) Representante Legal de la Institución Patrocinante de su proyecto será enviado a esta última a la brevedad.

Saludan atentamente a usted,

EDGAR VOGEL GONZÁLEZ
Presidente
Consejo Superior de Ciencia

MARIO HAMUY WACKENHUT
Presidente
Consejo Superior de Desarrollo Tecnológico

A reappraisal of microbiome dysbiosis during experimental periodontitis

Marion Arce^{1,2,3}  | Natalia Endo^{1,2}  | Nicolas Dutzan^{1,2,3}  | Loreto Abusleme^{1,2,4} 

¹Laboratory of Oral Microbiology, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile

²Laboratory for Craniofacial Translational Research, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile

³Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile

⁴Department of Pathology and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile

Correspondence

Loreto Abusleme Ramos, Department of Pathology and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, University of Chile, Olivos 943, Independencia, Santiago, Chile.
Email: loreto.abusleme@odontologia.uchile.cl

Funding information

ANID, FONDECYT, Grant/Award Numbers: 11180505, 11180389; Scholarship, Grant/Award Number: 21221003

Periodontitis is a chronic inflammatory disease associated with the presence of dysbiotic microbial communities. Several studies interrogating periodontitis pathogenesis have utilized the murine ligature-induced periodontitis (LIP) model and have further examined the ligature-associated microbiome relying on 16S rRNA-based sequencing techniques. However, it is often very challenging to compare microbial profiles across studies due to important differences in bioinformatic processing and databases used for taxonomic assignment. Thus, our study aim was to reanalyze microbiome sequencing datasets from studies utilizing the LIP model through a standardized bioinformatic analysis pipeline, generating a comprehensive overview of microbial dysbiosis during experimental periodontitis. We conducted a reanalysis of 16S rDNA gene sequencing datasets from nine published studies utilizing the LIP model. Reads were grouped according to the hypervariable region of the 16S rDNA gene amplified (V1-V3 and V4), preprocessed, binned into operational taxonomic units and classified utilizing relevant databases. Alpha- and beta-diversity analyses were conducted, along with relative abundance profiling of microbial communities.

Our findings revealed similar microbial richness and diversity across studies and determined shifts in microbial community structure determined by periodontitis induction and study of origin. Clear variations in the relative abundance of bacterial taxa were observed starting on day 5 after ligation and onward, consistent with a distinct microbial composition during health and experimental periodontitis. We also uncovered differentially represented bacterial taxa across studies, dominating periodontal health and LIP-associated communities.

Collectively, this reanalysis provides a unified overview of microbial dysbiosis during the LIP model, providing new insights that aim to inform further studies dedicated to unraveling oral host-microbial interactions.

KEYWORDS

16S rRNA, 16S rDNA, dysbiosis, experimental periodontitis, ligature-induced periodontitis, microbiome

Abbreviations: LIP, Ligature-Induced periodontitis; 16S rRNA, 16S ribosomal RNA; 16S rDNA, 16S ribosomal RNA gene; NCBI, National Center For Biotechnology Information; RDP, Ribosomal Database Project; OTU, Operational Taxonomic Unit; MOMD, Mouse Oral Microbiome Database; PCoA, Principal Coordinates Analysis.

Marion Arce and Natalia Endo contributed equally to this study.

© 2022 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.